

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Felipe Carvalho Gondim

**Caracterização biológica de subtipos de
Leishmania amazonensis transfectadas com
proteínas fluorescentes GFP e RFP**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA
A PESQUISA BIOMÉDICA (BIOFÍSICA E FISIOLOGIA).

Orientadora: Bartira Rossi Bergmann

Junho / 2014

Felipe Carvalho Gondim

Caracterização biológica de subtipos de *Leishmania amazonensis* transfectadas com proteínas fluorescentes GFP e RFP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre Formação para a Pesquisa Biomédica. Área de concentração: Biofísica e Fisiologia.

Orientadora: Bartira Rossi Bergmann

Rio de Janeiro
2014

Carvalho-Gondim, Felipe
Caracterização biológica de subtipos de *Leishmania amazonensis* transfectadas com proteínas fluorescentes GFP e RFP / Felipe Carvalho Gondim – Rio de Janeiro, 2014 67 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica (Biofísica e Fisiologia), 2014.

Orientadora: Bartira Rossi Bergmann

1. *Leishmania amazonensis* 2. GFP 3. RFP
4. Proteínas fluorescentes 5. Genes repórteres
I. Rossi-Bergmann, B. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Felipe Carvalho Gondim

Caracterização biológica de subtipos de *Leishmania amazonensis* transfectadas com proteínas fluorescentes GFP e RFP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre Formação para a Pesquisa Biomédica. Área de concentração: Biofísica e Fisiologia.

Aprovada por:

Dra. Bartira Rossi Bergmann (Orientadora, Doutora, UFRJ)

Dra. Ana Carolina Siqueira Couto de Oliveira (Doutora, UFRJ)

Dr. Alexandre Morrot Lima (Doutor, UFRJ)

Dr. Bruno Lourenço Diaz (Doutor, IOC/FIOCRUZ)

Dr. Christianne Bandeira de Melo (Revisora, Doutora, IOC/FIOCRUZ)

Dedico à minha família: Marco, Regina,
Iracy, Marco Antônio e Marcele.

Agradecimentos

À Professora Bartira Rossi Bergmann, por ter confiado em mim no desempenho da dupla função técnico-aluno. Sou grato pelas orientações, conselhos e amizade.

Ao Professor Herbert Leonel de Matos Guedes por ter construído a La-RFP e tornado possível este trabalho. Aproveito para agradecer pelas dúvidas tiradas e paciência e pela amizade.

Agradeço ao Técnico Fernando Pereira de Almeida do Laboratório Hertha Meyer pelo auxílio na microscopia de fluorescência.

Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e seu corpo docente, pelos ensinamentos e pela oportunidade de utilizar os recursos.

Aos meus pais, irmão e avó. Vocês são meu alicerce.

Aos amigos muito especiais do Laboratório: Ariane, Beatriz, Cíntia, Douglas, Eliane, Euma, Izabella, Juliana, Júlia, Maysa, Milene, Natália e Wallace pela convivência, amizade e por todos os momentos de descontração. O convívio com vocês marca bastante o meu dia-a-dia.

A cada um dos meus companheiros do Mestrado Profissional: André, Beatriz, Camilla, Diego, Felipe, Jorgette, Joana, Rafaella, Leile, Rachel e Jeanine. Obrigado por partilhar todos os momentos durante o curso. Sem dúvidas, na companhia de vocês tudo ficou mais fácil.

A todos os meus amigos que tornam a vida mais feliz e divertida. Sendo piegas, a família que escolhi.

Agradeço a Deus pela vida.

“Viver é desenhar sem borracha.”

Millôr Fernandes

RESUMO

CARVALHO-GONDIM, Felipe. **Caracterização biológica de subtipos de *Leishmania amazonensis* transfetadas com proteínas fluorescentes GFP e RFP**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Biomédicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O desenvolvimento de novas terapias para as leishmanioses requer metodologias mais rápidas e sensíveis para o teste de fármacos e vacinas tanto *in vitro* como *in vivo* e parasitos que expressam genes repórteres tem servido de ferramenta. Há vários anos, nosso laboratório faz uso de uma *Leishmania amazonensis*-GFP (La-GFP) que tem se prestado muito bem para avaliação da carga parasitária *in vitro* e *in vivo*, mas não para o imageamento intravital, devido à autofluorescência no espectro do verde dos diferentes tecidos murinos. Em 2010, foi produzida pelo Professor Herbert Guedes (GUEDES, 2010) uma *L. amazonensis* fluorescente vermelha (La-RFP) contendo o gene repórter *mCherry* episomal. Este trabalho tem como objetivo estudar o potencial da La-RFP como ferramenta de trabalho através de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, inclusive para o imageamento intravital, em comparação com a La-GFP, utilizada rotineiramente por nosso grupo. Para os experimentos *in vitro*, foram utilizadas as técnicas de cultura de células, infecção de macrófagos, coloração por Giemsa, contagem direta em câmara de Neubauer, citofluorimetria de fluxo e microscopia de fluorescência. Para a etapa *in vivo*, camundongos BALB/c foram infectados e a lesão acompanhada por paquimetria durante a infecção e, ao final, a carga parasitária foi avaliada por ensaio de diluição limitante (LDA) e citofluorimetria de fluxo. *In vitro*, resultados mostraram que não houve diferença na taxa de crescimento em cultura para ambas na ausência do antibiótico Geneticina (G418 – antibiótico o qual ambas possuem marcador de resistência). Na presença de concentrações crescentes de G418, tanto a La-RFP como La-GFP mostraram-se resistentes, no entanto, apresentando um retardo no crescimento que foi mais pronunciado na La-RFP. A concentração de 2000 µg/mL de G418 selecionou 99% parasitos fluorescentes de La-GFP e 82% de La-RFP, sendo a fluorescência da La-GFP 10 vezes mais intensa. A microscopia de fluorescência das formas promastigotas também mostrou que a La-GFP tem maior intensidade de fluorescência em relação a La-RFP. No ensaio de estabilidade do plasmídeo, a La-GFP também se mostrou melhor que a La-RFP, mantendo 60% da população fluorescente no vigésimo dia de cultura contra 5% da La-RFP. Em relação à infectividade de macrófagos *in vitro*, não houve diferença no percentual de macrófagos infectados entre os 3 subtipos do parasito, no entanto a La-GFP e La-RFP foram levemente menos infectivas em comparação a *L. amazonensis* selvagem (La-WT) na relação amastigota/macrófago. As formas amastigotas intracelulares tiveram redução de 30% na intensidade da fluorescência para os dois subtipos fluorescentes. Quanto à infectividade *in vivo*, não houve diferença de entre as La-GFP e La-RFP, no entanto ambas foram menos infectantes que a La-WT. Concluímos que a La-RFP não é adequada para uso como ferramenta fluorescente de quantificação rápida, tampouco para seu uso no imageamento *in vivo*, uma vez que sua fluorescência não é estável e é menos intensa do que a La-GFP. A La-GFP presente no laboratório ainda é a melhor ferramenta de estudo para os métodos empregados, visto que ela apresenta maior fotoestabilidade e sua fluorescência é mais intensa que da La-RFP.

ABSTRACT

CARVALHO-GONDIM, Felipe. **Biological characterization of *Leishmania amazonensis* subtypes transfected with GFP and RFP fluorescent proteins.** Dissertation (Professional Master in Biomedical Sciences - Biophysics) - Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro , Rio de Janeiro , 2014.

The development of new therapies for leishmaniasis requires faster and more sensitive methodologies to the drug and vaccine testing both *in vitro* and *in vivo*. For this end, parasites expressing reporter genes have served as a valuable tool. For many years, our laboratory has been using a *Leishmania amazonensis* expressing the Green Fluorescent Protein (GFP), here named La-GFP, which has been used for assessment of parasite load for *in vitro* and *in vivo* tests, but not for intravital imaging, due to the autofluorescence in the green spectrum presented by several murine tissues. Back in 2010, it was produced by Professor Herbert Guedes (Guedes, 2010) a red fluorescent expressing *Leishmania amazonensis* (La-RFP) containing the episomal reporter gene mCherry. This work aims to study the La-RFP potential as a tool for biological *in vitro* and *in vivo* tests, including intravital imaging, compared to the La-GFP, which is routinely used by our research group. For the *in vitro* experiments, the following techniques were used: cell culture, murine macrophages infection, Giemsa staining, direct counting on the Neubauer chamber, flow cytometry and fluorescence microscopy. Regarding the *in vivo* tests, BALB/c mice were infected and lesion swelling followed by caliper-based measurements during infection and ultimately the parasite burden was assessed by limiting dilution assay (LDA) and flow cytometry. *In vitro* results showed that in absence of the antibiotic Geneticin (G418 - which both have antibiotic resistance marker) there was no difference between the culture growth rate for both La-GFP and La-RFP. In the presence of increasing concentrations of G418 both the La-GFP and La-RFP were resistant, however, the La -RFP showed a delay in growth rate. The 2000 mg/mL concentration of G418 selected fluorescent parasites (La-GFP: 99%; La-RFP: 82%), moreover, La-GFP fluorescence intensity was 10 times greater than La-RFP. Fluorescent microscopy of promastigotes also showed that the La-GFP fluorescence intensity has increased relative to La-RFP. About the vector stability test, the La-GFP was also better than the La -RFP, managing to keep 60 % of the fluorescent population on the twentieth day of culture versus 5 % of La-RFP. There was no difference between the percentage of infected macrophages for the 3 subtypes of the parasite, however the La-GFP and La-RFP were slightly less infective compared to wild *L. amazonensis* (La-WT) in the amastigote/macrophage relation. Intracellular amastigotes had 30% reduction in fluorescence intensity for the two fluorescent subtypes. As for infectivity *in vivo*, there was no difference between the La-GFP and La-RFP, nevertheless both were less infectious than La-WT. We conclude that the La-RFP is not suitable for its use as a fluorescent quantitative tool either for *in vivo* imaging, since its fluorescent is not stable and less bright than La-GFP. Moreover, we conclude that the La-GFP present in the laboratory is still the best tool for our methods applied, since its fluorescence is more intense and stable than the La - RFP.

RELAÇÃO DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA	PÁGINA
Figura 1: Aspectos clínicos da infecção por <i>Leishmania</i>	17
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Leishmania SP</i>	18
Figura 3: Distribuição geográfica mundial da leishmaniose cutânea	19
Figura 4: Mapa de restrição para pXG-GFP	29
Figura 5: Espectro de excitação e emissão da proteína GFP	29
Figura 6: Mapa de restrição para OPB2-pTEX-RED	30
Figura 7: Espectro de excitação e emissão da proteína <i>mCherry</i>	30
Figura 8: Avaliação da resistência à G418 conforme contagem em câmara de Neubauer	39
Figura 9: Avaliação da resistência à G418 conforme contagem em câmara de Neubauer	40
Figura 10: Intensidade de fluorescência dos parasitos selecionados com G418	41/42
Figura 11: Imageamento dos parasitos transfectados após seleção com G418.	43
Figura 12: Curva de crescimento da La-GFP e La-RFP pré-selecionadas com G418	44
Figura 13: Fluorescência dos parasitos em culturas sucessivas	45
Figura 14: Infectividade dos parasitos <i>in vitro</i>	46/47
Figura 15: Fluorescência dos macrófagos infectados	48/49
Figura 16: Infecção de camundongos com os três subtipos de <i>Leishmania</i>	50/51

RELAÇÃO DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AmB	Anfotericina B
BFP	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
DHFR-TS	Diidrofolato redutase – timidilato sintase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfoxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FACS	<i>Flow Activated Cell Sorter</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G418	Geneticina
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HIFCS	<i>Heat-Inactivated Fecal Calf Serum</i>
HIV	<i>Human Immuno-deficiency Virus</i>
La-GFP	<i>Leishmania amazonensis-Green Fluorescent Protein</i>
La-RFP	<i>Leishmania amazonensis-Red Fluorescent Protein</i>
La-WT	<i>Leishmania amazonensis-Wild Type</i>
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LM	Leishmaniose de Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
mRFP	<i>Monomeric Red Fluorescent Protein</i>
NEO	Neomicina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPB2	Oligopeptidase B2
PBS	<i>Phosphate Saline Buffer</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PKDL	<i>Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis</i>

RFP

Red Fluorescent Protein

SSC

Side Scatter

YFP

Yellow Fluorescent Protein

SUMÁRIO

RESUMO	8
Introdução	15
1. As leishmanioses	16
2. Tratamento das leishmanioses	20
3. Métodos de avaliação da carga parasitária	21
3.1. Métodos convencionais	21
3.2. Novas metodologias utilizando genes repórteres	22
3.3. Genes repórteres fluorescentes	23
3.4. Genes repórteres fluorescentes em <i>Leishmania sp</i>	24
4. Objetivo Geral	27
4.1. Objetivos Específicos	27
5. Materiais e métodos	29
5.1. Parasitos	29
5.2. Animais	31
5.3. Experimentos <i>in vitro</i>	32
5.3.1. Isolamento, seleção e análise das <i>Leishmania</i> fluorescentes	32
5.3.1.1. Isolamento dos parasitos	32
5.3.1.2. Seleção e análise dos parasitos fluorescentes	32
5.3.1.3. Congelamento dos parasitos fluorescentes	33
5.3.2. Estabilidade dos plasmídios <i>in vitro</i>	33
5.3.2 Taxa de crescimento	33
5.3.3. Obtenção de macrófagos peritoneais	34
5.3.4. Teste de infectividade em macrófagos	34
5.4. Experimentos <i>in vivo</i>	35
5.4.1. Infecção de camundongos com os três subtipos de <i>Leishmania amazonensis</i>	35
5.4.2. Avaliação da carga parasitária <i>in vivo</i> por análise da diluição limitante (LDA)	35
5.4.3. Estabilidade dos plasmídios <i>in vivo</i>	36
5.5. Análise Estatística	36

6. Resultados	38
6.1. Isolamento, seleção e análise das <i>Leishmanias</i> fluorescentes La-GFP e La-RFP	38
6.1.1. Avaliação de resistência à G418	38
6.1.2. Análise da intensidade de fluorescência dos parasitas selecionados com G418	41
7. Taxa de crescimento dos parasitos pré-selecionados com G418	45
8. Estabilidade dos plasmídios dos parasitos pré-selecionados com G418	46
9. Infectividade <i>in vitro</i>	47
9.1. Coloração com Giemsa	47
9.2. Citofluorimetria de fluxo	48
10. Infectividade <i>in vivo</i>	51
11. Discussão	54
12. Conclusões parciais	61
12.1. Conclusão geral	62
13. Referências	64

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. As leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças de transmissão vetorial que tem como agentes causadores protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, no qual existem dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* que se subdividem em mais de 20 espécies. Elas se caracterizam pelo parasitismo de células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos e monócitos) da derme, mucosa e órgãos internos como baço, fígado e medula óssea (BUFFET, 2008).

Dependendo da espécie do parasito envolvida e do estado imunológico do paciente, dois tipos de formas clínicas das leishmanioses podem se manifestar (Figura 1): a Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). A forma tegumentar pode apresentar diferentes manifestações: leishmaniose cutânea localizada (LCL), caracterizada por uma ou mais feridas localizadas de bordos altos (COUTINHO *et al.*, 1981); leishmaniose de mucosa (LM), produzindo mutilações na mucosa orofaríngea pela ativação do sistema imune e baixa carga parasitária; a leishmaniose cutânea difusa (LCD), com lesões não ulceradas espalhadas pela pele, proveniente de uma resposta imune anérgica e alta carga parasitária (DESJEUX, 2004). Na Índia e Sudão há ainda a ocorrência de leishmaniose cutânea pós-kalazar (PKDL – *Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis*), que se caracteriza por lesões cutâneas que se desenvolvem após o tratamento da LV causada por *Leishmania donovani* (SALOTRA e SINGH, 2006).

Os agentes etiológicos variam com a localização geográfica e foram divididos, classicamente, em síndromes do Velho Mundo (Ásia, África, Europa e Oriente Médio) e do Novo Mundo (Américas) (STRAZZULLA *et al.*, 2013). Em regiões da África, Ásia e Europa as espécies *L. major* e *L. tropica* são predominantes e estão envolvidas em lesões da LCL. No leste da África a *L. aethiopica* também pode desenvolver LM e LCD, além da LCL (AMEEN, 2010). Nas Américas há maior variabilidade de espécies. As principais espécies causadoras da LCL são a *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. A *L. amazonensis* também é causadora da LCD, e a LM está associada à *L. braziliensis*, e com menos frequência, *L. panamensis* (MINODIER e PAROLA, 2007).

A LV ou calazar, como também é conhecida, é o tipo mais agressivo da doença, e tem como espécies causadoras *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo (BUFFET, 2008). No Novo Mundo, a *L. infantum* é denominada *L. chagasi* (MAURICIO *et al.*, 2000). Há tropismo por órgãos importantes como, baço, medula óssea e fígado. Manifestações clínicas envolvem, tipicamente, febre prolongada, perda de peso, hepatomegalia e esplenomegalia, anemia e perda de apetite (KUMAR & NYLÉN, 2012). A figura 1 mostra os aspectos clínicos característicos das diferentes infecções por *Leishmania*.

