



BÁRBARA SANTONI CODONHO

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DA
PROTEÍNA HSP70 EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

BÁRBARA SANTONI CODONHO

“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA HSP70 EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”

Este exemplar corresponde à
redação final da
DISSERTAÇÃO defendida pela
candidata

**BÁRBARA SANTONI
CODONHO**

e aprovada pela Comissão
Julgadora. *Selma L. G.*

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestra em Genética e Biologia
Molecular, na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C648a Codonho, Bárbara Santoni, 1988-
Avaliação do efeito da superexpressão da proteína HSP70 em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Bárbara Santoni Codonho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Selma Giorgio.

Coorientador: Fernanda Ramos Gadelha.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Leishmaniose. 2. Proteínas de choque térmico HSP70. 3. Superexpressão gênica. I. Giorgio, Selma, 1962-. II. Gadelha, Fernanda Ramos, 1964-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the effect of overexpression of HSP70 protein in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Palavras-chave em inglês:

Leishmaniasis

HSP70 heat-shock proteins

Gene overexpression

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Selma Giorgio [Orientador]

Clara Lúcia Barbieri Mestriner

Marcelo Brocchi

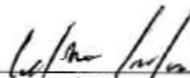
Data de defesa: 21-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 21 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

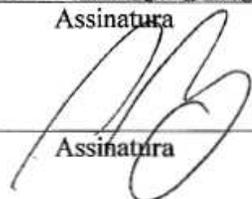
Profa. Dra. Selma Giorgio (orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Prof. Dr. José Franco Da Silveira Filho

Assinatura

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Assinatura

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que atingem milhões de pessoas por ano. O tratamento é realizado primeiramente com antimoniais pentavalentes e, em casos de resistência, são indicadas a pentamidina ou anfotericina B. Todos estes fármacos são tóxicos e induzem efeitos colaterais nos pacientes. Devido a dificuldades no tratamento, o estudo de moléculas presentes no parasita se torna importante. Dentre essas, as *heat shock proteins 70* (HSP70) são proteínas essenciais para o ciclo de vida da *Leishmania*. Durante a passagem do vetor para o hospedeiro vertebrado, o parasita encontra vários tipos de estresses que induzem a uma maior expressão da HSP70. Nesse projeto avaliou-se os efeitos da superexpressão da HSP70 em *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, comparando-se parasitas que superexpressam a proteína HSP70 (pTEX-HSP70) com parasitas contendo somente o vetor (pTEX). Os resultados mostraram que os promastigotas transfectados pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram vários aspectos ultraestruturais semelhantes aos não transfectados (WT), porém mostraram ser maiores e com o tamanho da área nuclear maior. A superexpressão da proteína HSP70 conferiu aos parasitas uma fase estacionária de proliferação mais estendida do que a observada em parasitas pTEX. Uma maior resistência e capacidade proliferativa foram observadas nos parasitas pTEX-HSP70 quando submetidos a diferentes condições de estresses (tratamentos com H₂O₂, choque térmico e ambiente hiperbárico), em relação a parasitas pTEX. Os resultados também mostraram que parasitas pTEX e pTEX-HSP70 infectam culturas de macrófagos peritoneais e macrófagos humanos derivados de sangue periférico, em taxas (% de infecção e número de amastigotas/macrófago) semelhantes a de parasitas WT. O processo de infecção em camundongos BALB/c mostrou que o tamanho da lesão induzida pelos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 na pata foi diferente nas primeiras semanas, mas

semelhante no curso final da infecção. Adicionalmente, as cargas parasitárias nas lesões dos camundongos BALB/c infectados com os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 foram semelhantes, mas maiores que as cargas parasitárias nas lesões induzidas por WT. Além disso, os baços dos camundongos infectados com os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram visceralização. Ensaios da bioenergética destes promastigotas mostraram que parasitas pTEX-HSP70 apresentam maiores taxas de consumo de O₂ do que parasitas pTEX, apesar de apresentarem produção de ATP semelhante. A produção de superóxido nos parasitas pTEX-HSP70 e pTEX foram similares, apesar da liberação de H₂O₂ ser bem inferior nos de parasitas pTEX-HSP70. Os resultados obtidos indicam que a superexpressão da proteína HSP70 protege a *L.(L.) amazonensis* de situações de estresse imediato, mas não interfere com a sua capacidade infectiva.