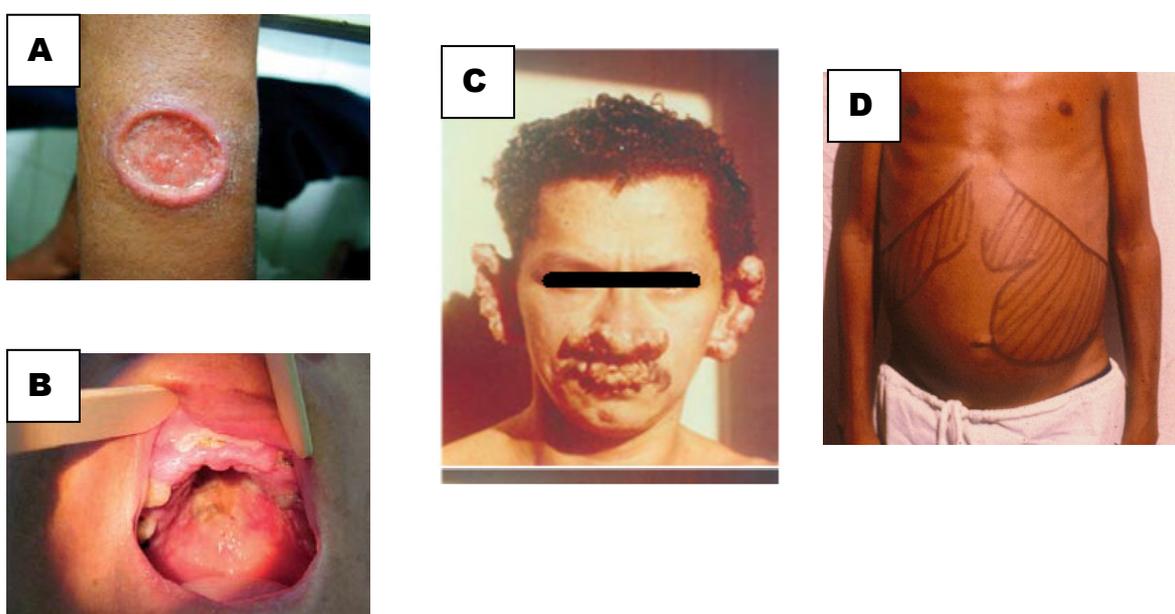


Figura 1: Aspectos clínicos da infecção por *Leishmania*. (A) LCL; (B) LM; (C) LCD e (D) LV. Adaptado de “Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana”, Ministério da Saúde, 2007.

O parasito é transmitido para o hospedeiro através da fêmea de um díptero nematocera (*Phlebotomus sp.* no Velho Mundo, *Lutzomyia sp.* no Novo Mundo) no momento do repasto sanguíneo. Aproximadamente, 30 espécies destes gêneros são vetores competentes para a doença (STRAZZULLA *et al.*, 2013). Estes insetos, de tamanho menor que mosquitos tais como *Culex*, *Aedes* ou *Anopheles*, podem atravessar os mosquiteiros comuns. Possuem hábitos crepusculares, sendo neste período que procuram alimento. Sua picada pode passar despercebida ou desaparecer rapidamente, dificultando o diagnóstico da leishmaniose (BUFFET, 2008). O ciclo biológico do parasito começa quando, ao fazer o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, a fêmea do inseto adquire formas amastigotas do parasito

(Figura 2). Estas formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas flageladas no tubo digestivo do inseto, onde se multiplicam e amadurecem para a forma metacíclica infectante. No repasto sanguíneo seguinte no hospedeiro vertebrado, formas promastigotas infectantes metacíclicas são inoculadas no hospedeiro. Macrófagos da pele fagocitam os parasitos induzindo o aparecimento de lesões cutâneas (espécies dermatrópicas como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) ou após infecção cutânea, migram para órgãos interiores ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (espécies viscerotrópicas como *L. donovani* e *L. chagasi*) (KUMAR & NYLÉN, 2012).

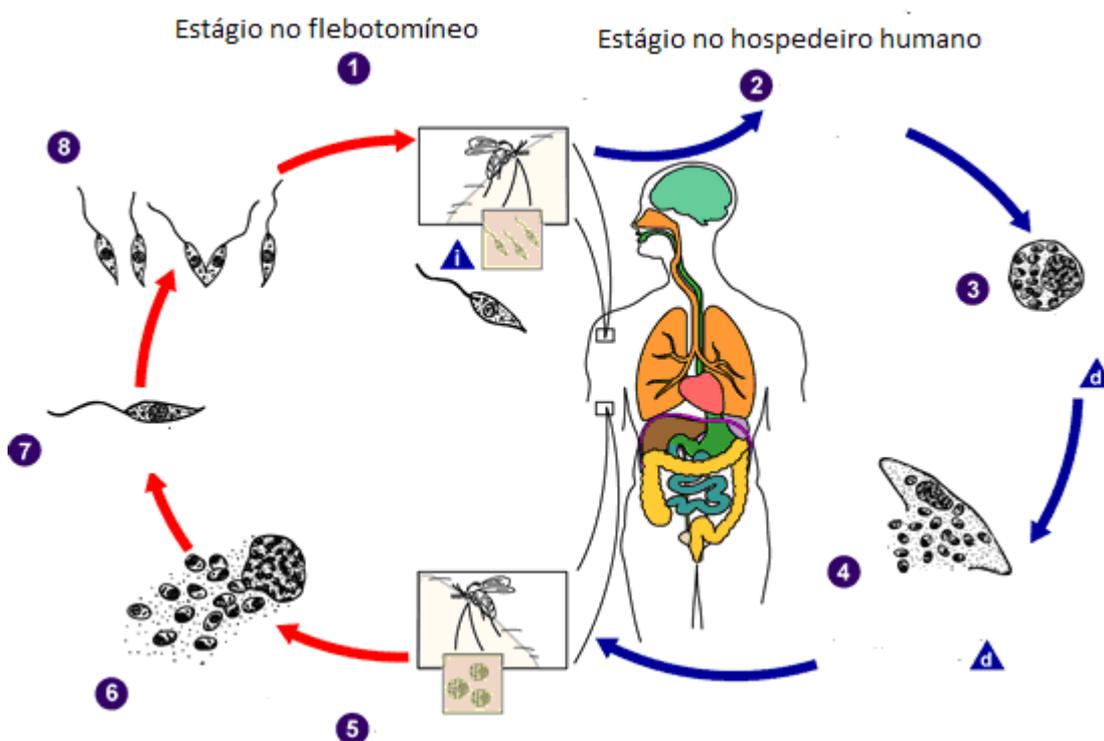


Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania sp.* A leishmaniose é transmitida através da picada da fêmea do flebotomíneo infectada. Elas injetam os parasitas na fase promastigota metacíclica (fase infectante) através de sua probócite durante o repasto sanguíneo. ①. Estas promastigotas, por sua vez, são fagocitadas por macrófagos ② e outros tipos de células mononucleares fagocíticas. Promastigotas diferenciam-se em amastigotas no vacúolo parasitóforo ③, onde crescem e se multiplicam até a lise celular, liberando novas formas amastigotas para o meio extracelular infectando novas células adjacentes ④. Insetos fêmeas ingerem macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo. (⑤, ⑥). Nos insetos fêmeas, formas amastigotas diferenciam-se em formas promastigotas no intestino ⑦ e então migram para a probócite ⑧. (Adaptado de: <<http://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html>> . Acesso em: 05 out. 2012.

A OMS estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco. Estima-se que de 1 a 2 milhões de novos casos ocorram por todo o mundo, mas apenas 600 mil são registrados. A estimativa é que, aproximadamente, 12 milhões de pessoas sejam afetadas pela doença em 88 países nos quatro continentes (África, Américas, Ásia e Europa) (STRAZZULLA *et al.*, 2013), dos quais 72 são países em desenvolvimento, localizados principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ALAVI-NAINI *et al.*, 2012) (Figura 3). No Brasil, o número de óbitos causados por LV vem aumentando, passando de 3,6% em 1994 para 6,7% em 2003, com cerca de 2.700 casos em 2005. Segundo Alvar *et al.* (2012), o Brasil acumulou 38.721 casos de LV entre os anos de 2000 a 2010. Por outro lado, a LT foi registrada em todos os estados brasileiros em 2003 e em 2005 26.525 casos da doença foram registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Do ano de 2006 até 2010, o país registrou 102.108 casos da LT (ALVAR *et al.*, 2012). Com o surgimento da AIDS, as leishmanioses ganharam mais atenção devido aos casos de co-infecção, particularmente com a LV. O paciente imunodeprimido tem agravamento do quadro clínico da leishmaniose e manifestações clínicas atípicas (PAREDES *et al.*, 2013). No ano de 2006, 2,5% dos casos de LV no Brasil estavam co-infectados com HIV (ALVAR *et al.*, 2012).

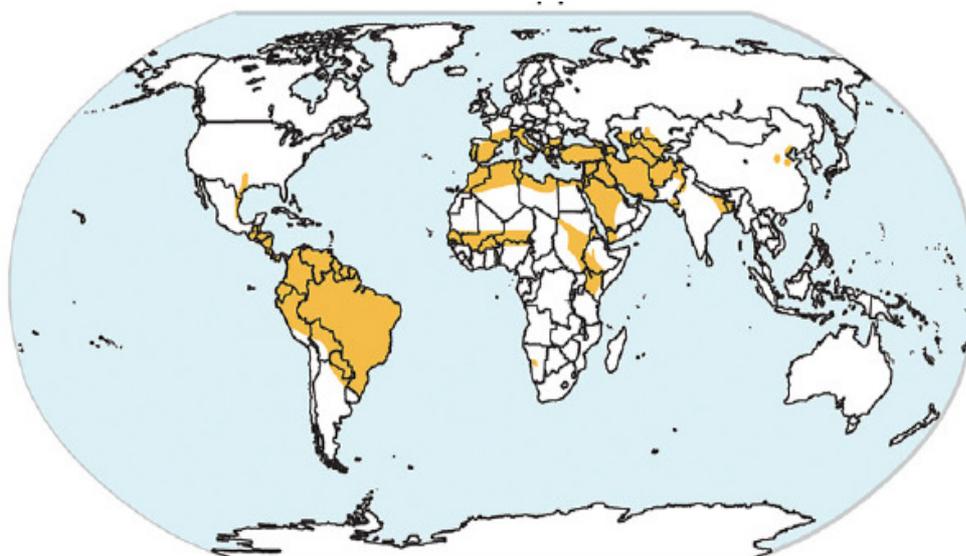


Figura 3: Distribuição geográfica mundial da leishmaniose cutânea. Fonte: Esch *et al.*, 2013.

2. Tratamento das leishmanioses

A leishmaniose ainda é uma doença negligenciada e o seu tratamento quimioterápico tem uma série de inadequações. A primeira linha de tratamento, desenvolvida na década de 40, se baseia em séries de injeções intramusculares com antimoniais pentavalentes que são hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotoxicos, além de não obterem sucesso em alguns casos (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1997). Neste tratamento, são utilizados fármacos como o Glucantime® (antimoniato de meglumina) ou Pentostam® (estiboglunato de sódio). As vias de administração são a parenteral, intramuscular ou intravenosa, as quais causam dor e desconforto no paciente, além da necessidade do deslocamento deste ao estabelecimento de saúde para continuidade da terapêutica. Outras desvantagens que acompanham o tratamento são o alto custo, a necessidade de pessoal especializado e a possível internação do paciente, fatores limitantes para países em desenvolvimento (BERMAN, 2003; MURRAY, 2004).

A segunda linha para o tratamento inclui a anfotericina B (AmB), fármaco mais eficaz disponível, e sua formulação lipossomal (Ambisome®), e ainda a Pentamidina. Estes fármacos são usados para casos resistentes ao tratamento com os fármacos de primeira linha. São alternativas viáveis para o tratamento padrão, porém também apresentam alta toxicidade, eficácia limitada, alto custo e administração por vias invasivas (AMENN, 2010). O Ambisome® é a única formulação lipossomal de AmB registrada no Brasil para o tratamento da LV e LT, quando as demais opções terapêuticas são contra indicadas ou não demonstram sucesso clínico. No entanto, seu uso é limitado devido ao alto custo.

A busca por fármacos antileishmaniose mais eficazes levou ao surgimento de terapias alternativas ao tratamento parenteral. Na Índia e no Sudão, a Miltefosina (hexadecilfosfocolina), desenvolvida originalmente como agente anticâncer, é o único fármaco administrado pela via oral que apresenta eficácia contra LV causada por *L. donovani*. Todavia, sua eficácia limitada tem sido reportada em outros países e para outras formas da doença (BERMAN *et al.*, 2003). A terapia intralesional com antimoniais apresenta sucesso no tratamento da LC e tem por objetivo promover alta concentração de fármacos no local da lesão e redução dos efeitos colaterais sistêmicos. Mas o seu maior inconveniente é a dor e a aplicação deve ser feita por profissionais habilitados (MUNIR *et al.*, 2002). A crioterapia é um tratamento

alternativo não medicamentoso contra as leishmanioses, utilizado em substituição ou associação aos medicamentos de primeira escolha, entretanto não pode ser utilizado na face (ALMUTAIR *et al.*, 2009; RANAWAKA, *et al.*, 2011).

Observando o curso do tratamento da leishmaniose ao longo dos anos, pode-se concluir que há a carência de novos medicamentos, já que o principal fármaco utilizado na terapia (antimonial pentavalente) foi desenvolvido há mais de 60 anos, mesmo com contratempos como a toxicidade. Como promessa para o tratamento tópico, fármacos como a Paromomicina e a Miltefosina foram utilizados para o tratamento tópico da LT e oral para tratar a LV na Ásia respectivamente, no entanto, apresentaram resultados inconsistentes. Adicionalmente, estes fármacos também não foram eficazes para o tratamento da LT no Brasil. Estes regimes terapêuticos não possuem dados de eficácia suficientemente desejáveis e não são recomendados na rotina da prática clínica. O tratamento das leishmanioses ainda pode ser dificultado devido à variabilidade de manifestações clínicas que podem confundir o médico na escolha adequada do tratamento. Outro problema é o desenvolvimento de resistência pelos parasitos aos fármacos utilizados. (ALAVI-NAINI, 2012).

Atualmente, existem duas vacinas comerciais para prevenção da LV canina: a Leishmune[®] e a Leish-Tec[®]. Porém, não existe nenhuma vacina registrada disponível para uso em humanos (ALAVI-NAINI, 2012). Baseado nestes fatores apresentados, muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo se empenham na busca de novos fármacos, novos regimes terapêuticos e candidatos à vacina para as diversas formas da leishmaniose, e para tal usam a redução da carga parasitária como critério de atividade e/ou eficácia.

3. Métodos de avaliação da carga parasitária

3.1. Métodos convencionais

Existem vários métodos utilizados para avaliar as infecções por *Leishmania* em macrófagos ou em tecidos animais. Para ensaios *in vitro* com macrófagos, as formas amastigotas do parasito podem ser visualizadas ao microscópio óptico e contadas através de coloração com Giemsa (ROY *et al.*, 2000). Outra forma de avaliar os macrófagos infectados é por citofluorimetria de fluxo através do aumento da granulocidade (SSC) em seu citoplasma (BERTHO *et al.*, 1992). Para as formas

promastigotas e amastigotas axênicas, temos a contagem direta em Câmara de Neubauer e por contador automático de partículas, além dos ensaios colorimétricos MTT e Alamar Blue, entre outros. Para ensaios *in vivo*, a carga parasitária presente na lesão das patas ou orelhas dos animais experimentais pode ser quantificada através do ensaio de diluição limitante (LDA) após a eutanásia do animal. A medição periódica por paquimetria do tamanho da lesão durante curso da infecção também pode ser utilizada como método qualitativo complementar (DUBE *et al.*, 2009). Para LV, as formas amastigotas presentes nos tecidos podem ser quantificadas por microscopia após coloração com Giemsa do *imprint* dos órgãos infectados. Embora todas estas técnicas representem procedimentos padrões na avaliação da carga parasitária *in vivo* e *in vitro*, elas são extremamente trabalhosas e complexas, consomem grande quantidade de tempo e dependem da experiência e subjetividade do pesquisador (ROY *et al.*, 2000).

3.2. Novas metodologias utilizando genes repórteres

O desenvolvimento de novas terapias para o tratamento das leishmanioses requer novos métodos mais rápidos e sensíveis de avaliação para o *screening* de fármacos e vacinas tanto em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Neste sentido, a utilização de parasitos que expressam genes repórteres tem sido uma valiosa ferramenta facilitando, ao longo dos anos, a compreensão da interação parasito/hospedeiro (CALCO-ÁLVAREZ, *et al.*, 2012).

Os genes repórteres codificam produtos celulares que possuem um fenótipo mensurável e distinto do *background* endógeno da célula. O gene repórter ideal deve ser constitutivamente ausente no hospedeiro, não deve interferir na fisiologia da célula e seu produto deve ser facilmente quantificado por metodologias simples. Basicamente, os genes repórteres podem gerar produtos extracelulares ou intracelulares e sua escolha vai depender da natureza do experimento, do tipo de célula utilizada e do ensaio de detecção apropriado (DUBE *et al.*, 2009).

Dentre os genes repórteres disponíveis para parasitos protozoários podemos citar o β -gal (β -galactosidase), β -lac (β -lactamase), *Luc* (luciferase, proteína repórter bioluminescente) e o *gfp* (*Green Fluorescent Protein*, proteína repórter fluorescente). A β -galactosidase, β -lactamase e luciferase não são marcadores adequados para

quantificação em tempo real e, além disso, necessitam de substrato exógeno para detecção da sua atividade, adicionando mais uma etapa no processo.

3.3. Genes repórteres fluorescentes

Os genes repórteres fluorescentes tiveram uma rápida ascensão como uma valiosa ferramenta de pesquisa. Proteínas naturalmente fluorescentes têm permitido novas metodologias de avaliação em diversos campos da pesquisa. (HOFFMAN, 2008). Recentes avanços no aumento da gama de proteínas fluorescentes disponíveis resultaram no aumento do número de ensaios fluorimétricos e de imagem utilizando estas proteínas marcadoras (DUBE *et al.*, 2009). As proteínas fluorescentes podem ser visualizadas sob exposição de luz no comprimento de onda apropriado. Com isso, podem ser utilizadas em equipamentos que podem tanto analisá-las quantitativamente ou qualitativamente. Por exemplo, o espectrofluorímetro quantifica a fluorescência emitida diretamente. Já a citofluorimetria de fluxo (FACS – *Flow Activated Cell Sorter*) pode mensurar a intensidade da fluorescência de cada célula que passa através do seu *laser*, permitindo analisar uma grande população de células e determinar os níveis de expressão gênica. Algumas vantagens da utilização das proteínas repórteres fluorescentes são seu baixo custo, sensibilidade, rapidez, ausência de radioatividade, alta eficiência, baixa toxicidade, não requerimento de substrato enzimático e a não necessidade de permeabilização ou fixação da célula (ROCHA *et al.*, 2012).

Dentre as proteínas fluorescentes, a *Green Fluorescent Protein* (GFP) foi a pioneira na utilização para esses fins. Desde sua descoberta em 1961 pelos pesquisadores Shimomura e Johnson (*apod* SHIMOMURA, 2009), a partir do isolamento do cnidário *Aequorea Victoria*, graças à engenharia genética, a GFP sofreu inúmeros melhoramentos quanto o seu brilho, foto estabilidade, sensibilidade ao pH e síntese protéica, gerando assim uma gama de variantes (COSTA *et al.*, 2011). Outras modificações geraram proteínas fluorescentes emitindo nas regiões do azul (BFP), ciano (CFP) e amarelo (YFP). Uma desvantagem da GFP e seus variantes é seu baixo comprimento de onda de emissão (~510 nm), que se sobrepõe com a autofluorescência de muitos tecidos biológicos. Comprimentos de onda de excitação longos funcionam melhor por se distanciar da autofluorescência dos tecidos biológicos e penetrar mais fundo neles, além de gerarem menos

fototoxicidade. As proteínas fluorescentes vermelhas (*Red Fluorescent Protein* – RFP) cumprem esse papel e são desejadas por conta da necessidade de marcadores vermelhos em experimentos de imagem multicolor. Porém os espectros das regiões do laranja e do vermelho permaneceram impossíveis de serem produzidos a partir de alterações genéticas da GFP (CAMPBELL *et al.* 2002). Felizmente, a descoberta nos últimos anos da DsRed, uma proteína fluorescente laranja isolada de uma espécie de coral (GROSS *et al.*, 2000), duas proteínas fluorescentes vermelhas foram produzidas à partir dela e se destacam entre as proteínas fluorescentes vermelhas: a *mStrawberry* e a *mCherry*. No entanto, a *mCherry* é bem mais estável que *mStrawberry* e é a melhor opção para experimentos de imagem de longa duração (SHANER *et al.*, 2007).

3.4. Genes repórteres fluorescentes em *Leishmania sp.*

Avanços na manipulação genética, como as técnicas de transfecção, permitiram o preparo de *Leishmania* contendo genes-repórteres que expressam proteínas fluorescentes ou bioluminescentes, tais como a GFP e a Luciferase, respectivamente (ROY *et al.*, 2000). A aplicação de técnicas baseadas no uso da fluorescência para quantificação ou imageamento tem permitido aos pesquisadores compreender vários dos processos fundamentais envolvidos na infecção por *Leishmania* em tempo real (MILLINGTON *et al.*, 2010). Sadlova *et al.*, infectaram vetores invertebrados com duas cepas distintas de *L. donovani* expressando proteínas fluorescentes vermelhas (RFP) e verdes (GFP) com o objetivo de avaliar a interação parasito-hospedeiro. Outro grupo de pesquisadores utilizou *L. amazonensis* transfectadas com EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) na infecção de macrófagos para o *screening* de fármacos e avaliou através de citofluorimetria de fluxo (MEHTA *et al.*, 2010).

A utilização de *Leishmania sp*-GFP no monitoramento de ensaios *in vitro* e *in vivo* vem facilitando a quantificação do parasita, pois trata-se de um método rápido e direto. Nosso grupo de pesquisa utiliza essa ferramenta como rotina para o *screening* e eficácia de fármacos e vacinas anti-leishmaniose *in vitro* e na quantificação da carga parasitária *ex vivo* ao final de um experimento por espectrofluorimetria (ROSSI-BERGMANN, *et al.*, 1999). Todavia, novas abordagens se fazem necessárias para maior compreensão da interação entre parasita e hospedeiro durante a infecção *in*

vivo. O uso do imageamento intravital, permite a quantificação da fluorescência expressa pelo parasito transfectado no organismo vivo em tempo real. Por exemplo, Millington *et al.* (2010) e Calco-Ávarez *et al.* (2012) infectaram a pata de camundongos BALB/c com *L. mexicana* e *L. major* (respectivamente) que expressavam a proteína fluorescente vermelha *mCherry* e conseguiram monitorar a progressão da lesão *in vivo* através de imageamento por fluorescência usando o equipamento de imageamento intravital Xenogen IVIS Spectrum. Esta última técnica não é bem aplicada em *Leishmania sp-GFP*, pois os diferentes tecidos do camundongo, como pêlo, pele e tecido sanguíneo possuem autofluorescência em baixos comprimentos de onda que se sobrepõem no espectro do verde, o que interfere na leitura da fluorescência (LANG *et al.*, 2009). Como mencionado anteriormente, as proteínas fluorescentes vermelhas são potencialmente mais distinguíveis dos tecidos vivos por possuírem excitação em comprimento de onda mais longo. Por esta razão, com o objetivo de contar com mais uma ferramenta de pesquisa em nosso laboratório e seu possível uso no imageamento intravital, o Professor Herbert Leonel de Matos Guedes produziu durante o seu Doutorado sanduíche na Universidade de Glasgow (Grã-Bretanha) um subtipo de *L. amazonensis* expressando proteína fluorescente vermelha *mCherry*, aqui denominada La-RFP. Em resumo, promastigotas de *L. amazonensis-WT* em fase logarítmica de crescimento foram transfectadas empregando “Nucleofactor 2 (maxa System, Lonza)” com o plasmídeo pTEX contendo a proteína oligopeptidase B2 fusionada com o gene da *mCherry* (GUEDES, 2010). No entanto, esta *L. amazonensis-RFP* ainda não foi validada como modelo de estudo logo, ela deve ser testada em comparação com os modelos de *L. amazonensis* selvagem (La-WT) e *L. amazonensis-GFP* (La-GFP) utilizados em nosso laboratório, uma vez que a manipulação genética pode interferir na fisiologia do parasita, alterando do perfil de crescimento e infectividade (Pulido *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

4. Objetivo Geral

Comparar a estabilidade e infectividade da nova *Leishmania amazonensis*-RFP (La-RFP) com a *L. amazonensis*-GFP (La-GFP) utilizada rotineiramente no laboratório, a fim de validar o uso desta La-RFP como ferramenta de estudo e avaliar seu potencial uso para imageamento intravital.

4.1. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a sensibilidade das promastigotas de La-RFP e La-GFP ao antibiótico Geneticina (G418) e selecionar parasitos resistentes;
- 2) Avaliar a estabilidade das fluorescências da La-RFP e La-GFP após várias passagens em cultura e suas taxas de crescimento;
- 3) Avaliar a infectividade de promastigotas de La-RFP para macrófagos murinos em comparação com La-GFP e La-WT;
- 4) Avaliar a infectividade de promastigotas de La-RFP para camundongos em comparação com La-GFP e La-WT.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. Materiais e métodos

5.1. Parasitos

5.1.1) *L.amazonensis*-WT (La-WT): Amastigotas selvagens de *Leishmania amazonensis* (*Wild Type*, WT) foram originalmente isoladas em 1975 no Brasil da lesão cutânea de uma paciente com LCD, identificadas como tal e depositadas como cepa MHOM/BR/75/Josefa. Essa cepa tem sido mantida em nosso laboratório alternadamente em camundongos e em cultura em meio 199 (Cultilab) enriquecido com 2% urina humana, 10% soro fetal bovino (HIFCS, Cultilab), penicilina 50 U/mL, estreptomicina 50 µg/mL (Stemcell Technology) e 5 µg/mL de hemina (aqui denominado “meio completo”) a 26°C à partir de amostras conservadas congeladas em nitrogênio líquido em 7,5 % DMSO.

5.1.2) *L.amazonensis*-GFP (La-GFP): Promastigotas de *L. amazonensis*-WT foram anteriormente transfectadas com o gene da proteína verde GFP fusionada com o gene da porção C-terminal da cisteino protease no vetor pXG-GFP` (Figura 4), emitindo fluorescência verde quando exposta à luz ultravioleta (Excitação: 485/22 – Emissão: 510/30 nm – Figura 5) (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1999).

5.1.3) *L.amazonensis*-RFP (La-RFP): Promastigotas de *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/75/Josefa transfectadas com o gene da proteína vermelha *mCherry* (Emissão: 587/20 – Excitação: 610/60 nm – Figura 7) foram preparadas conforme descrito anteriormente (GUEDES, 2010). Em resumo, o gene da enzima de *L. amazonensis* oligopeptidase B2 (OPB2) foi subclonado do plasmídeo pGemT-OPB2 para o plasmídeo pTEX-Red através de clonagem em bactérias *Escherichia coli* DH5 alpha por choque térmico (42°C por 90 segundos). Após seleção dos clones por ampicilina em meio sólido e avaliação por PCR, as colônias positivas foram crescidas em meio líquido. A extração do plasmídeo foi feita por mini-prep (Qiagen), e os plasmídios assim purificados foram sequenciados. Com a confirmação da presença da construção correta OPB2, estes plasmídios foram usados para a transfecção da *L. amazonensis* - WT. Promastigotas (1×10^7) de *L. amazonensis* – WT na fase logarítmica de crescimento foram transfectadas por eletroporação com 10 µg de plasmídeo OPB2-pTEX-Red (Figura 6) empregando o programa U33 do Nucleofactor. Após 18 horas em cultura em meio completo, foram adicionados 100 µg/mL de G418. Após 10 dias em cultura, parasitos com

fluorescência vermelha foram observados na cultura por microscopia de fluorescência. Nesta construção, a proteína fluorescente *mCherry* está fusionada pela região N-terminal do gene da OPB2.

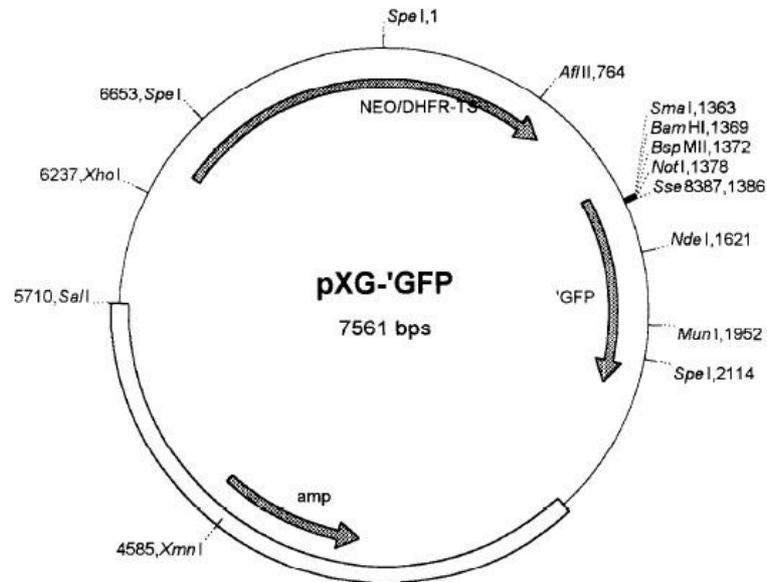


Figura 4: Mapa de restrição para pXG-GFP. A região aberta representa o vetor bacteriano (pSP6-T3), a seta preta representa RNAm direcionado pelo processamento de sinais presentes nas regiões intergênicas de *L. amazonensis*. NEO/DHFR-TS representa o marcador de resistência NEO (neomicina) flanqueado pela região intergênica DHFR-TS (diidrofolato redutase – timidilato sintase), enquanto o 'GFP' representa o cassete de fusão da proteína GFP, flanqueado na margem 5' pela região intergênica DHFR-TS DST (*downstream*) e na margem 3' pela região intergênica 1.7-/ RNAm. 'Amp' (ampicilina) marca a β -lactamase, que só é expressa em *E. coli*. Todos os sítios para as enzimas de restrição foram mostrados (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1999).

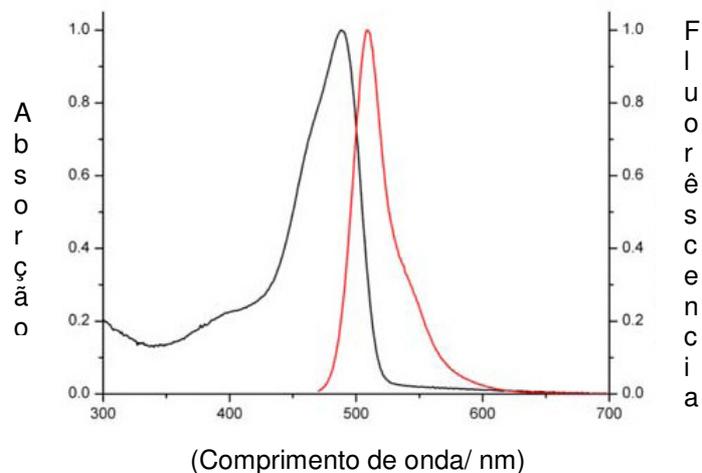


Figura 5: Espectro de excitação e emissão da proteína GFP. A linha negra representa o pico de excitação (485/22 nm) enquanto a linha vermelha o pico de emissão (510/30 nm) (SEEFELDT *et al.*,2007).

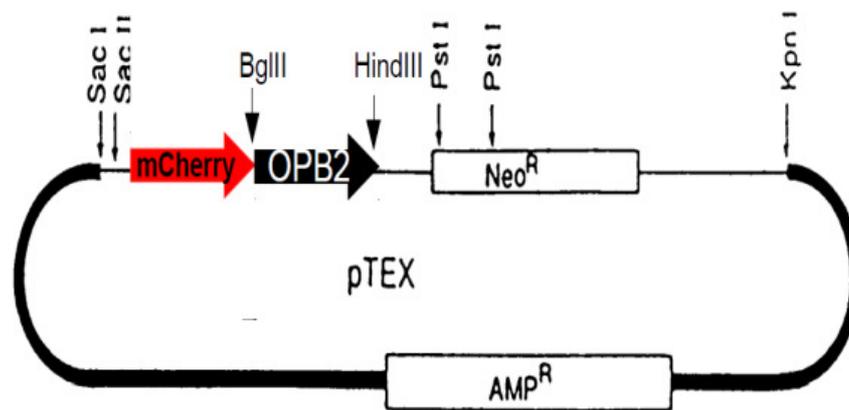


Figura 6: Mapa de restrição para OPB2-pTEX-Red. *mCherry* representa o cassete de fusão da proteína *mCherry* ligada a região N-terminal do gene OPB2 (Oligopeptidase-2) e *neo* representa o marcador de resistência NEO (neomicina). Ambos estão flanqueados na margem 5' da região intergênica GAPDH-*upstream* e 3'-*downstream*. A linha grossa inclui o marcador de resistência à ampicilina (*amp^r*) derivado do plasmídeo bacteriano. Todos os sítios para as enzimas de restrição foram mostrados (KELLY *et al.*, 1992).

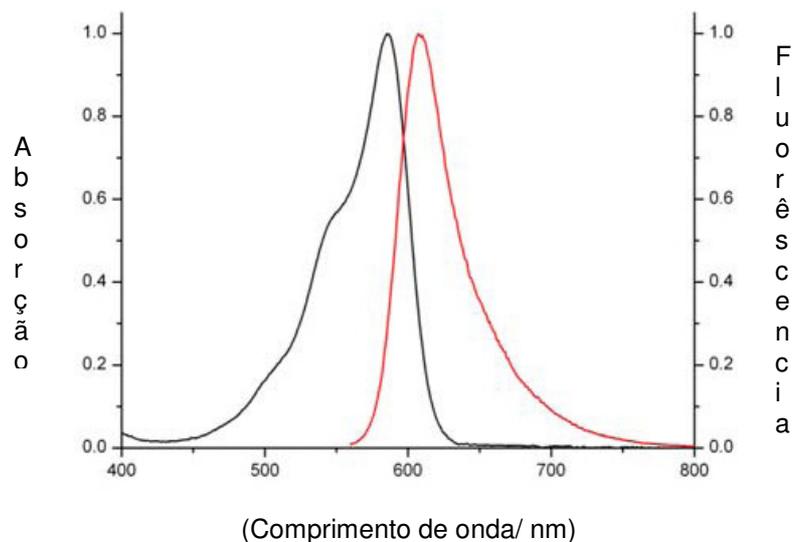


Figura 7: Espectro de excitação e emissão da proteína *mCherry*. A linha negra representa o pico de excitação (578/20 nm) enquanto a linha vermelha o pico de emissão (610/60 nm) (SEEFELDT *et al.*, 2007).

5.2. Animais

Camundongos da linhagem BALB/c originários da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJV) foram mantidos no Biotério de Imunofarmacologia da UFRJ com água filtrada, maravalha autoclavada e ração comercial em mini-isolador Alesco. Os animais utilizados tinham idade em torno de 8 semanas e peso de 20 g. Os

protocolos para utilização dos animais foram aprovados pela Comissão de Avaliação de Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do IBCCF (#IBCCF039).

5.3. Experimentos *in vitro*

5.3.1. Isolamento, seleção, análise e congelamento das *Leishmania* fluorescentes

5.3.1.1. Isolamento dos parasitos

Com o objetivo de gerar um estoque padrão dos parasitos utilizados, 3 camundongos BALB/c foram infectados na orelha direita (cada) com 2×10^6 promastigotas de La-RFP, La-GFP ou La-WT na fase estacionária, em um volume de 10 μ L, após serem lavadas 2 vezes com 13 mL de PBS para retirada do soro. Após 30 dias, foram feitas punções das lesões das orelhas e estas foram colocadas em garrafa de cultura de 25 cm² contendo meio 199 completo em estufa BOD (Panasonic) à 26° C para a diferenciação na forma promastigota.

5.3.1.2. Seleção e análise dos parasitos fluorescentes

Promastigotas de La-GFP e La-RFP obtidas em 1.1.3.1 foram diluídas a 4×10^5 células/mL e dispensadas em triplicatas a 500 μ L/poço em placa de 24 poços em meio 199 completo contendo concentrações crescentes finais de G418 (Geneticina, Sigma-Aldrich) = 0,125, 250, 500, 1000 e 2000 μ g/mL. Durante 8 dias de cultura, a fim de avaliar a sensibilidade à G418, após boa homogeneização, alíquotas de 10 μ L foram retiradas de cada cultura para quantificação em câmara de Neubauer e os resultados expressos graficamente. No oitavo dia, as culturas foram submetidas à citofluorimetria de fluxo (FACScan BD), visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (ZEISS) para análise comparativa da fluorescência. As culturas de La-RFP e La-GFP com o maior percentual de células fluorescentes e intensidade da fluorescência foram selecionadas. Estas foram lavadas uma vez com PBS e expandidas em garrafa de 25 cm² contendo 5 mL de meio completo (sem G418) e, após crescimento, preparadas para congelamento em nitrogênio líquido.