Palavras-chave: Leishmaniose; HSP70; superexpressão.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of diseases caused by the protozoan genus *Leishmania*, which affect millions of people each year. The treatment is performed primarily with pentavalent antimony and resistance cases are indicated pentamidine or amphotericin B. All these drugs are toxic and induce side effects in patients. Due to difficulties in treatment, the study of molecules present in the parasite becomes important. Among these, the heat shock protein 70 (HSP70) proteins are essential for the life cycle of *Leishmania*. During the transition from vector to vertebrate host, the parasite finds various types of stresses that induce a higher expression of HSP70. In this project was evaluated the effects of overexpression of HSP70 in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, comparing parasites that overexpressing HSP70 (pTEX-HSP70) protein with parasites containing the empty vector (pTEX). The results showed that transfected promastigotes pTEX and pTEX-HSP70 showed several similar ultrastructural aspects similar to promastigotes of *L.(L.) amazonensis* untransfected (WT), but proved to be larger and the size of the largest nuclear area. Overexpression of HSP70 protein gave the parasites a stationary phase of proliferation more extended than that observed in parasites pTEX. Higher strength and better proliferative capacity were observed in parasites pTEX-HSP70 when submitted to different stress conditions (hydrogen peroxide, heat shock treatments and hyperbaric environment), in relation to parasites pTEX. The results also showed that pTEX and pTEX-HSP70 parasites infect cultures of peritoneal macrophages and human peripheral blood-derived macrophages in rate (% infection and the number of amastigotes / macrophage) similar to WT parasites. The process of infection in BALB/c mice showed that the size of the induced parasitic pTEX and pTEX-HSP70 foot injury was different in the first few weeks but similar in the final course of infection. Additionally, parasitic loads on the lesions of BALB/c mice infected with pTEX and pTEX-HSP70 parasites

were similar, but larger than the parasitic loads in lesions induced by WT. Moreover, spleens from infected with pTEX and pTEX-HSP70 parasites mice showed visceralization. Assays of bioenergetics promastigotes showed that these pTEX-HSP70 parasites consume more O₂ than pTEX parasites, despite showing similar ATP production. Superoxide production in parasites pTEX and pTEX-HSP70 were similar, despite the release of hydrogen peroxide is considerably lower than pTEX-HSP70 parasites. The results indicate that overexpression of HSP70 protein protect *L.(L.) amazonensis* in immediate situations of stress, but does not interfere with its infective capacity.

Keywords: Leishmaniasis; HSP70; overexpression.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Aspectos Gerais das Leishmanioses.....	1
1.2- Chaperonas: proteínas HSP.....	5
1.3- <i>Leishmania</i> e HSP70.....	7
1.4- Relevância do ambiente hiperbárico (HBO).....	9
1.5- Relevância da bioenergética mitocondrial.....	10
2- OBJETIVO.....	13
3- METODOLOGIA.....	15
3.1- Parasitas.....	15
3.2- Construção do vetor pTEX-HSP70.....	15
3.3- Cultura de bactérias <i>E. coli</i> da linhagem DH5 α	16
3.4- Transformação de bactéria <i>E. coli</i> da linhagem DH5 α	16
3.5- Eletroporação dos parasitas <i>L.(L.) amazonensis</i>	17
3.6- Ensaio de <i>Western blotting</i>	18
3.7- Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	19
3.8- Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	20
3.9- Avaliação das curvas de proliferação dos parasitas.....	21
3.10- Exposição dos parasitas ao H ₂ O ₂	21

3.11-Exposição dos parasitas ao choque térmico.....	21
3.12-Exposição dos parasitas à oxigenação hiperbárica (HBO).....	22
3.13-Infecção <i>in vitro</i> em macrófagos peritoneais.....	22
3.14-Infecção <i>in vitro</i> em macrófagos primários de sangue periférico.....	23
3.15-Infecção <i>in vivo</i>	24
3.16-Determinação do consumo de O ₂	25
3.17- Determinação do ATP intracelular.....	26
3.18- Determinação da liberação de H ₂ O ₂	26
3.19- Determinação da produção de superóxido mitocondrial.....	27
3.20- Análise estatística.....	27
4- RESULTADOS.....	29
4.1. Obtenção do vetor de expressão pTEX-HSP70.....	29
4.2. Obtenção da <i>L.(L.) amazonensis</i> superexpressando HSP70.....	31
4.3. Microscopia eletrônica de varredura	32
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	36
4.5. Curva de crescimento da <i>L.(L.) amazonensis</i> selvagem e transfectados.....	41
4.6. Tratamento dos parasitas transfectados com H ₂ O ₂	42
4.7. Tratamento dos parasitas transfectados com choque térmico.....	45
4.8. Exposição dos parasitas transfectados à HBO.....	48
4.9. Infecções de macrófagos <i>in vitro</i> com <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, pTEX e pTEX-	

HSP70.....	51
4.10. Infecções de macrófagos <i>in vitro</i> com <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, pTEX e pTEX-HSP70 submetidos a choque térmico.....	53
4.11. Infecções de macrófagos <i>in vitro</i> com <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, pTEX e pTEX-HSP70 e tratados com glucantime.....	54
4.12. Infecções de camundongos BALB/c com <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, pTEX e pTEX-HSP70.....	57
4.13. Parâmetros Bioenergéticos dos parasitas transfectados.....	61
4.14. Produção de espécies reativas de oxigênio pelos parasitas transfectados.....	64
5- DISCUSSÃO.....	67
6- CONCLUSÕES.....	81
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS.....	91