5.3.1.3. Congelamento dos parasitos fluorescentes

Após a expansão dos parasitos selecionados no item anterior, ao atingirem densidade de $\sim 5 \times 10^6/\text{mL}$, os mesmos foram diluídos gentilmente sobre gelo picado a 1:2 em meio completo contendo 20% HIFCS e 15% DMSO (nesta ordem) e distribuídos em alíquotas de 1 mL para congelamento em nitrogênio líquido. Imediatamente após a transferência, as alíquotas foram congeladas gradualmente a -20°C , -70°C finalmente a -196° , em intervalos de 24 h. Para uso, 1 alíquota era retirada e era descongelada em Banho-Maria a 20°C e imediatamente era ressuspensa em meio completo com 10% de HIFCS e colocada em estufa a 26°C .

5.3.2. Estabilidade dos plasmídios *in vitro*

Alíquotas da cultura de La-GFP e La-RFP recém-selecionadas com 2000 μg / mL de G418 foram diluídas a 4×10^5 células/mL e dispensadas em triplicatas em 500 μL /poço em placa de 24 poços em meio 199 completo (sem G418) iniciando em 4×10^5 células/mL, e sucessivamente por 8 vezes sempre que atingisse a fase estacionária. Nestes pontos, 400 μL dos parasitos foram lavados 2 vezes em PBS gelado e ressuspensados a $2 \times 10^5/\text{mL}$ em 400 μL de solução de Isoton (Biotek). Amostras de 200 μL de cada diluição foram submetidas ao equipamento de citofluorimetria de fluxo (equipado com laser de argônio de 488 nm) para análise da fluorescência emitida. As leituras foram feitas nos filtros FL-1 (530/30 nm) e FL-2 (585/42 nm) para La-GFP e La-RFP, respectivamente. As aquisições obtidas foram analisadas pelo *software* WinMDI e expressas graficamente.

5.3.3. Taxa de crescimento

Promastigotas de La-GFP, La-RFP e La-WT foram dispensadas com inóculo inicial de 2×10^5 células/mL em meio 199 completo sem G418. Estas foram contadas diariamente durante 10 dias em Câmara Neubauer para monitorar o tempo para atingir a fase estacionária e seu decaimento. O resultado foi expresso em dias de cultura X quantidade de parasitos.

5.3.4. Obtenção de macrófagos peritoneais

Os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO₂ e após isso, 5 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Cultilab) gelado foram inoculados no peritônio e aspirados após massagem local. As células peritoneais foram contadas e distribuídas em placas de 24 poços na quantidade de 5×10^5 /poço em 50 µL em meio DMEM com 5% HIFCS (atividade anti-amastigota por contagem em lamínulas de vidro + Giemsa) ou 2×10^6 /poço (para citofluorimetria). As células foram mantidas em estufa a 37°C e com 5% CO₂ por 1-2 h para aderência. A placa foi vigorosamente agitada na horizontal antes da retirada das células não aderentes, e os macrófagos assim purificados foram imediatamente infectados com os parasitos (1.3.4).

5.3.5. Teste de infectividade em macrófagos

Foram usados 2 métodos: 1) Quantificação de amastigotas/macrófago em células coradas com Giemsa, e 2) Análise da fluorescência por microscopia e citofluorimetria de fluxo. Os macrófagos obtidos conforme o item anterior foram infectados com 300 µL ($2,5 \times 10^5$ células) das formas promastigotas de La-RFP, La-GFP ou La-WT pré-selecionadas com 2000 µg/mL de G418 recém-descongeladas e na fase estacionária de crescimento no próprio meio de cultura na proporção de 5 parasitas/macrófagos, por 4 h à 34°C em presença de 4 % CO₂ (triplicatas para Giemsa e quadruplicatas para citofluorimetria). Foram cultivados macrófagos não-infectados para diferenciação visual e para autofluorescência. Após isso, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS a 37°C para remoção dos parasitos não-aderentes agitando bem a placa após cada adição, e então incubadas por mais 72 h a 37°C/5% CO₂. As lamínulas foram coradas com Giemsa e o número total de amastigotas por 200 macrófagos totais foram contadas (infectados + não infectados registrados). Os macrófagos infectados e não infectados foram fotografados em luz visível. Os outros poços para fluorescência foram lavados gentilmente uma vez com 1 mL de PBS morno para remover traços de meio e soro que podem interferir com a fluorescência. Após lavagem, foram adicionados 100 µL PBS e fotografados em luz visível e fluorescência (Nikon Eclipse Ti). Os filtros de fluorescência utilizados foram tipo FITC para La-GFP (Ex: 470/40 Em: 515 nm) tipo Texas Red para La-RFP (Ex:

560/20 Em: 630/30). Depois de fotografados, os macrófagos foram tratados com solução de PBS com 5 mM de EDTA (Sigma-Aldrich) por 15 min à 37°C para descolamento das células. Os poços foram rinsados delicadamente com micropipeta para melhor descolamento das células sem alterar sua viabilidade. Em seguida, os macrófagos foram transferidos para microtubos de FACS de 1,1 mL (Axygen) contendo 200 µL de Isoton (Biotek) gelado e mantidos em gelo até serem adquiridos pela citofluorimetria. Como branco, foram utilizados macrófagos infectados com La-WT. Os dados adquiridos foram analisados pelo *software* WinMDI e expressos graficamente.

5.4. Experimentos *in vivo*

5.4.1. Infecção de camundongos com os três subtipos de *Leishmania amazonensis*

Três grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram infectados na orelha direita com cada um dos subtipos *L. amazonensis*. Foram inoculadas 2×10^6 promastigotas dos parasitos na fase estacionária em um volume de 10 µL, após serem lavadas 2 vezes com 13 mL de PBS para retirada do soro. A espessura das orelhas infectadas foi medida com paquímetro (Mitutoyo, Brasil) 2 vezes por semana e o tamanho das lesões expressos pela diferença da espessura das orelhas infectadas menos a das orelhas contralaterais.

5.4.2. Avaliação da carga parasitária *in vivo* por análise da diluição limitante (LDA)

Ao final dos experimentos (~73 dias de infecção) os animais foram eutanasiados, as orelhas infectadas fotografadas antes de serem limpas com álcool 70%, cortadas na base, picotadas com tesoura, e maceradas em peneira de aço inox com 1 mL de PBS, enxaguando-se bem peneira e instrumentos para recolher as células. Após decantação por 5 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para tubos tipo eppendorf rotulados. Foi feita uma pré-diluição dos sobrenadantes clarificados a 1:500, e à partir desta, foram feitas diluições seriadas de 1:3 (50 µL + 100 µL), em meio 199 com 10% de HIFCS, em triplicatas, em placas de 96 poços.

As placas foram incubadas em estufa a 26°C e após 10-14 dias observadas ao microscópio óptico quanto ao crescimento de promastigotas. O número original de amastigotas/orelha foi calculado tomando como referência a última diluição em que foi verificado o crescimento de promastigotas (LIMA *et al.*, 2007).

5.4.3. Estabilidade dos plasmídios *in vivo*

As formas promastigotas referidas em 1.4.2 foram submetidas à citofluorimetria de fluxo para aferição da emissão da fluorescência após 73 dias em tecido animal e 14 dias em cultura. 400 µL das La-RFP, La-GFP e La-WT foram lavadas 2 vezes em PBS gelado e ressuspendidas a 2×10^5 /mL em 400 µL de solução de Isoton (Biotek). Amostras de 200 µL de cada diluição foram submetidas à citofluorimetria de fluxo para análise da fluorescência emitida. As aquisições obtidas foram analisadas pelo *software* WinMDI e expressas graficamente.

5.5. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo método Two-way Anova com pós-teste Bonferroni utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0. Os resultados descritos como significativamente diferentes tiveram $p \leq 0,05$, $p \leq 0,005$ e $p \leq 0,001$.

RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Isolamento, seleção e análise das *Leishmania* fluorescentes La-GFP e La-RFP

6.1.1. Avaliação de resistência à G418

Estoques de promastigotas de La-GFP e La-RFP foram preparados e congelados para uso neste trabalho. Antes disso, foram selecionadas em cultura para alta expressão de fluorescência com o antibiótico G418 para qual possuem o gene de resistência *Neo* (Figura 5 e Figura 6). Os parasitos foram incubados com diferentes concentrações de G418 e o seu crescimento avaliado diariamente por 8 dias em comparação com os parasitos selvagens La-WT. A Figura 8 mostra que ao contrário das La-WT, que não sobreviveram à menor concentração testada de G418 (125 µg/mL) à medida que se aumentava a concentração de G418, houve um retardo no crescimento dos parasitos. Para a La-GFP, a diferença significativa no retardo do crescimento só foi observada a partir da concentração de 500 µg/mL de G418 ($p \leq 0,05$). Para a La-RFP, a diferença no perfil de crescimento parasitário foi observada desde a menor concentração utilizada (125 µg/mL). A Figura 9 mostra a comparação entre o crescimento dos parasitos fluorescentes frente as diferentes concentrações de G418. Exceto pelo controle sem antibiótico, a La-RFP teve menor crescimento que a La-GFP em todas as concentrações, sendo esta diferença mais pronunciada na de 2000 µg/mL (concentração utilizada para seleção dos parasitos fluorescentes).

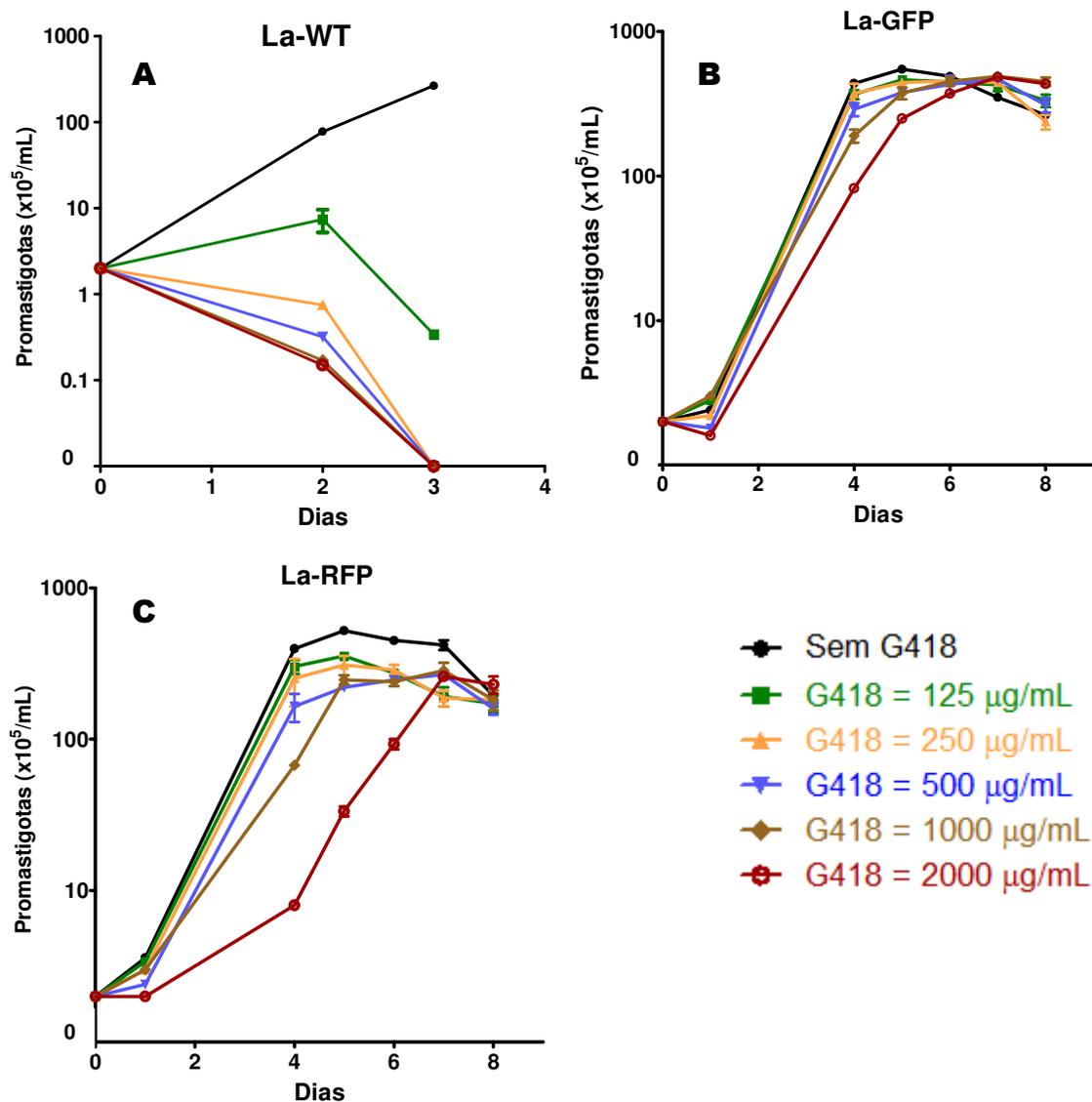


Figura 8: Avaliação da resistência à G418 conforme contagem em câmara de Neubauer. Promastigotas de La-WT (A), La-GFP (B) e La-RFP (C) na concentração de 2×10^5 promastigotas/poço foram cultivadas com as concentrações indicadas de G418 a 26°C em meio M-199 suplementado com 10% de HIFCS por até 8 dias. A quantificação dos parasitos foi medida por contagem direta em câmara de Neubauer. Média \pm SD (n=3) ($p < 0,001$ comparando La-RFP a 2000 $\mu\text{g/mL}$ de G418 com La-GFP nas mesmas condições).