Dedico este trabalho a meus pais, Douglas e Esmeralda, pelo amor incondicional e pelo apoio em
todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meus pensamentos e caminhos;

A meus pais, Douglas e Esmeralda, que sempre foram meu exemplo de vida e fundamentais para esta conquista;

Ao meu noivo Fernando, que sempre foi meu porto seguro, meu ouvinte, meu conselheiro, o meu melhor amigo em todos os momentos;

Ao meu irmão Bruno e minha cunhada Bia pelo apoio e carinho;

À minha sogra Cilinha e a vó Corina pelas orações e carinho;

Às minhas orientadoras, Prof. Dra. Selma Giorgio e Profa. Dra. Fernanda R. Gadelha, pelos ensinamentos, paciência, incentivo e por acreditarem no meu trabalho;

Aos amigos do laboratório de Leishmaniose, Ademar, Alessandra, Alê, Ana, Flávia, Jéssica, Ju, Lari, Luis, Mari, Marina, Mel, Myriam, Sol e Vanessa pelos conselhos, discussões, pelas altas risadas e principalmente pela amizade;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica, Eduardo, Kiko, Leandro e Tamires pelo apoio, pelas brincadeiras, conselhos, pelas conversas e pela grande amizade;

Aos técnicos e amigos no Departamento de Biologia Animal pela amizade e ajuda;

Ào Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro pela colaboração e paciência em ensinar os experimentos de microscopia eletrônica;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Vetor de expressão pGEM contendo o gene HSP70.....	29
Figura 2: Vetor de expressão pTEX-HSP70.....	30
Figura 3: Eletroforese exibindo a obtenção do vetor de expressão clonado digerido e as etapas de clonagem.....	30
Figura 4: Superexpressão da proteína HSP70 nos parasitas pTEX-HSP70.....	32
Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, transfectados pTEX e pTEX-HSP70.....	33
Figura 6: Medidas do comprimento celular de promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70.....	34
Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, transfectados pTEX e pTEX-HSP70.....	35
Figura 8: Medidas dos flagelos de promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, pTEX e pTEX-HSP70.....	35
Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, transfectados pTEX e pTEX-HSP70.....	37
Figura 10: Densidade de área das organelas de promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, pTEX	

e pTEX-HSP70.....39

Figura 11: Densidade numérica de vacúolos (A) e corpos lipídicos (B) de promastigotas *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70.....40

Figura 12: Curva de proliferação de promastigotas *L.(L.) amazonensis* WT (□), pTEX (■) e pTEX-HSP70 (■).....41

Figura 13: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento com 250µM H₂O₂.....43

Figura 14: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento com 450µM H₂O₂.....44

Figura 15: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento com 600µM H₂O₂.....45

Figura 16: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 2h com choque térmico.....46

Figura 17: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 4h com choque térmico.....47

Figura 18: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 6h com choque térmico.....48

Figura 19: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 2h com HBO.....49

Figura 20: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX–HSP70 após o tratamento por 4h com HBO.....	50
Figura 21: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX–HSP70 após o tratamento por 6h com HBO.....	51
Figura 22: Infecção de macrófagos peritoneais e humanos incubados com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 (A) e o número de amastigota por macrófago (B).....	52
Figura 23: Infecção de macrófagos peritoneais com parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 (A) e o número de amastigota por macrófago (B) em condições de choque térmico.....	54
Figura 24: Infecção de macrófagos peritoneais incubados com parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 (A) e o número de amastigota por macrófago (B) tratados ou não com Glucantime.....	55
Figura 25: Fotos representativas das culturas de macrófagos peritoneais incubados com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 tratadas ou não com Glucantime.....	56
Figura 26: Infecção de camundongos BALB/c com promastigotas pTEX e pTEX-HSP70.....	58
Figura 27: Carga parasitária na pata de camundongos BALB/c infectados com <i>L.(L.) amazonensis</i> WT, pTEX e pTEX-HSP70.....	59
Figura 28: Fotos do <i>imprinting</i> do baço dos camundongos BALB/c infectados com promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70.....	61
Figura 29: Consumo de oxigênio e controle respiratório dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70.....	62

Figura 30: Porcentagem de ATP intracelular produzido por promastigotas pTEX-HSP70 em relação às células controle63

Figura 31: Células pTEX liberam mais H_2O_2 do que células pTEX-HSP70 com a inibição da cadeia respiratória mitocondrial.....64

Figura 32: Produção de O_2^- mitocondrial é o mesmo entre os promastigotas transfectados.....65

LISTA TABELAS

Tabela 1: Concentração de H₂O₂ capaz de inibir 50% da proliferação dos parasitas transfectados (IC₅₀).....42

Tabela 2: Dados da contagem de parasitas em *imprint* de baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70.....60