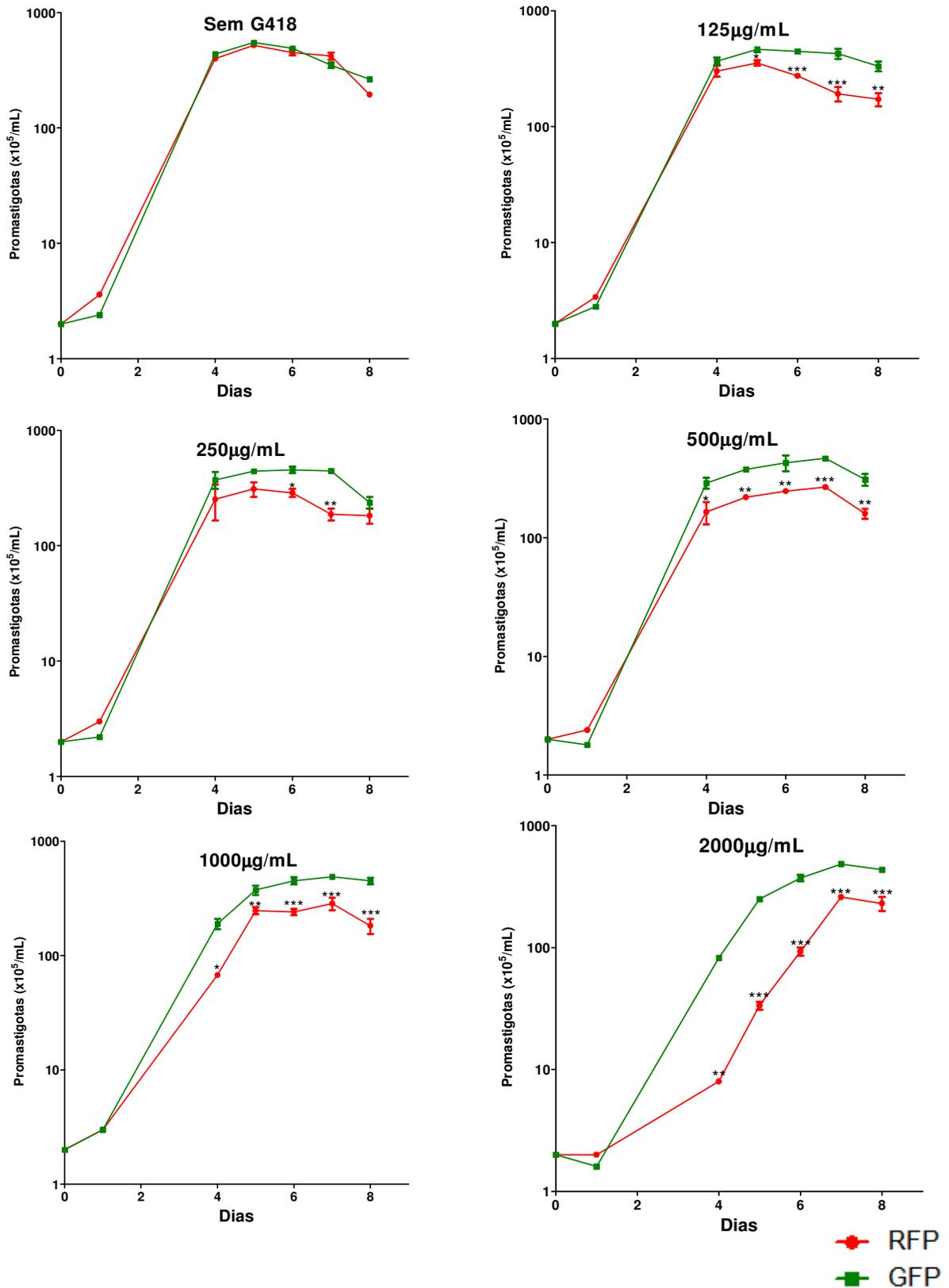
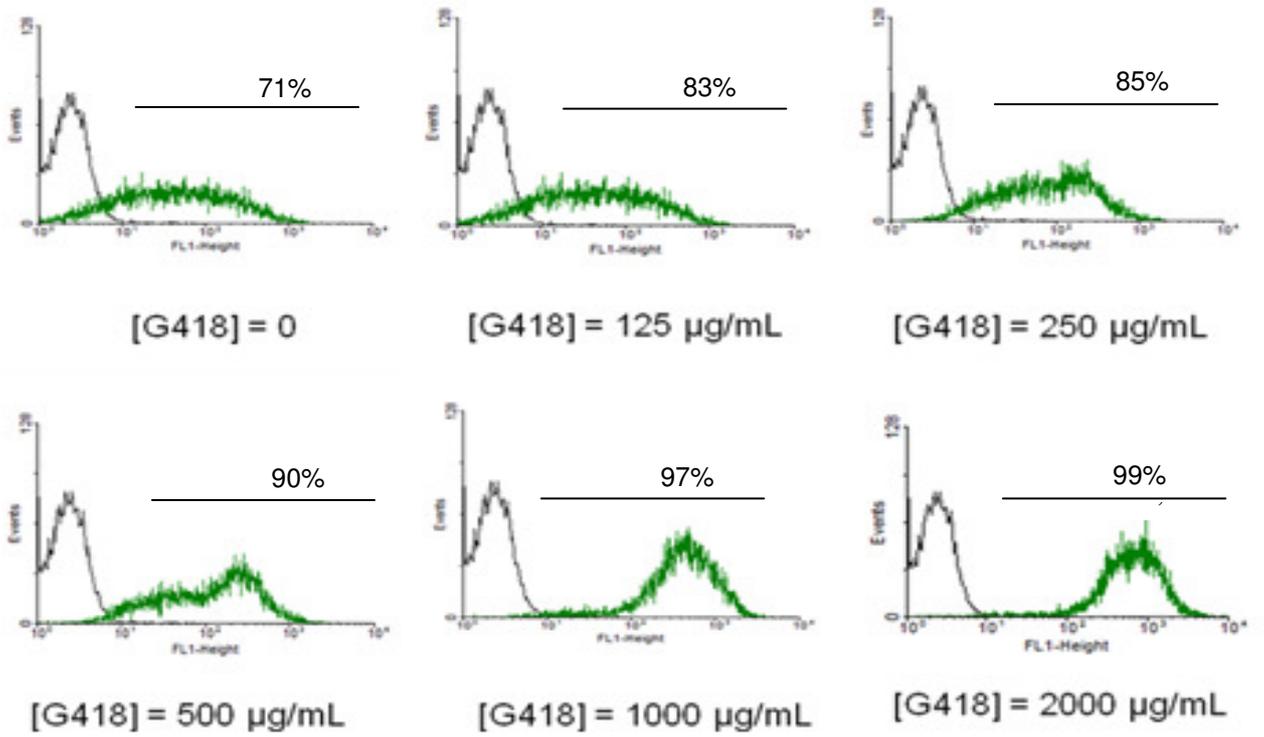
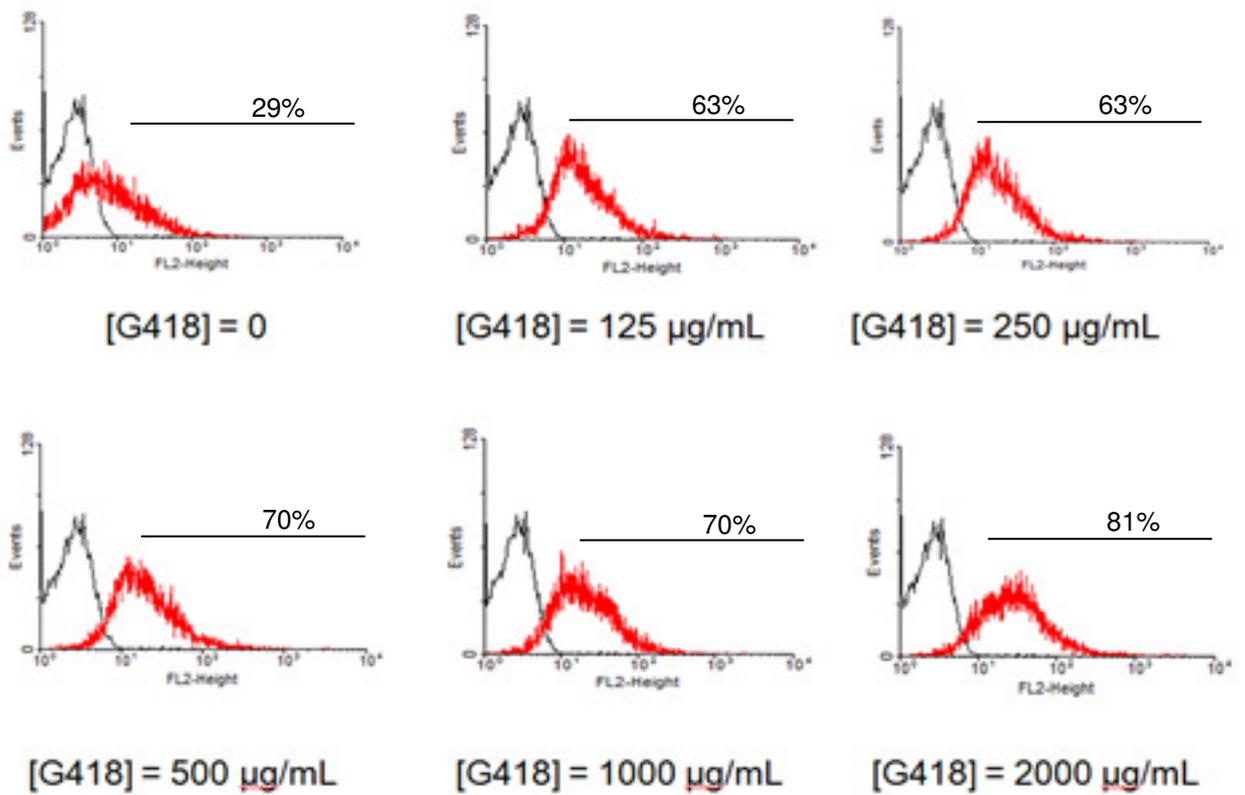


Figura 9: Avaliação da resistência à G418 conforme contagem em câmara de Neubauer. Promastigotas de La-GFP e La-RFP na concentração de 2×10^5 promastigotas/poço foram cultivadas com as concentrações indicadas de G418 a 26°C em meio M-199 suplementado com 10% de HIFCS por até 8 dias. A quantificação dos parasitos foi medida por contagem direta em câmara de Neubauer. Média \pm SD (n=3).

6.1.2. Análise da intensidade de fluorescência dos parasitos selecionados com G418

Os promastigotas de La-GFP e La-RFP cultivados como na Figura 8 acima foram analisados por citofluorimetria de fluxo (FACS) no oitavo dia de cultura. A Figura 9 mostra que o antibiótico foi capaz de selecionar parasitos fluorescentes. Para a La-GFP (Figura 9-A), à medida que a concentração de G418 aumentava maior era o percentual de parasitos fluorescentes assim como a intensidade da fluorescência emitida. O mesmo comportamento não se repetiu com a La-RFP, que manteve percentual de ~70% (Figura 9-B) da população fluorescente e intensidade de fluorescência semelhante nas diferentes concentrações de G418 à partir de 125 µg/mL, exceto na concentração de 2000 µg/mL onde o percentual foi de 81%. A Figura 9-C mostra diferença significativa entre a La-RFP e a La-GFP quanto ao percentual de fluorescência obtido ($p \leq 0,05$). Enquanto a seleção da La-GFP é progressiva com concentrações aumentadas de G418, a resposta da La-RFP foi próxima ao máximo (81% de parasitos fluorescentes) com 125 µg/mL de G418. Portanto a La-RFP é mais sensível à G418 que a La-GFP, já que esta última precisou de 500 µg/mL para atingir 80% de parasitos fluorescentes. A fluorescência também foi detectada através da microscopia em parasitos cultivados com 2000 µg/mL de G418 para maximização da fluorescência (Figura 10). A intensidade da La-GFP pareceu maior que a da La-RFP, como observado na citofluorimetria. Além disso, a fluorescência da La-RFP pareceu estar localizada mais fortemente em um ponto da célula, enquanto a da La-GFP mostrou estar distribuída de forma intensa e homogênea em toda a extensão do parasito, inclusive no flagelo (setas).

A**B**

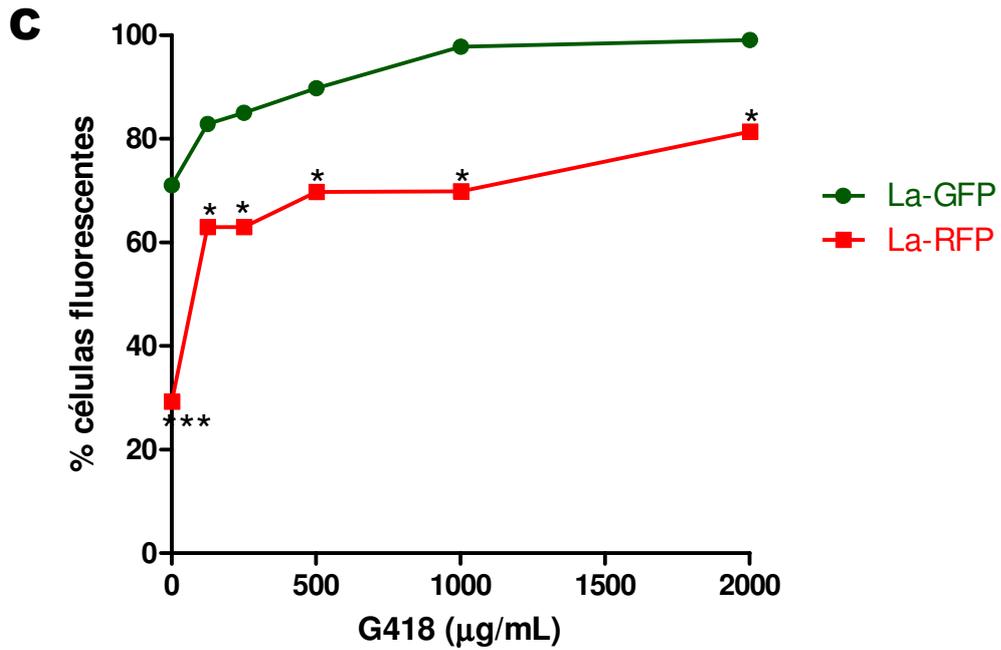


Figura 10: Intensidade de fluorescência dos parasitos selecionados com G418. Promastigotas de La-GFP (A) e La-RFP (B) cultivadas com G418 (0, 125, 250, 500, 1000 ou 2000 µg/mL) foram submetidas ao citômetro de fluxo (FACScan) no oitavo dia de cultura para análise da fluorescência. As aquisições foram feitas utilizando o FACScan (BD) e para as análises o *software* WinMDI.(C) Representação dos percentuais de população fluorescente de A e B. Média ± SD (n=3) (*p<0,05 ***p<0,001).

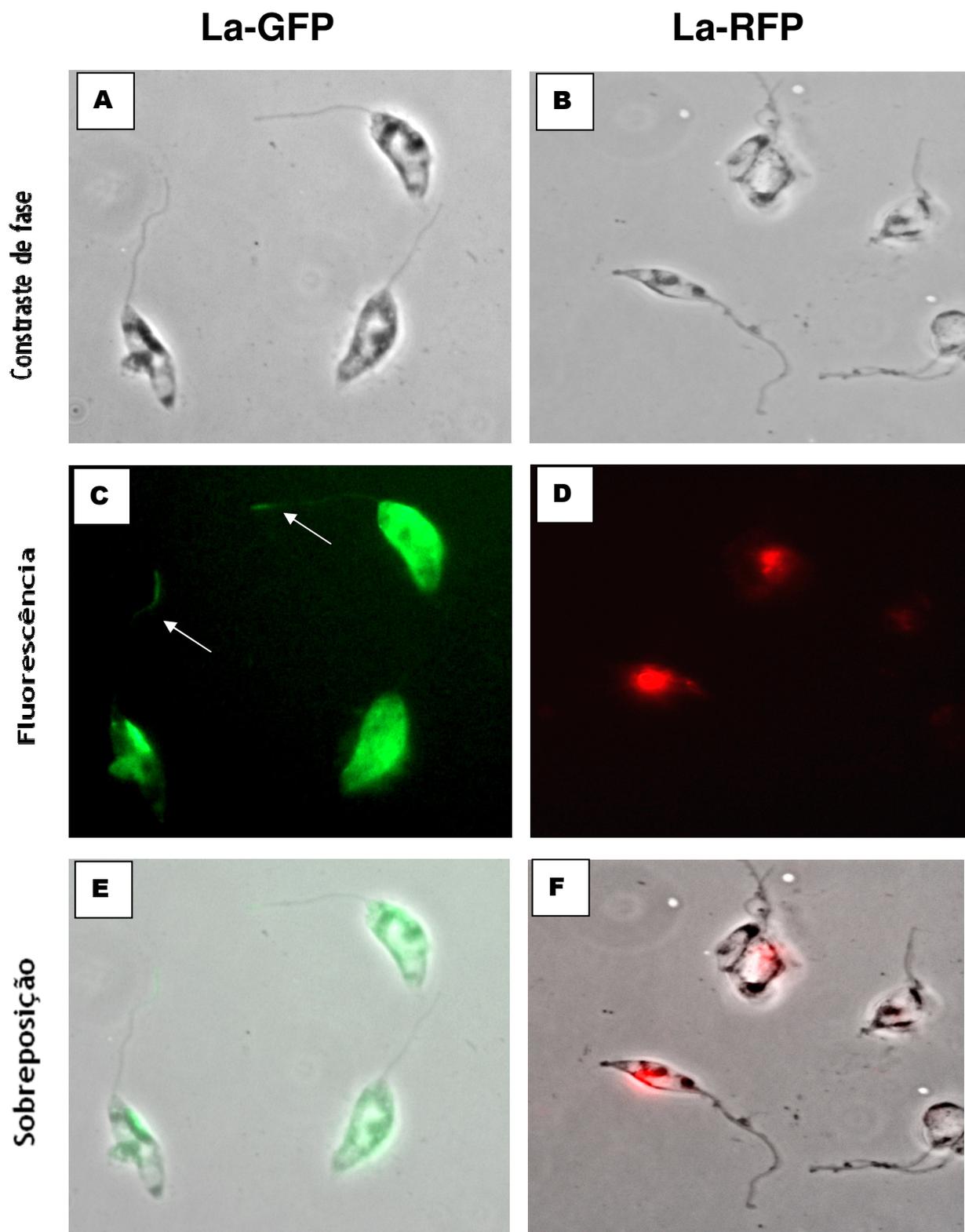


Figura 11: Imageamento dos parasitas transfectados após seleção com G418. Promastigotas vivas, em lamínula com poli-lisina de La-GFP (A, C e E) e La-RFP (B, D e F) foram fotografadas no oitavo dia de cultura com G418 a 2000 µg/mL usando microscópio de fluorescência Zeiss Axiphot com objetiva de 100X de contraste de fase na luz visível (A e B) ou com filtros de 515 nm (C) ou 630/30 nm (D). As imagens A e C foram sobrepostas em E e as B e D foram sobrepostas em F. (Fotos com Zoom de 3 vezes). Representativo de n=3.

7. Taxa de crescimento dos parasitos pré-selecionados com G418

Alíquotas de promastigotas de La-GFP e La-RFP cultivados com 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 por 8 dias foram congeladas em nitrogênio líquido a -198°C . Depois de 7 dias, uma amostra de cada foi descongelada e rapidamente re-cultivadas em meio 199 completo sem G418 e testados quanto a sua taxa de crescimento *in vitro*. A La-WT, já utilizada rotineiramente em nosso laboratório foi tratada da mesma forma. Conforme mostra a Figura 11, não houve diferença significativa na taxa de crescimento dos parasitos fluorescentes entre si, tampouco frente à La-WT na fase logarítmica. No 8º dia de cultura, a taxa de crescimento da La-GFP foi menor que a La-RFP ($p < 0,001$) e La-WT ($p < 0,005$). No 9º dia de cultura, a La-RFP teve crescimento maior que a La-GFP ($p < 0,005$).

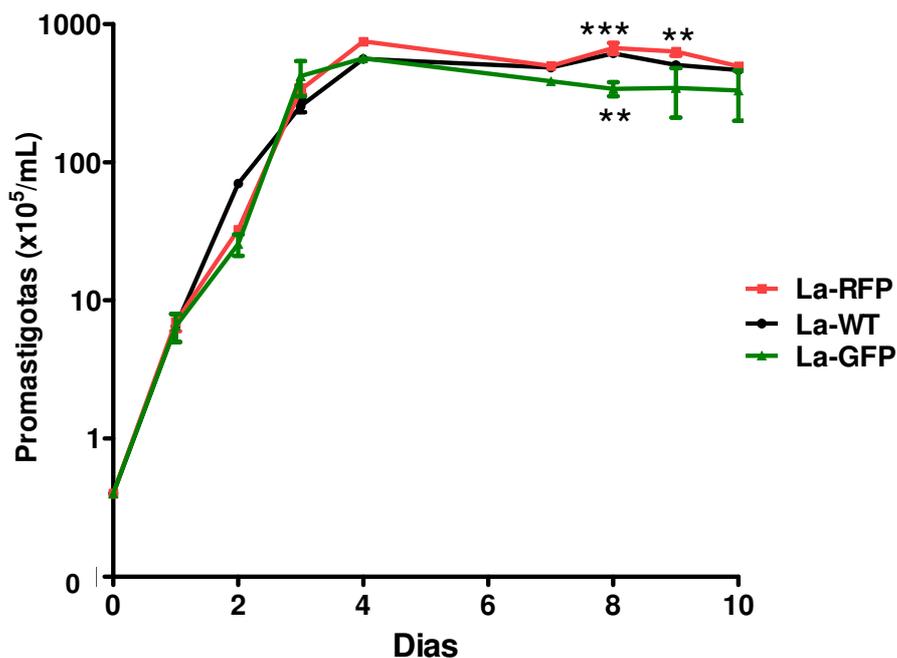


Figura 12: Curva de crescimento da La-GFP e La-RFP pré-selecionadas com G418. Promastigotas de La-GFP e La-RFP pré-selecionadas após 8 dias de cultivo com 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 foram descongeladas e cultivadas a $2 \times 10^5/\text{mL}$ com meio 199 completo + 10% HIFCS sem G418 em garrafas de cultura de 25 cm^2 . O número de parasitas foi contado diariamente durante 10 dias utilizando câmara de Neubauer. Promastigotas de La-WT foram descongeladas e cultivadas da mesma forma. Média \pm SD ($n=3$) (** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$).

8. Estabilidade dos plasmídios dos parasitos pré-selecionados com G418

Após o descongelamento das amostras pré-selecionadas com 2000 µg/mL de G418, verificamos a estabilidade da fluorescência das formas promastigotas da La-GFP e La-RFP *in vitro* na ausência da pressão do antibiótico (G418) (Figura 12). Após 8 passagens durante 38 dias de cultura, ambas La-GFP e La-RFP apresentaram redução no número de parasitos fluorescentes, sendo este decaimento mais rápido com a La-RFP ($p \leq 0,001$). Enquanto a porcentagem de La-GFP fluorescentes caiu pela metade em 23 dias, isso levou apenas 4 dias para La-RFP. Portanto, o plasmidio da La-GFP é mais estável que da La-RFP nos parasitos em cultura.

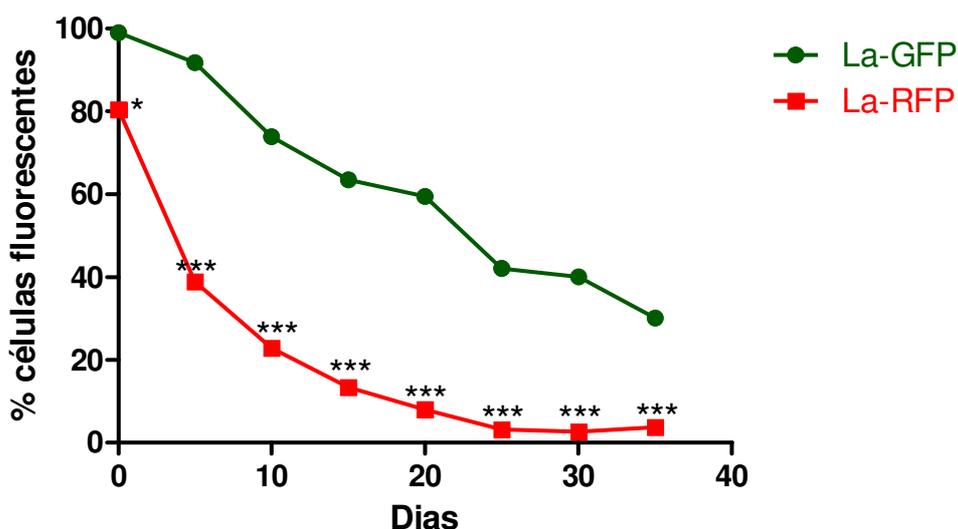


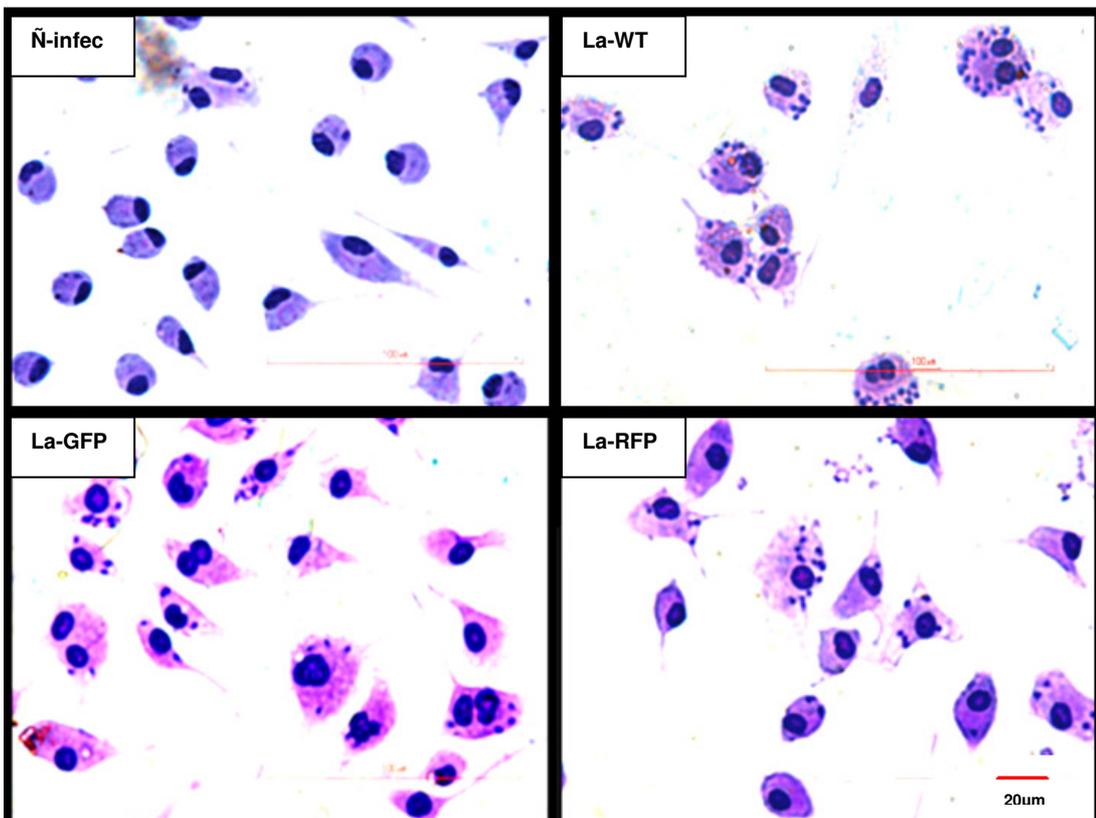
Figura 13: Fluorescência dos parasitos em culturas sucessivas. Promastigotas das La-GFP e La-RFP pré-selecionados com 2000 µg/mL de G418 foram congelados e depois cultivados a 2×10^5 /mL em meio 199 completo sem G418. Foram feitas passagens sucessivas até atingir a fase estacionária num total de 8 passagens. A cada passagem, a fluorescência dos parasitos era aferida por citofluorimetria de fluxo (FACScan BD). As aquisições foram feitas utilizando o FACScan (BD) e para as análises o *software* WinMDI. Média \pm SD (n=3) ($p < 0,001$).

9. Infectividade *in vitro*

9.1. Coloração com Giemsa

A etapa seguinte foi avaliar a infectividade da La-RFP em comparação com a La-GFP e La-WT. Após descongelamento dos parasitos pré-selecionados com 2000 µg/mL de G418, estes foram expandidos em cultura sem G418 por 5 dias e usados para infectar macrófagos peritoneais aderentes em lamínulas a 10:1. Após infecção de 4 horas, os parasitos não internalizados foram removidos e as células infectadas por mais 72 horas quando as lamínulas foram coradas com Giemsa. A Figura 13-A mostra boa coloração dos macrófagos e evidencia claramente a diferença entre macrófagos infectados e não infectados. Não houve diferença significativa no percentual de macrófagos infectados pela La-WT, La-GFP e La-RFP (70%, 63%, 73%) (Figura 13-B). Na quantificação de amastigotas/macrófago, a La-RFP produziu resultado semelhante à La-GFP. Ambas tiveram menos ($p < 0,05$) amastigotas/macrófago que a La-WT (Figura 13-C).

A



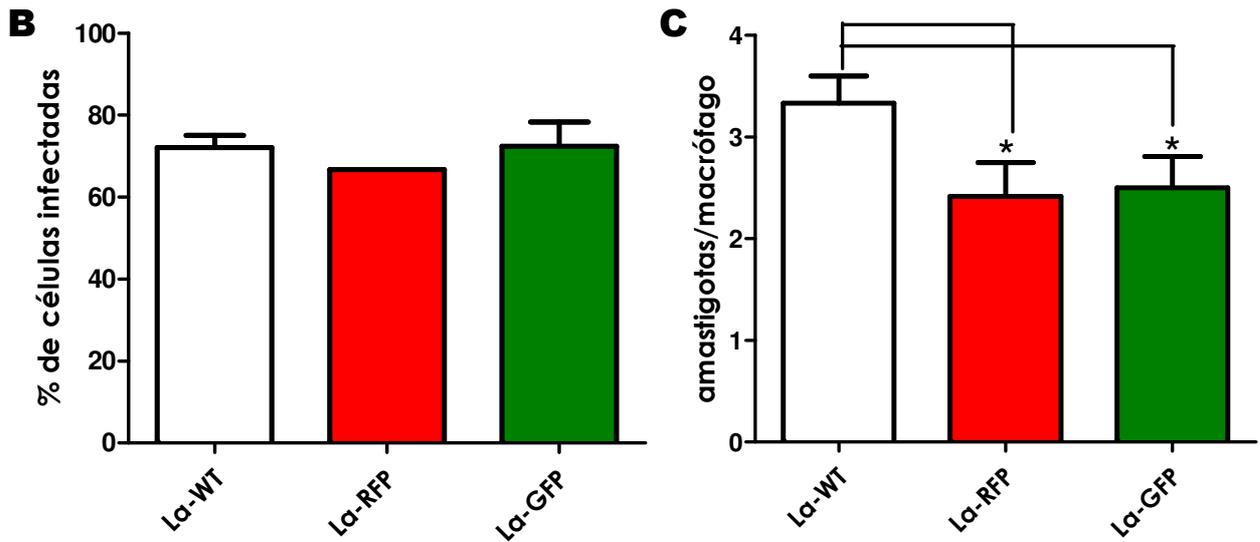
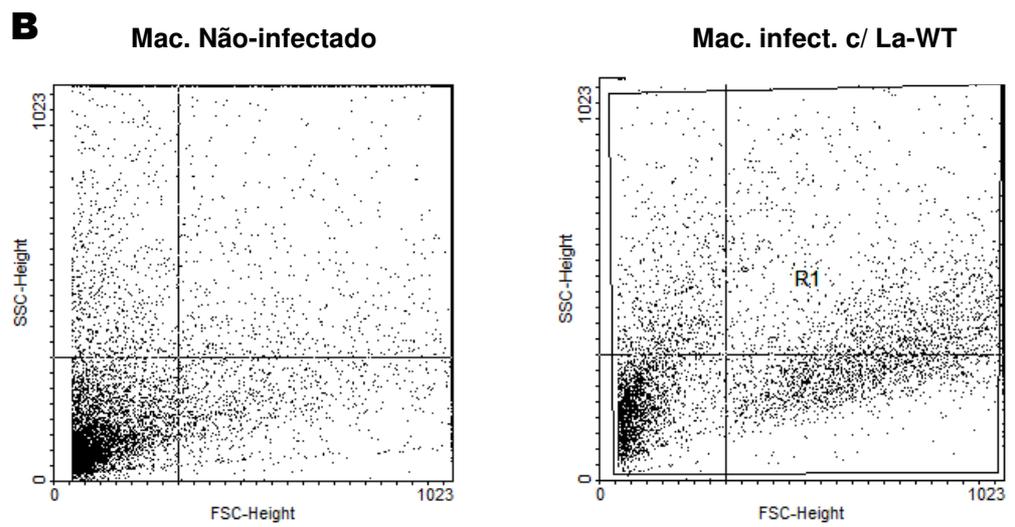
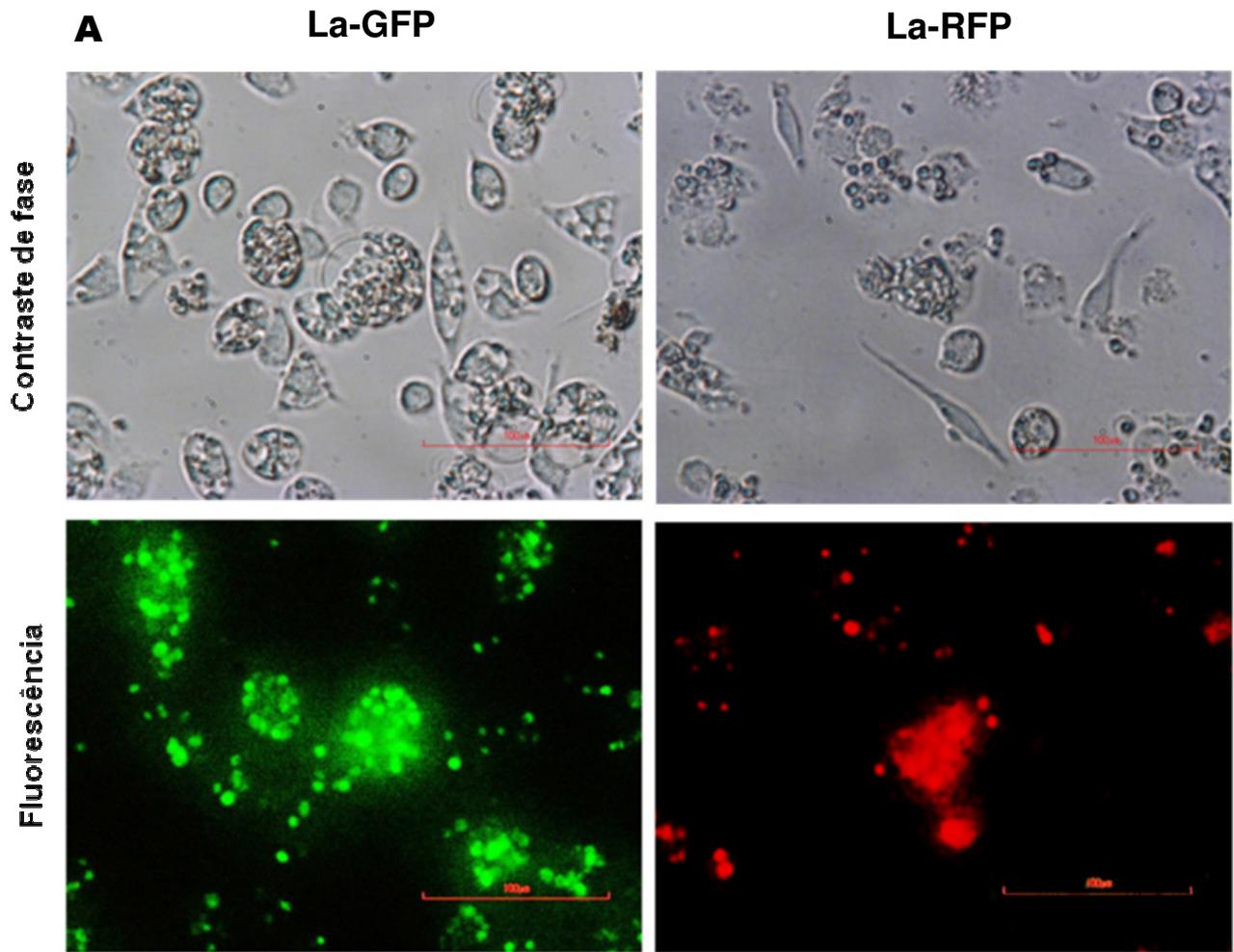


Figura 14: Infectividade dos parasitos *in vitro*. Macrófagos peritoneais murinos foram infectados durante 4 horas com os três subtipos do parasita na proporção 10:1 e corados por Giemsa. (A) Fotografias dos macrófagos infectados ou não cultivados por 72 horas a 37°C com as *Leishmania* indicadas e coradas com Giemsa foram adquiridas com Microscópio Nikon Ti Eclipse. Aumento 400X. (B) Avaliação do percentual de células infectadas para cada subtipo do parasita [n° mac. infectados/mac. totais] $\times 100$. (C) Avaliação do número de amastigotas por macrófagos totais contados [n° amastigotas totais/ n° mac. totais]. A carga parasitária foi avaliada por coloração com Giemsa, seguido de contagem direta de parasitos/macrófagos de pelo menos 200 macrófagos/cultura. Média \pm SD (n=3) (* $p < 0,05$).

9.2. Microscopia de fluorescência e citofluorimetria de fluxo

A infectividade das *Leishmania* também foi avaliada por FACS e microscopia de fluorescência para análise qualitativa da infecção. Foi possível visualizar a infecção dos macrófagos pela microscopia sozinha uma vez que assim como na La-GFP, a La-RFP também manteve estabilidade dos plasmídios após transformação para amastigota. Aparentemente, uma menor porcentagem de amastigotas da La-RFP apresentaram fluorescência quando comparada com a La-GFP (Figura 14-A). Na citofluorimetria de fluxo, pôde-se diferenciar por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) o perfil de distribuição de macrófagos infectados versus não infectados. Assim como a microscopia, a citofluorimetria também foi capaz de discriminar as amastigotas intracelulares de La-GFP e La-RFP (Figura 14-B). Além disso, a análise indicou redução em torno de 30% no percentual de parasitos fluorescentes da forma promastigota para amastigota. A intensidade da fluorescência também teve redução para os dois subtipos do parasito, em maior grau para La-RFP.