LISTA ABREVIATURAS

AA- Antimicina A

ATP- Adenosina Trifosfato

Ctrl- Controle

EROs- Espécies Reativas de Oxigênio

G418- Geneticina

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

HBO- Oxigenação hiperbárica

HS- Choque térmico

HSP- Proteína de Choque Térmico

HSP70- Proteínas de Choque Térmico 70 KDa

IC₅₀- Concentração que inibe 50% da proliferação

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

O₂⁻ - Superóxido

OD- Densidade Óptica

pGEM-Vetor

pGEM-HSP70- Gene HSP70 clonado no vetor pGEM

pTEX- Vetor

pTEX-HSP70- Gene HSP70 clonado no vetor pTEX

RCR- Razão do Controle Respiratório

WT- *wild type*

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais das leishmanioses

As Leishmanioses são um conjunto de doenças polimórficas causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Stockdale & Newton, 2013). Este parasita apresenta duas formas distintas, uma flagelar extracelular presente no interior do tubo digestivo do inseto vetor e uma intracelular, presente no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado (Kling & Körner, 2013).

Durante o repasse sanguíneo do vetor flebotomíneo, formas promastigotas metacíclicas são inoculados na pele do hospedeiro mamífero. Os parasitas são fagocitados por macrófagos residentes onde se transformam em formas amastigotas, residindo e se multiplicando no interior destas células (Walker et al., 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses causam de 20 a 30 mil mortes anualmente e, já estão registrados 1,3 milhões de novos casos por ano com esta parasitose (WHO, 2014). A leishmaniose está presente em algumas regiões das Américas, África, leste da Europa, centro e oeste da Ásia e na Índia (Silva-Almeida et al., 2012).

Os vetores que transmitem as leishmanioses são flebotomíneos fêmeas da família *Psychodidae*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus sp* (Velho Mundo) e *Lutzomyia sp* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (Ready, 2013).

As leishmanioses apresentam uma diversidade de manifestações clínicas, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da espécie do parasita, podendo atingir a pele, as mucosas e as vísceras (Mondolfi et al., 2013). A leishmaniose tegumentar pode apresentar três formas

principais: a leishmaniose cutânea caracterizada por lesões ulcerosas únicas ou múltiplas na pele; a leishmaniose muco-cutânea que atinge as mucosas do trato respiratório e digestivo alto e, a leishmaniose cutânea difusa que é caracterizada por nódulos infiltrados de parasitas, sendo no Brasil causada pela *L.(L.) amazonensis* (Nylén & Eidsmo, 2012). Na leishmaniose visceral os principais órgãos atingidos são fígado, baço, medula óssea e linfonodos e se não tratada adequadamente pode levar a óbito (Forestier, 2013).

Casos de coinfeção de pessoas com leishmaniose e HIV têm sido reportados desde 1985 em 38 países. A infecção com o vírus HIV compromete o sistema imune e faz com que o tratamento da leishmaniose seja menos eficaz, o que pode contribuir para a maior difusão da doença (Croft & Olliaro, 2011).

A espécie utilizada nesse estudo, a *L.(L.) amazonensis*, está presente em países da América do Sul e é o agente responsável pelas formas clínicas cutânea e cutânea difusa. As infecções com *L.(L.) amazonensis* podem impedir a ação de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4⁺ (Soong et al., 2012). Além disso, somente esta espécie e a *L.(L.) mexicana*, que são patogênicas para humanos, induzem a formação de grandes vacúolos parasitóforos nos macrófagos. Foi sugerido por Wilson e colaboradores (2008) que os vacúolos seriam uma proteção para estes parasitas da ação leishmanicida do macrófago, pois reduziria a concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs) em contato direto com o parasita.

O arsenal terapêutico das leishmanioses vem sendo realizado há décadas com antimoniais pentavalentes como o estibogluconato sódico (Pentostan[®]) e antimoniato de *N*-metil-glucamina (Glucantime[®]), considerados como primeira linha no tratamento desta parasitose (McGwire & Satoskar, 2013). Os antimoniais pentavalentes são considerados uma pró-droga, pois são convertidos em antimonial trivalente que é a forma ativa do fármaco. A resistência adquirida

pelos parasitas a este fármaco é associada à baixa atividade da enzima redutase e assim a menor conversão dos antimoniais pentavalentes a trivalentes (Singh et al., 2012). Os antimoniais pentavalentes possuem uma variedade de efeitos colaterais tais como, dores musculares, náuseas, vômitos, diarréias, dores abdominais, dores de cabeça, fadiga, anorexia, febre, eritema e urticária (Oliveira et al., 2011).

Em casos de intolerância, contra-indicação ou resistência aos antimoniais, o tratamento da leishmaniose é realizado com anfotericina B ou pentamidina, fármacos de segunda linha de tratamento. A anfotericina B é em um antibiótico polieno que apresenta um espectro de ação como agente antimetabólico e antiparasitário (Chattopadhyay & Jafurulla, 2011). Este fármaco possui afinidade pelo ergosterol presente na membrana do parasita, onde age formando poros na membrana, levando a uma mudança osmótica e lise celular. Entretanto, o uso da anfotericina B é limitado devido à severa nefrotoxicidade que pode causar aos pacientes (Chattopadhyay & Jafurulla, 2011). Alternativamente, a anfotericina B lipossomal tem sido, recentemente, utilizada para o tratamento das leishmanioses viscerais. Este composto consiste de uma bicamada de fosfolípídeos onde é incorporada a anfotericina B. As formulações lipossomais aumentam o acúmulo do fármaco nas células infectadas, mas seu uso é limitado devido ao custo elevado (Astelbauer & Walochnik, 2011).

A pentamidina também apresenta o uso limitado devido à dificuldade na sua administração e alta toxicidade. O fármaco induz uma variedade de efeitos colaterais, principalmente pela ocorrência de disfunções relacionadas ao metabolismo da glicose (Jain & Jain, 2013).

A mitelfosina tem sido utilizada recentemente para o tratamento da leishmaniose visceral pela via oral, mas o composto é teratogênico e possui um tempo de vida longo, possibilitando o

aparecimento de cepas resistentes (Jain & Jain, 2013).

Além dos problemas relacionados à toxicidade dos fármacos, o tratamento das leishmanioses é dificultado devido aos diferentes padrões de suscetibilidade e resistência dos indivíduos vivendo nas diversas áreas endêmicas de leishmaniose e pelo aparecimento de cepas cada vez mais resistentes aos fármacos (Jain & Jain, 2013). Também há problemas relacionados ao acesso da população ao tratamento. O custo de um fármaco leishmanicida é bem menor do que o custo utilizado para sua distribuição (Boer et al., 2011).

Outra alternativa para o controle das leishmanioses é a utilização de vacinas. A primeira geração de vacinas formuladas para a leishmaniose humana, que consiste na utilização de antígenos inativados do parasita associados a adjuvantes, tem seu uso limitado, sendo efetivo em algumas regiões endêmicas e em outras não (Velez et al., 2005; Khalil et al., 2006). As proteínas recombinantes utilizados com adjuvantes e a sua expressão heteróloga em vetores são consideradas a segunda geração de vacinas, porém ainda estão em fase de estudos devido à dificuldade na sua estabilização. Recentemente, vários estudos são direcionados à busca de antígenos de proteínas presentes na saliva do vetor *Lutzomyia* spp. (Beaumier et al., 2013).

Além disso, outra estratégia para o tratamento das leishmanioses seria investigar as moléculas envolvidas nas interações entre a *Leishmania* e o macrófago. As moléculas presentes na superfície de *Leishmania*, como por exemplo, lipofosfoglicanos e componentes extracelulares produzidos pelos parasitas, são pesquisados por apresentarem características antigênicas e por interagirem com receptores das células do hospedeiro (Corrales et al., 2010).

Entre essas moléculas, destacam-se as *heat shock proteins* 70KDa (HSP70). Pela análise genômica da *L.(L.) amazonensis*, inferiu-se que ocorre uma interação direta da proteína HSP70 do parasita com o receptor TLR9 de macrófagos (Real et al., 2013). Além disso, foi demonstrado

que a HSP70 é uma importante molécula imunogênica (Kaur et al., 2011; Carrillo et al., 2008) e também está associada à resistência aos antimoniais pentavalentes (Matrangolo et al., 2013; Peláez et al., 2012; Biyani et al., 2011; Brochu et al., 2004). Há estudos que mostram que promastigotas de *L.(V.) braziliensis* secretam a HSP70 para o meio extracelular (Cuervo et al., 2009) e que essa proteína tem atividades imunomoduladoras (Asea et al., 2008). Assim, a proteína HSP70 vem sendo apontada com grande importância para a *Leishmania*.

1.2- Chaperonas: proteínas HSP

As HSPs são proteínas de uma família de chaperonas moleculares altamente conservadas, presente desde organismos procariotos a eucariotos. Em 1962, Ritossa e colaboradores submeteram células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* a estresse térmico ou químico, observando a síntese de uma nova classe de proteína que foi denominada de *heat shock protein* (Heck et al., 2011). Estas chaperonas possuem como funções: auxiliar o dobramento de polipeptídeos recém-sintetizados, prevenir agregação de proteínas, facilitar a degradação de proteínas instáveis e translocar proteínas precursoras para outras organelas como a mitocôndria e o retículo endoplasmático (Priya et al., 2013). As HSPs foram divididas em famílias, com base na homologia da sequência de aminoácidos e em seu peso molecular: HSP10, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e sHSP (Priya et al., 2013). Apesar de as proteínas de cada família apresentarem altíssima homologia na sequência de aminoácidos, possuem diferenças no padrão de expressão e localização intracelular (Stricher et al., 2013).