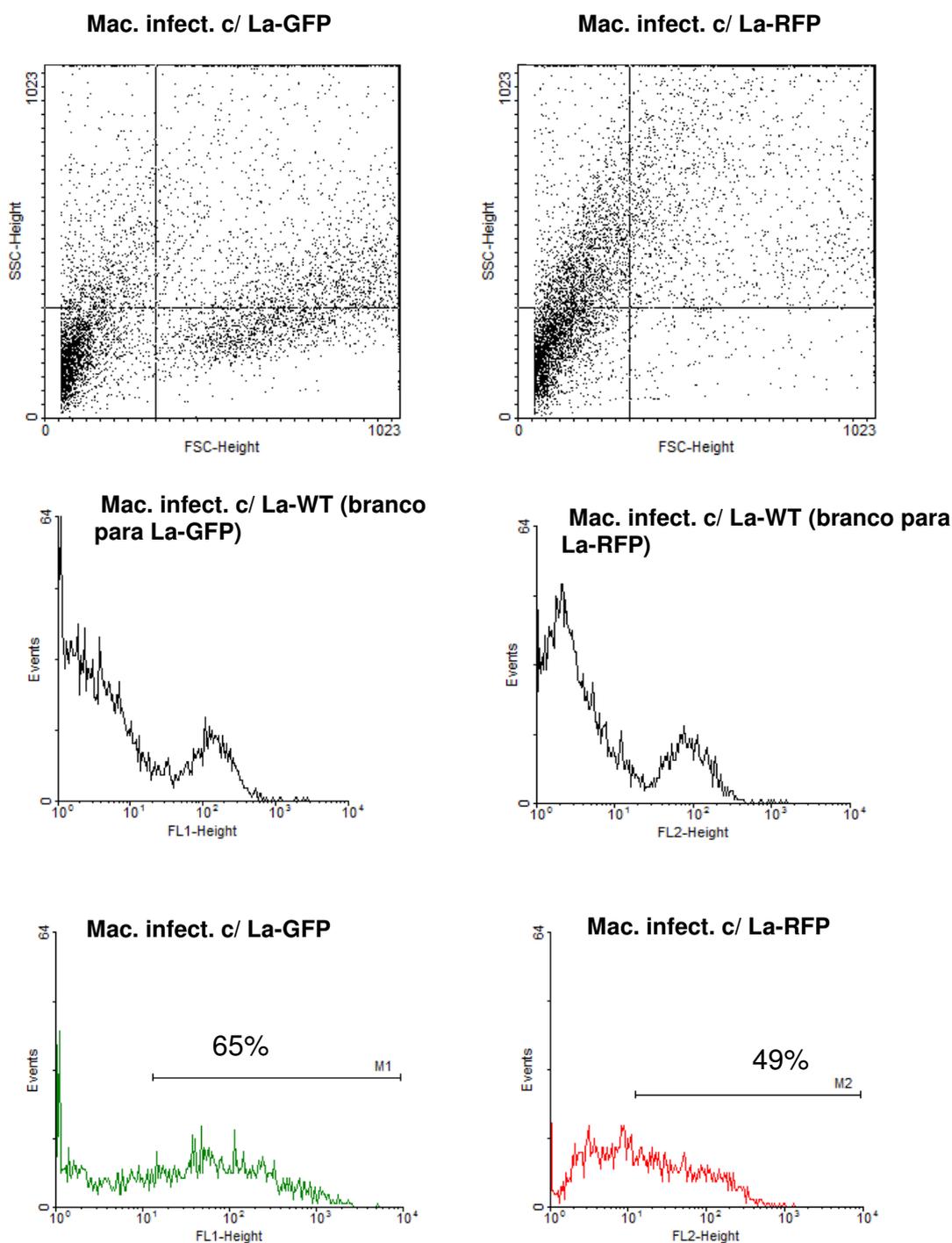
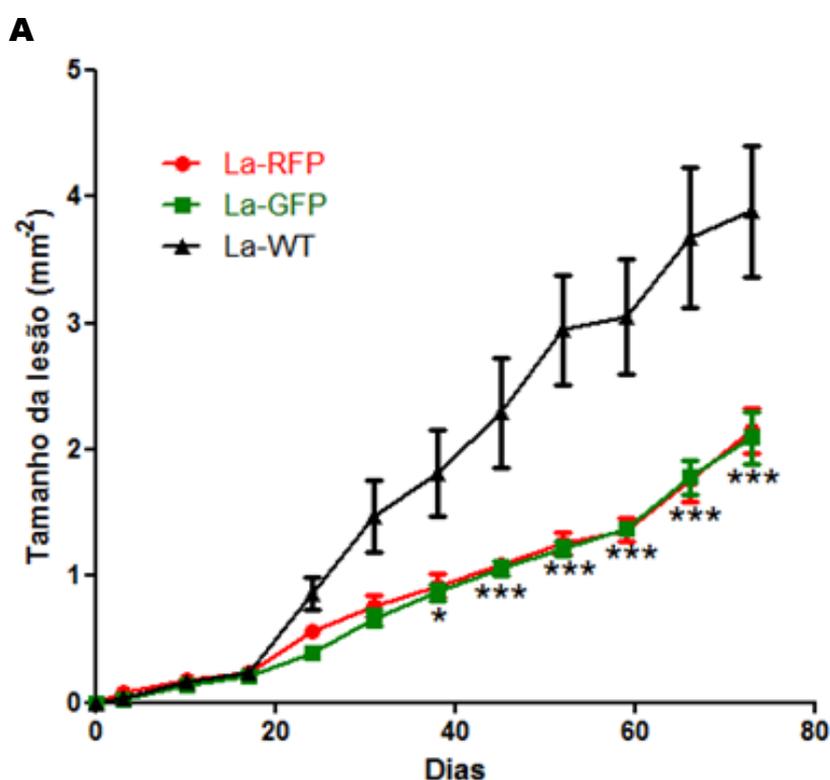


Figura 15: Fluorescência dos macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais murinos (BALB/c) foram infectados com La-GFP e La-RFP como na Figura 13 (anterior) e após 72h de cultura foram destacados com EDTA e submetidos à microscopia de fluorescência (A) e citofluorimetria de fluxo (B). (A) Macrófagos infectados com La-GFP e La-RFP em contraste de fase e em fluorescência mostrando as amastigotas fluorescentes. Imagens adquiridas com Microscópio Nikon Ti Eclipse. Aumento 400X (B) Análise da fluorescência das amastigotas por citofluorimetria de fluxo. As aquisições foram feitas utilizando o FACScan (BD) e para as análises o *software* WinMDI. Dados representativos de n=4.

10. Infectividade *in vivo*

O objetivo do experimento *in vivo* foi avaliar a infectividade da La-RFP frente à La-GFP e à La-WT já utilizados em nosso laboratório em camundongos BALB/c. O monitoramento do crescimento da lesão no curso da infecção (73 dias) mostrou crescimento semelhante entre ambas *Leishmania* fluorescentes, que por sua vez, foram significativamente menores ($P < 0.05$, $P < 0,001$) que a La-WT a partir do dia 38 de infecção (Figura 15-A). A carga parasitária do dia 73 de infecção foi avaliada pelo ensaio de diluição limitante (LDA) (Figura 15-B). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a La-RFP e a La-GFP nas orelhas infectadas, que foi inferior à La-WT, em congruência com o observado no tamanho da lesão. A estabilidade do plasmídeo *in vivo* também foi avaliada ao final do experimento (dia 73) por citofluorimetria de fluxo. Ao longo da infecção, tanto a La-GFP quanto La-RFP tiveram redução no percentual da população fluorescente (~47% e ~7%, respectivamente), e novamente, a La-RFP obteve perda mais pronunciada.



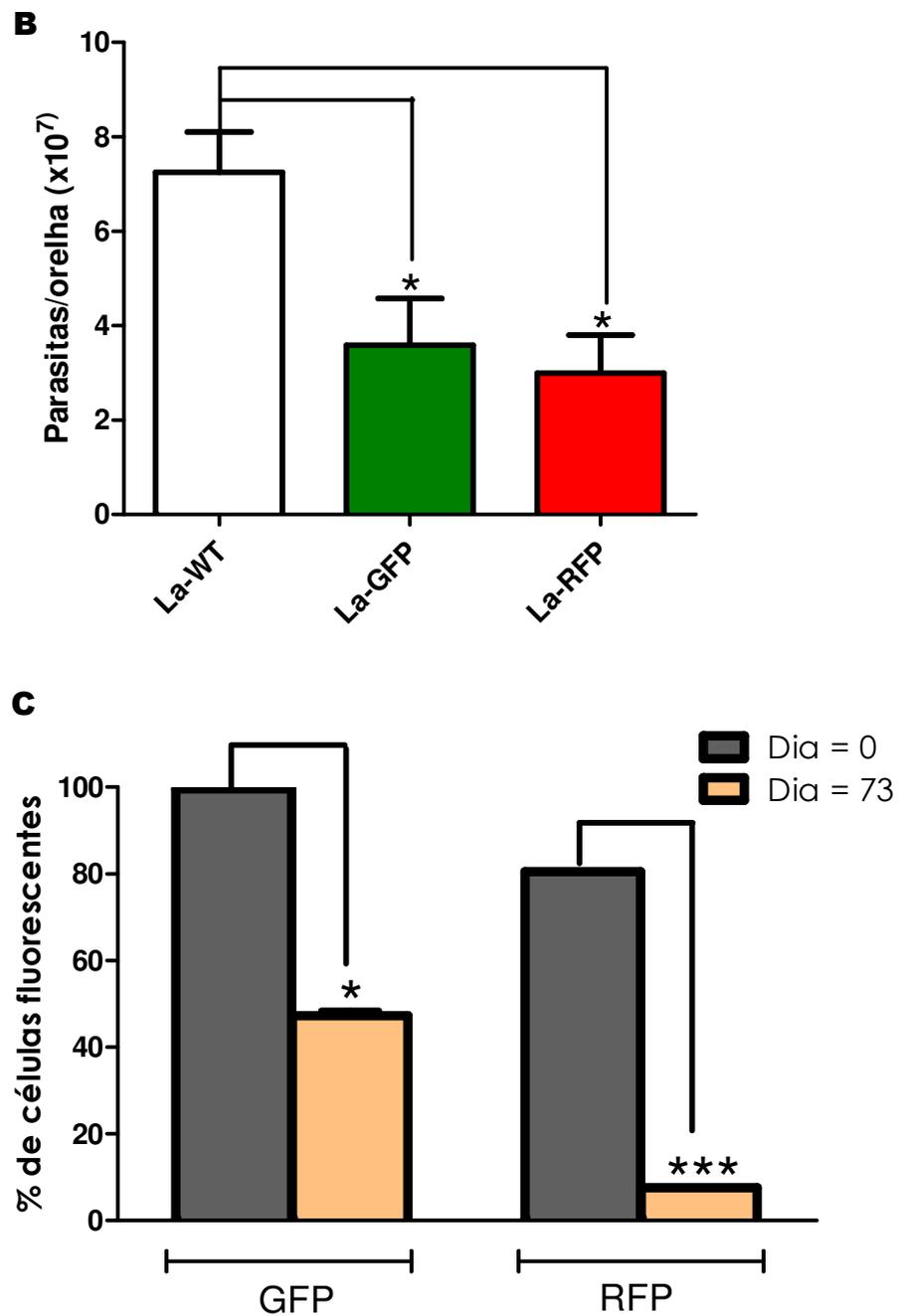


Figura 16: Infecção de camundongos com os três subtipos de *Leishmania*. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha direita com 2×10^6 promastigotas de cada subtipo do parasito. Após 73 dias de infecção, foram eutanasiados. (A) Progressão do tamanho da lesão: houve diferença significativa entre os parasitos fluorescentes em relação à La-WT a partir do dia 38 de infecção; (B) Carga parasitária no dia 73 por ensaio de diluição limitante; (C) Estabilidade da fluorescência por método de citofluorimetria de fluxo (FACScan BD). Média \pm SD (n=5), * P<0.05, ***P<0,001.

DISCUSSÃO

11. Discussão

Na busca por metodologias mais diretas e rápidas, a utilização de genes repórteres se tornou uma ferramenta útil na pesquisa *in vitro* e *in vivo* com parasitos. O avanço na manipulação genética permitiu a inserção desses genes nos parasitos fazendo com que eles fossem capazes de expressar proteínas fluorescentes. Esta habilidade extra auxiliou no avanço de novas formas de quantificação mais rápidas e diretas da carga parasitária *in vitro*, através do uso da fluorimetria e da citofluorimetria. Além disso, técnicas de imageamento também vem ajudando a compreender a interação parasito-célula e parasito-vetor. O imageamento também pode ser utilizado *in vivo* na quantificação da carga parasitária durante o decorrer da infecção sem a necessidade de eutanásia do animal (THALHOFER *et al*, 2010).

Nosso laboratório utiliza em sua rotina uma *L. amazonensis* expressando a proteína verde *Green Fluorescent Protein* (La-GFP) para ensaios de *screening* de fármacos e vacinas. Recentemente, uma La-RFP foi produzida contendo o gene repórter da proteína fluorescente vermelha *mCherry* a partir da mesma La-WT utilizada na construção da La-GFP. O objetivo deste trabalho foi atestar a potencial aplicabilidade dessa nova La-RFP em comparação com a La-GFP e La-WT usadas no laboratório em ensaios *in vitro* e *in vivo*, uma vez que a *mCherry* pode ter melhor detecção que a GFP *in vivo* (CALCO-ÁLVAREZ, *et al.*, 2012; VACCHINA & MORALES, 2014).

Na primeira parte dos estudos *in vitro* dessa dissertação, fizemos uma padronização dos diferentes subtipos de *L. amazonensis* utilizados: os subtipos transfectados com proteínas fluorescentes (La-GFP e La-RFP) e o subtipo selvagem (La-WT). Para isso, infectamos camundongos BALB/c na orelha direita com cada um dos subtipos do parasito. Após 30 dias de infecção fizemos punções das orelhas infectadas e o material recolhido foi posto em cultura em condições adequadas para a diferenciação na forma promastigota. Dessa forma, todos os três subtipos de *L. amazonensis* se encontravam no mesmo patamar de passagem e infectividade. A etapa seguinte consistiu na avaliação da sensibilidade dos parasitos transfectados a diferentes concentrações do antibiótico de seleção Geneticina (G418) e posterior análise dos parasitos recém-selecionados utilizando contagem direta, citofluorimetria de fluxo e microscopia de fluorescência. A seleção mostrou que, à medida que se aumentava as concentrações do antibiótico, havia um retardo no crescimento das culturas em comparação ao controle sem antibiótico (Figura 8). Este retardo foi mais

pronunciado para La-RFP a partir da menor concentração de G418 utilizada (125 µg/mL), enquanto para La-GFP deu-se a partir de 500 µg/mL. O crescimento da La-GFP foi superior ao da La-RFP na concentração de seleção utilizada (2000 µg/mL) indicando maior resistência da La-GFP à G418 em comparação com a La-RFP. As culturas sem a presença de G418 tiveram crescimento semelhante, indicando que a presença do plasmídeo não interfere no seu crescimento *in vitro*, assim como observado no trabalho de Rocha *et al.* (2012). A presença do marcador de resistência para G418 (*Neo*) no vetor plasmidial possibilita a seleção apenas de parasitos transfectados (CLAYTON, 1999). O aumento da concentração do antibiótico na cultura induz o parasito a aumentar o seu número de cópias do plasmídeo, alavancando a expressão da fluorescência do gene repórter integrado (BOLHASSANI *et al.*, 2011). O processo de seleção com 2000 µg/mL de G418 dos parasitos transfectados garantiu a fluorescência de ambas as populações, em maior grau para La-GFP, tanto em intensidade de fluorescência quanto no percentual da população fluorescente (Figura 9). Segundo Shaner *et al.* (2007), a proteína fluorescente *mCherry*, usada na transfecção da La-RFP neste trabalho, possui intensidade de fluorescência 50% menor que a GFP, o que poderia justificar a menor intensidade observada para a La-RFP. A análise por microscopia de contraste de fase mostrou que não há diferenças morfológicas detectáveis entre as formas promastigotas dos dois subtipos fluorescentes do parasito e da La-WT, o que já era esperado conforme outros relatos de Varela *et al.* (2009) e Rocha *et al.* (2012) (Figura 10). Por outro lado, a microscopia de fluorescência revelou diferenças do padrão de distribuição da fluorescência difundida entre a La-GFP e La-RFP (Figura 10). A primeira apresentou fluorescência por toda sua extensão celular, inclusive flagelos, ao passo que a La-RFP pareceu concentrar sua fluorescência pontualmente em compartimentos no interior do seu citoplasma. O plasmídeo presente na La-GFP contém o gene da GFP ligado à porção C-terminal da cisteína protease. Esse domínio não tem papel no endereçamento da proteína ao lisossomo ou a qualquer outro compartimento celular da *Leishmania*, corroborando nossos achados de distribuição da fluorescência por todo o parasito (COSTA-PINTO *et al.*, 2001). Na La-RFP, o plasmídeo contém o gene da *mCherry* ligado à porção N-terminal da serina protease OPB2. Diferentemente do domínio C-terminal, o domínio N-terminal pode estar endereçando a *mCherry* para compartimentos do citoplasma da La-RFP, o que poderia explicar o padrão de fluorescência observado.

Após a padronização e seleção dos parasitas, a segunda etapa dos experimentos *in vitro* foi comparar seus crescimentos em cultura como formas promastigotas, avaliar a estabilidade dos plasmídios também nas formas promastigotas e, finalmente, comparar o perfil de infectividade para macrófagos em relação ao subtipo selvagem. No que diz respeito ao crescimento em cultura, observamos que não houve diferença entre os parasitos transfectados entre si e em relação à La-WT na fase logarítmica do crescimento, indicando que a presença do plasmídio não interfere na replicação *in vitro*, reproduzindo observação de Bandeira (2005) (Figura 11).

A estabilidade da expressão da fluorescência no parasito transfectado é importante para sua aplicação em testes de *screening* e eficácia de fármacos e vacinas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Levando isto em consideração, testamos a estabilidade dos plasmídios das formas promastigotas durante 38 dias ininterruptos de cultura, que equivaleram a 8 passagens dos parasitos (Figura 12). Novamente, a La-GFP mostrou melhor desempenho que a La-RFP. Comparativamente, no dia 20 de cultura (4ª passagem), a La-GFP tinha, aproximadamente, 60% de sua população fluorescente enquanto a La-RFP por volta de 5%. Em nossa rotina laboratorial, não utilizamos *Leishmania* com mais de 4 passagens *in vitro* para evitar possível perda de infectividade (ROY *et al.*, 2000). No entanto, a perda da fluorescência também é um importante critério a ser controlado. Já era esperada a queda na fluorescência devido à ausência da pressão de G418 nas culturas *in vitro* das formas promastigotas e está de acordo com os achados de Costa *et al.*, (2011) também utilizando G418. Pulido *et al.* (2011) também reportaram diminuição da fluorescência na ausência da pressão seletiva da Tunicamicina, outro antibiótico utilizado para seleção de gene repórter de resistência.