As HSP70 são as proteínas mais conservadas entre as chaperonas e são expressas constitutivamente (HSC70) no citossol e no núcleo ou por indução a estresses (HSP70). Estão

presentes no citosol, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplastos (Clare & Saibil, 2013). A expressão da HSP70 é regulada por fatores de transcrição denominados fatores de choque térmico (HSF). Estes fatores de transcrição estão localizados no citoplasma como um monômero inativo bloqueado pelas chaperonas. Quando ocorre estresse celular, as proteínas HSPs interagem com proteínas denaturadas liberando os HSF, que então se tornam ativos. Estes fatores de transcrição se ligam a regiões no núcleo denominadas elementos de resposta ao choque (HSE) induzindo a transcrição do gene HSP70 (Velichko et al., 2013).

As proteínas HSP70 são constituídas de três regiões básicas: um domínio ATPase altamente conservado que cataliza a hidrólise do ATP, uma região de ligação ao substrato conservada e uma região C-terminal menos conservada composta de quatro subdomínios (Golas et al., 2012).

O ciclo funcional da HSP70, que interage com substratos para seu dobramento em uma conformação nativa, está envolvido com cochaperonas denominadas HSP40 e fatores de troca de nucleotídeos (NEF), também conhecidos como HSP110. Na ausência de substrato e HSP40, as HSP70 estão ligadas ao ATP, com um estado de baixa afinidade para substrato e, portanto, sem atividade chaperonina. Na presença de um substrato e a chaperona HSP40, ocorre a hidrólise de HSP70-ATP em HSP70-ADP, que tem alta afinidade para o substrato. As proteínas HSP110 catalisam ADP retornando ao estado HSP70-ATP para que o substrato seja liberado (Mayer et al., 2013).

As proteínas HSP70 presentes no interior das células apresentam propriedades anti-inflamatórias e de citoproteção por meio de mecanismos antiapoptóticos (Beere, 2005). Por sua vez, quando a HSP70 está presente extracelularmente, tem propriedades imunoestimulatórias ligando-se a receptores do tipo *toll* (TLR2 e TLR4) presentes na superfície das células

apresentadoras de antígenos (Asea, 2008) e já foi relatado que esta chaperona é capaz de ativar células do sistema imune como os macrófagos e as células NK (Kovalchin et al., 2006; Gastpar et al., 2004).

1.3- *Leishmania* e HSP70

Durante o ciclo de vida da *Leishmania* a proteína HSP70 é expressa em grande quantidade durante sua passagem do vetor ao hospedeiro mamífero. Neste processo o parasita depara com grandes variações de temperatura, pH e a presença de oxidantes tóxicos produzidos pelos macrófagos e essas condições estressantes induzem a maior expressão da HSP70, auxiliando a homeostase do parasita (Shonhai et al., 2011).

A resposta ao choque térmico é considerada de grande importância para a fase de diferenciação da *Leishmania* e os genes que codificam as proteínas de choque térmico têm sido muito estudados (Shonhai et al., 2011), tendo sido descritas as seguintes HSPs do parasita: HSP110, HSP104, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e sHSP (Folgueira & Requena, 2007).

A *Leishmania* apresenta várias cópias dos genes que codificam a HSP70, variando o seu número entre as espécies (Shonhai et al., 2011). Em *L.(L.) major*, por exemplo, foram encontrados 5 genes codificados da HSP70 citoplasmática; 4 deles são organizados em *tandem* e o 5º gene está localizado separado do *locus*, mas presente no mesmo cromossomo (Folgueira & Requena, 2007). Em *L.(L.) amazonensis* existem 7 genes HSP70 organizados em *tandem* e o 8º gene localizado distante, mas também no mesmo cromossomo (Folgueira et al., 2007).

A HSP70 é uma das mais abundantes proteínas presente em promastigotas de *Leishmania* em condições normais e quando os parasitas se encontram em condições de estresse celular o

nível de expressão da HSP70 aumenta (Folgueira et al., 2007). A análise das proteínas HSP70 em tripanossomatídeos, entre eles da *L.(L.) major*, mostrou que elas estão localizadas no citossol, mitocôndria, retículo endoplasmático e no núcleo (Louw et al., 2010).

Estudos mostraram que o mRNA da HSP70 de *L.(V.) braziliensis* interage com diversas proteínas envolvidas no metabolismo do RNA, processos de translocações, metabolismo energético e protéico, regulação do ciclo celular e também foi demonstrada a interação da proteína HSP70 com o seu próprio mRNA, evidenciando um mecanismo auto regulador da expressão da HSP70 (Ramírez et al., 2013).

Como a proteína HSP70 é essencial para o parasita, vários estudos foram realizados, utilizando-se a abordagem do silenciamento e da superexpressão desta proteína. O *knockout* da HSP70 em *L.(L.) major* resultou em menor capacidade de crescimento dos promastigotas e menor multiplicação em macrófagos (Folgueira et al., 2008). Da mesma forma, mutantes de *L.(L.) infantum* que não expressam HSP70 apresentaram menor infectividade em camundongos BALB/c (Carrión et al., 2011). Com a utilização de oligonucleotídeos *antisense*, culturas de promastigotas de *L.(L.) donovani* foram silenciadas transitoriamente no gene HSP70, apresentando aspectos de morte celular programada (Raina & Kaur, 2012).

A maior expressão da HSP70 em *L.(L.) chagasi* foi relatada utilizando choque térmico de 37°C (Streit et al., 1996). Em *L.(L.) chagasi* e *L.(L.) donovani* foi induzido a expressão elevada da HSP70 com oxidantes tóxicos (Wilson et al., 1994; Dea-Ayuela et al., 2009; Adhuna et al., 2000), TNF (Salotra e colaboradores (1995)) e antimoniais pentavalentes (Kumar e colaboradores (2010)). A incubação em meio com pH 5,5, não induziu o aumento da expressão da HSP70 nos promastigotas de *L.(L.) amazonensis* e *L.(L.) donovani* (Garlapati et al, 1999).

Através do processo de transfecção, a superexpressão da HSP70 foi descrita por Brochu e colaboradores (2004) em *L.(L.) tarentolae* e *L.(L.) infantum* e por Miller e colaboradores (2000) em *L.(L.) chagasi*, evidenciando nesses parasitas resistência indireta aos antimoniais e ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂), respectivamente. Ainda não foram descritos trabalhos avaliando a superexpressão da HSP70 em *L.(L.) amazonensis*, uma espécie considerada resistente a algumas moléculas leishmanicidas e pelas EROs produzidas por fagócitos (Wang et al., 2011; Mukbel et al., 2007).

1.4- Relevância do ambiente hiperbárico (HBO)

Oxigenação hiperbárica (HBO) é uma terapia alternativa, muito utilizada para potencializar tratamentos convencionais (úlceras dos pés em diabéticos e gangrena de Fournier), que envolve a utilização de pressões superiores à 1 atmosfera (ATA) em ambientes 100% oxigenados (Kendall et al., 2012). As altas pressões utilizadas no tratamento dissolvem o plasma tecidual, permitindo uma maior difusão de oxigênio em feridas hipóxicas e promovem uma maior angiogênese tecidual (Tra et al., 2013). Devido à alta concentração de oxigênio, as EROs são geradas durante o tratamento (Thom, 2009). Ao mesmo tempo, as EROs podem gerar efeitos benéficos ou não nas células dependendo das taxas de concentração e localização intracelular (Thom, 2009).

Estudos que avaliaram o efeito da oxigenação hiperbárica em lesões na pata de camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* mostraram que quando estes animais foram submetidos à HBO o tamanho das lesões foi reduzido. (Arrais-Silva et al., 2006). Adicionalmente, o tratamento com a HBO exerceu toxicidade direta para os amastigotas da *L.(L.)*

amazonensis, promovendo um ambiente oxidativo. Além disso, em macrófagos infectados com o parasita e tratados com HBO houve redução do número de células infectadas e da carga parasitária (Arrais-Silva et al., 2005). O efeito adjuvante da HBO também foi relatado, pois macrófagos infectados com *L.(L.) amazonensis* apresentaram maior redução da infecção quando associados os tratamentos com HBO e o antimonial pentavalente, comparado aos controles tratados somente com a HBO ou o antimonial pentavalente) (Ayres et al., 2011). Devido ao ambiente oxidativo que o tratamento com a HBO promove, este trabalho avaliou o efeito dessa terapia nos parasitas superexpressando a proteína HSP70.

1.5- Relevância da bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias são organelas encontradas nas células eucarióticas essenciais para o metabolismo celular. Estas organelas além de serem responsáveis pela geração da energia celular por meio da produção de ATP, também sintetizam moléculas importantes e controlam os gradientes de cálcio intracelular (Palmer et al., 2011).

Em *Leishmania* as mitocôndrias possuem a característica de serem heterogêneas, mostrando diversas formas e volumes dependendo da espécie e do estado nutricional dos parasitas, entre outros. Além disso, o DNA mitocondrial dessa família de parasitas está localizado em organelas denominadas como cinetoplastos, que estão intimamente relacionadas com a matriz mitocondrial (Tomás & Castro, 2013).

Em eucariotos a obtenção de energia produzida pelas mitocôndrias ocorre por meio da cadeia transportadora de elétrons que é composta de quatro complexos enzimáticos envolvidos no transporte de elétrons e, por mais um complexo protéico envolvido na fosforilação oxidativa:

NADH-ubiquinona oxidoreductase (complexo I), succinato- ubiquinona oxidoreductase (complexo II), ubiquinol-citocromo c oxidoreductase (complexo III), citocromo oxidase (complexo IV) e o complexo protéico ATPsintase (complexo V). Em tripanosomatídeos, todos estes complexos estão presentes tanto nas espécies de *Leishmania* como em *Trypanosoma* (De Souza et al., 2009), apresentando entretanto algumas diferenças quando comparadas aos das células dos hospedeiros mamíferos.