Finalmente, a última parte dos estudos *in vitro* consistiu na avaliação da infectividade para macrófagos peritoniais murinos. Foram usados 3 métodos: quantificação de amastigotas/macrófago em células coradas com Giemsa e análise da fluorescência por microscopia e citofluorimetria de fluxo. A contagem direta de amastigotas por coloração de Giemsa (Figura 13-A) não demonstrou diferença significativa no percentual de macrófagos infectados (Figura 13-B) pelos dois subtipos transfectados entre si e em relação à La-WT. No entanto, na relação de amastigotas/macrófago (Figura 13-C), tanto La-GFP e La-RFP tiveram uma discreta redução em relação à La-WT. Com relação ao percentual de macrófagos infectados,

este resultado está de acordo com o observado por Bandeira (2005) e posteriormente por Costa *et al.* (2011) para GFP, assim como relatado por Calco-Álvarez *et al.* (2012) para *mCherry*. Porém, no que diz respeito à quantidade de amastigotas/macrófagos, isto não foi observado em nenhum dos trabalhos mencionados. Este achado pode indicar que a presença do plasmídeo ou da proteína fluorescente interfere na replicação da forma amastigota no interior do macrófago *in vitro*.

A outra parte dos macrófagos infectados foi submetida à citofluorimetria de fluxo e microscopia de fluorescência. A citofluorimetria e a microscopia foram capazes de diferenciar os macrófagos infectados por cada um dos subtipos de *L. amazonensis* transfectadas e selvagem. A citofluorimetria de fluxo conseguiu diferenciar células infectadas de não infectadas através da mudança de perfil de distribuição de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) dos macrófagos, de acordo com Giorgio *et al.* (2000) e Bertho *et al.* (1992). Além disso, discriminou os subtipos do parasito através da fluorescência adquirida (Figura 14-B). A citofluorimetria de fluxo já foi reportada como método de diferenciação de infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis* que também expressava uma proteína repórter EGFP (MEHTA *et al.*, 2010). De maneira similar, Bolhassani *et al.* (2011) detectaram em macrófagos da linhagem J774A fluorescências das formas amastigotas de *L. infantum*, *L. tarentolae* e *L. major* transfectadas com EGFP. No entanto, em nosso estudo, foi observada uma redução, em torno de 30%, no percentual da população fluorescente de amastigotas de La-RFP e La-GFP, bem como uma redução na intensidade da fluorescência. Lang *et al.* (2009) já reportava a diminuição da fluorescência da forma amastigota em relação à promastigota como uma desvantagem das *Leishmania* que expressam marcadores fluorescentes. Adicionalmente, de acordo com Millington *et al.* (2011), a diferença na fluorescência para as formas amastigotas pode estar relacionada com o rearranjo de proteínas neste estágio do parasito. Não foi possível observar por microscopia de fluorescência a redução da fluorescência em amastigotas de La-GFP e La-RFP na proporção indicada na citofluorimetria de fluxo (Figura 14-a). Aparentemente, ambas estavam com intensidade de sinal semelhante ao apresentado no estágio promastigota, o que é curioso, pois esperava-se encontrar uma fluorescência menos intensa, compatível com a citofluorimetria de fluxo.

A última parte dos estudos consistiu no teste da infectividade *in vivo*. Camundongos BALB/c (n=5) foram infectados com La-GFP, La-RFP e La-WT, respectivamente. Durante 73 dias o curso da lesão foi acompanhado e ao final do período a carga parasitária foi avaliada por LDA e a estabilidade do plasmídeo foi aferida por citofluorimetria de fluxo *ex vivo*. Quanto ao ensaio de infectividade, os resultados do acompanhamento da lesão e da LDA demonstraram que não houve diferença da infectividade entre os parasitos transfectados entre si, porém apresentaram diminuição em relação à La-WT, indicando que a presença do plasmídeo pode estar interferindo em sua virulência *in vivo*. Este fato não era esperado para a La-GFP, uma vez que Bandeira (2005) mostrou que o comportamento da infectividade da La-GFP era semelhante à La-WT. É possível que tenha havido uma seleção de parasitos menos infectantes transcorridos quase 10 anos do uso destes parasitos. O mesmo comportamento demonstrado pela La-RFP também foi curioso. Segundo Guedes (2010), as serinas proteases estão envolvidas na virulência das espécies de *Leishmania*. O silenciamento do gene da OPB2 (serino protease constitutiva da *L. amazonensis*) em *L. major* afetou sua infectividade *in vitro*. Como a La-RFP deste estudo tem a *mCherry* ligada justamente a porção N-terminal do gene da OPB2, o esperado era o efeito contrário, ou seja, aumento na sua infectividade. No entanto, a baixa fluorescência vermelha observada poderia indicar uma expressão ineficiente do plasmídeo. Rocha *et al* (2012) também fizeram uso de *L. amazonensis* transfectadas com plasmídios carregando genes repórteres EGFP ou DsRed. Naquele estudo, os autores relataram nenhuma diferença da infectividade *in vitro* e *in vivo* em comparação a La-WT, porém, neste caso, a *L. amazonensis* que expressava EGFP tinha baixo sinal de fluorescência. Em nosso estudo, houve uma discreta diferença na infectividade *in vitro* entre os subtipos fluorescentes de *L. amazonensis* em relação à La-WT, que também foi observado no experimento *in vivo* de forma mais pronunciada. Este efeito mais pronunciado poderia ser pelo fato da infecção em um animal vivo envolver outros elementos do sistema imunológico não presentes *in vitro*, e a presença dos plasmídios poderia estar atuando como um fator imunogênico, o que poderia explicar a redução da infectividade dos parasitos transfectados. Há relatos de que a super expressão de proteínas fluorescentes por *Leishmania* podem alterar a infectividade *in vivo*. Bennett *et al* (2001) relataram retardo no crescimento da lesão em patas de camundongos BALB/c infectadas com *L. mexicana* expressando EGFP

quando comparadas a *L. mexicana* selvagem. Em relação à estabilidade da fluorescência, La-GFP e La-RFP apresentaram forte redução na população fluorescente, em congruência com o observado *in vitro* e relatado por Costa *et al.* (2011) para La-GFP. A La-RFP mostrou maior instabilidade do plasmídeo, praticamente perdendo toda a fluorescência que tinha antes do curso da infecção, sugerindo perda quase que total do plasmídeo na ausência da pressão do antibiótico.

Concluindo, apesar de apresentarem menor infectividade em relação à La-WT, o uso das La-GFP e La-RFP não seria inviabilizado, pois tiveram infectividade satisfatória para uso como modelo de estudo. Todavia, a La-RFP não se mostrou eficaz como ferramenta de quantificação rápida da carga parasitária e imageamento *in vitro* e *in vivo* devido à sua baixa intensidade e estabilidade da fluorescência vermelha em comparação com a La-GFP.

CONCLUSÃO

CONCLUSÕES PARCIAIS

1. O plasmídio da La-GFP é mais estável em cultura (> 35 dias) e no animal infectado (>73 dias) que da La-RFP (20 dias e << 73 dias, respectivamente).
2. As La-GFP e La-RFP são igualmente infectantes para macrófagos e camundongos.
3. A menor infectividade *in vitro* e *in vivo* de ambas La-RFP e La-GFP relação à La-WT pode indicar que a transfecção prejudica um pouco este parâmetro, mas isto não inviabiliza seu uso.
4. A baixa fluorescência e estabilidade da La-RFP não estimulam seu uso como ferramenta de estudo para métodos de quantificação rápida e imageamento *in vitro* e *in vivo*. A La-GFP continua sendo a ferramenta de pesquisa mais confiável.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesta dissertação sugerem que a La-RFP não tenha potencial para uso como método rápido de quantificação da carga parasitária para o *screening* e eficácia de fármacos e vacinas *in vitro* devido à sua baixa estabilidade do plasmídeo e expressão da fluorescência vermelha em relação à La-GFP. No entanto, estudos *in vivo* devem ser feitos para confirmação do seu uso no imageamento animal, particularmente para experimentos de curta duração.

REFERÊNCIAS

13. Referências

ALAVI-NAINI, R., FAZAELI, A., O`Dempsey, T.. Topical Treatment Modalities For Old World Cutaneous *Leishmaniasis*: A Review. *Prague Medical Report*. v. 113: 105-118, 2012.

ALVAR, J.; Vélez, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN-BOER, M.; The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. *Plos One*, 2012.

AL-MUTAIRI, N.; ALSHILTAWY, M.; EL KHALAWANY, M.; JOSHI, A.; EASSA, B. I.; MANCHANDA, Y.; GOMAA, S.; DARWISH, I.; RIJHWANI, M. Treatment of Old World cutaneous *Leishmaniasis* with dapsone, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination, *International Journal of Dermatology*, v. 48, p. 862-869, 2009.

AMEEN, M. Cutaneous *Leishmaniasis*: advances in disease pathogenesis, diagnosis and therapeutics. *Clin Exp Dermatol*. v. 35: 699-705, 2010.

BANDEIRA, C. A.; Avaliação de chalconas sintéticas e nanoformulações para tratamento da leishmaniose cutânea murina usando parasitos geneticamente fluorescentes. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Instituto Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BENNETT, C.L.; MISSLITZ, A.; COLLEDGE, L.; AEBISCHER, T.; BLACKBURN, C.C.; Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania Mexicana* amastigotes. V. 31 p. 876-883, 2001.

BERMAN, J. D. Current treatment approaches to *Leishmaniasis*., *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.16, p. 397-401, 2003.

BERTHO, A.L.; CYSNE, L.; COUTINHO, S.G. Flow cytometry in the study of interaction between murine macrophages and the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *Journal of Parasitology*. V. 78(4) p. 666-671, 1992.

BOLHASSANI, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; ZAMANILUI, S.; ZAHEDIFARD, F.; SEYED, N.; TORKASHVAND, F.; VAZIRI, B.; RAFATI, S.; Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. V. 127 p. 637-645, 2011.

BUFFET, P., *Leishmaniasis*: Informaciones para su control y tratamiento. *Sanofi Aventis Guide*, 2008

CALCO-ÁLVAREZ, E.; GUERRERO, N.A.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; PRADA, C.F.; REQUENA, J.M.; PUNZÓN, C.; LLAMAS, M.A.; ARÉVALO, F.J.; RIVAS, L.; FRESNO, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M. Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing *mCherry* Fluorescent Protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. *Plos Neglected Tropical Diseases*. V. 6, 2012.

CAMPBELL, R.E.; TOUR, O.; PALMER, A.E.; STEINBACH; BAIRD, G.; ZACHARIAS, D.A.; TSIEN, R. A monomeric red fluorescent protein. *PNAS* V. 99 p 7877-7882, 2002.

CDC (Control Disease Center) – Ciclo Biológico da *Leishmania sp.* Adaptado de <<http://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 05 out. 2012 16:00:00.

CLAYTON, C.E.; Genetic Manipulation of Kinetoplastida. *Parasitology Today*, v. 16, nº9, 1999.

COSTA, S.S.; GOLIM, M.A.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, F.T.M.; GIORGIO, S. Use of *in vivo* and *in vitro* systems to select *Leishmania amazonensis* expressing Green Fluorescent Protein. *Korean J Parasitology* V.49 p. 357-364, 2011.

COSTA-PINTO, D.; TRINDADE, L.S.; McMAHON-PRATT, D.; TRAUB-CSEKO, Y.M.; Cellular trafficking in trypanosomatids: a new target for therapies? *International Journal of Parasitology*. V. 31 p. 537-544, 2001.

COUTINHO, S. G. Leishmaniose tegumentar americana. *J Bras Med*, v. 41: 104-116, 1981.

DESJEUX, P. *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. v. 27: 305-318, 2004.

DI GIORGIO, C., F FARAUT-GAMBARELLI, F., IMBER, A., MINODIER, P., GASQUET, M., DUMON, H. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral *Leishmaniasis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 44, p. 71-76, 1999.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. *Cell Press*. 2009.

ESCH, K.J., PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n.1, 2013.

GROSS, L.A., BAIRD, G.S., HOFFMAN, R.C., BALDRIDGE, K.K., TSIEN, R., The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS*,v.97, n. 22, p. 11984-11989, 2000.

GUEDES, H.L.D.M., Caracterização molecular, avaliação funcional e potencial vacinal de serino proteases de *Leishmania*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Instituto Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

HOFFMAN, R.M. Use of GFP for in vivo imaging: concepts and misconceptions. *Small Animal Whole-body Optical Imaging Based on Genetically Engineered Probes*. 2008.

KELLY, J.M.; WARD, H.M.; MILES, M.A.; KENDALL, G.; A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Research*, V. 20 p. 3963-3969.

KUMAR, R. e NYLÉN, S.. Immunobiology of visceral *Leishmaniasis*. *Frontiers in Immunology*, v.03: 251-261, 2012.

LANG, T.; LECOEUR, H.; PRINA, E.; Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Cell Press*. 2009.

LIMA, E.B.; PORTO C.; MOTTA, J.C.O.; SAMPAIO, R.N.R.; Treatment of American cutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol.*; Vol. 82(2) p.111-124, 2007.

MAURICIO, I.L., STOTHARD, J.R. e MILLES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, v.16: 188-9, 2000.

MEHTA, S.R.; ZHANG, XQ; BADARO, R.; SPINA, C.; DAY, J.; CHANG, K.; SCHOOLEY, R.T.; Flow cytometric screening for anti-leishmanials in a human macrophage cell line. *Experimental Parasitology* V. 126 p 617-620, 2010.

MILLINGTON, O. R., MYBURGH, E., MOTTRAM, J.C., ALEXANDER, J.. Imaging the host/parasite interplay in cutaneous *Leishmaniasis*. *Experimental Parasitology*. v. 126, p.310-317, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. Ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. p. 47, 54, 59.

MINODIER, P. e PAROLA, P. Cutaneous *Leishmaniasis* treatment. *Trav Med Infec Dis*, v.5: 150-158, 2007.

MURRAY, H. W. Treatment of visceral *Leishmaniasis* in 2004. *Ann. Trop. Med. Hyg.*, v.71, p. 787-794, 2004.

OLIVEIRA-NETO MP, SCHUBACH A, MATTOS M, GONÇALVES-COSTA SC, PIRMEZ C. Treatment of American cutaneous *Leishmaniasis*: a comparison between low dosage (5mg/kg/day) and high dosage (20mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol.*; v. 45:496-9, 1997.

OMS/WHO (World Health Organization). Control of *Leishmaniasis*. WHO Technical Report Series, v.949, p. 01-04; 53-55, 2010

PAREDES, R., MUNOZ, J., DIAZ, K., DOMINGO, P., GURGUI, M. e CLOTET, B.. *Leishmaniasis* in HIV infection. *J. Postgrad. Med.* 49:39-49, 2003.

PULIDO, S.A.; MUÑOZ, D.L.; RESTREPO, A.M.; MESA, C.V.; ALZATE, J.F.; VÉLEZ, I.D.; ROBLEDO, S.M.; Improvement of the Green fluorescent protein reporter system in *Leishmania spp.* for the *in vitro* and *in vivo* screening of antileishmanial drugs. *Acta Tropica* V. 122 p. 36-45, 2012.

RANAWAKA, R.R.; WEERAKOON, H.S.; OPATHELLA, N. Liquid nitrogen cryotherapy on *Leishmania donovani* cutaneous *Leishmaniasis*, *Journal of Dermatological Treatment*, v. 22, n.4, p. 241-245, doi 10.3109/09546631003762654, 2011.

ROCHA, M.N.; CORREA, C.M.; MELO, M.N.; BEVERLEY, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; MADUREIRA, A.P.; SOARES, R.P. An alternative *in vitro* drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagn Microbiol Infect Dis*. V. 75(3) p. 282-291, 2012.

ROY, G.; DUMAS, C.; SERENO, D.; WU, Y.; SINGH, A.K.; TREMBLAY, M.J.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B.. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania spp.* Infections in macrophages and in animal models. *Molecular and Biochemical Parasitology* . V. 110, p. 195-206, 2000.

ROSSI-BERGMANN B., LENGLET A., BEZERRA-SANTOS C.R., COSTA-PINTO D., TRAUB-CZEKO Y.M. Use of fluorescent *Leishmania* for faster quantitation of parasite growth *in vitro* and *in vivo*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 94: 74,1999.

SADLOVA, J., YEO, M., SEBLOVA, V., LEWIS, M. D., MAURICIO, I., VOLFF, P., MILES, M.A.. Visualisation of *Leishmania donovani* Fluorescent Hybrids during Early Stage Development in the Sand Fly Vector. *PLoS ONE*, 6(5): e19851. doi:10.1371/journal.pone.0019851, 2011.

SALOTRA, P. & SINGH, R. Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal *Leishmaniasis*. *Indian. J. Med. Res.* v.123:295-310, 2003.

SHANER, N.C.; PATTERSON, G.H.; DAVIDSON, M.W. Advances in fluorescent protein technology. *Journal of Cell Science* V. 120 p. 4247-4260, 2007.

SHIMOMURA, O. Discovery of green fluorescent protein (GFP): Nobel Lecture. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 48, p. 5590-5602, 2009.

STRAZZULLA, A; COCUZZA, S.; PINZONE, M.R.; POSTORINO, M.C.; COSENTINO, S.; SERRA, A.; CACOPARDO, B.; NUNNARI, G.. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease, *BioMed Research International* v. 2013.

THALHOFER, C.J.; GRALF, J.W.; LOVE-HOMAN, L.; HICKERSON, S.M.; CRAFT, N.; BEVERLEY, S.M.; WILSON, M.E.; In vivo imaging of transgenic *Leishmania* parasites in a live host. *Journal of Visualized Experiments*. V. 41, 2010).

VACCHINA, P. & MORALES, M.A.; *In vitro* screening test using *Leishmania* promastigotes stably expressing mCherry protein. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2014.

VARELA, R.E.M., MUÑOZ, D.L.; ROBLEDO, S.M.; KOLLI, B.K.; DUTTA, S.; CHANG, K.P.; MUSKUS, C.; *Leishmania (Viannia) panamensis*: an *in vitro* assay using the expression of the GFP for screening of antileishmanial drug. *Experimental Parasitology*. V. 122, p.134-139, 2009.