Apesar de as mitocôndrias serem essenciais para o funcionamento do metabolismo celular, elas também são uma importante fonte de EROs. As EROs são geradas a partir de reações de oxi-redução, onde há uma redução incompleta do oxigênio à água. Além disso, estima-se que as células podem gerar até 2% de EROs durante o consumo de O₂, existindo uma relação entre a produção de ATP e a formação de EROs (Mailloux et al., 2013). A maior fonte de EROs provenientes das mitocôndrias são formadas no complexo III da cadeia transportadora de elétrons (Tomás &Castro, 2013). O primeiro tipo de ERO produzida é o superóxido (O₂⁻) que, por dismutação espontânea ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) pode formar o H₂O₂. Em tripanosomatídeos são encontradas dois tipos de SODs que, diferentemente de outras células, utilizam o ferro como cofator nas suas reações (Tomás &Castro, 2013). Uma vez produzido pelos parasitas, o H₂O₂ é eliminado, em *Leishmania*, por peroxidases e moléculas de baixo peso molecular, como por exemplo, a glutathione peroxidase e a tripanotiona, respectivamente (Krauth-Siegel & Leroux, 2012). Quando os mecanismos antioxidantes das células não conseguem controlar as taxas de EROs produzidas nos processos celulares, o excesso destas moléculas podem causar estresse oxidativo celular, gerando toxicidade para as células. Apesar disto, dados recentes na literatura sugerem a importância do H₂O₂ como uma molécula sinalizadora, envolvida na modulação da atividade de quinases, fosfatases e fatores de

transcrição, a partir da modificação covalente de resíduos de cisteína dessas moléculas (Finkel, 2011).

Não há trabalhos na literatura que mostram em *Leishmania* o efeito da superexpressão da HSP70 na bioenergética mitocondrial. Assim, já que as mitocôndrias são organelas de grande importância para as células, o nosso trabalho teve por objetivo verificar se houve mudanças na bioenergética mitocondrial e na produção de EROs em parasitas que superexpressam a HSP70.

2 – OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da superexpressão da proteína HSP70 em *L.(L.) amazonensis*. Dentro desse enfoque, os principais parâmetros abordados são a seguir definidos.

1- Amplificação do gene da HSP70 de *L.(L.) amazonensis* pelo método do PCR; obtenção da construção pTEX-HSP70; eletroporação dos parasitas com esse vetor e com somente o vetor pTEX e confirmação da superexpressão da HSP70.

2- Avaliação dos parasitas transfectados quanto:

- a) aos aspectos ultraestruturais;
- b) à curva de proliferação em condições normais e de estresse: tratamento com H₂O₂, alteração de temperatura e exposição a HBO;
- c) à capacidade infectiva, *in vitro*, em macrófagos peritoneais e macrófagos humanos derivados de sangue periférico e, *in vivo*, em camundongos BALB/c;
- d) à bioenergética mitocondrial, à produção de ATP e EROs.

3 – METODOLOGIA

3.1. Parasitas

Promastigotas de *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/19/M2269) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Nutricell), L-glutamina 2 mM (Sigma), NaHCO₃ 2 g/L (Synth), HEPES (Sigma) 5,957g/L, Gentamicina 10.000UI (Cultilab). Os parasitas transfectados foram mantidos no mesmo meio de cultura, na presença de G418 (geneticina) (50µg/mL). Os promastigotas foram cultivados em garrafas plásticas de cultura (TPP) em estufa seca a 26°C-28°C (Degrossoli et al, 2007).

3.2. Construção do vetor pTEX-HSP70

O gene HSP70 de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* foi amplificado do DNA genômico do parasita, extraído por meio do método da proteinase K (Smyth et al., 1992), pela técnica de PCR. Os *primers* 5'- gaattcATGACATTCGAGGGCGCCAT- 3' e 5'- aagcttTTAGTCGACCTCCTCGACCT- 3' (Sigma-Aldrich®) introduziram na região 5' e 3' sítios de restrição *EcoRI* e *HindIII*, respectivamente. Os parâmetros do termociclador (Applied Biosystems®) utilizados foram 1 ciclo de 5 min. a 94°C, 33 ciclos de 30 seg. a 94°C, 1 min. a 61°C, 3 min. a 72°C e 1 ciclo de 10 min. a 72°C (Montalvo et al., 2010). O gene HSP70 de *L.(L.) amazonensis* foi clonado no vetor *pGEM®-T Easy Vector* (Promega) (Hu et al., 2002) e subclonado no vetor pTEX (Kelly et al., 1992) de acordo com Finzi e colaboradores (2004). Com os vetores de expressão obtidos, o sequenciamento do vetor pTEX-HSP70 foi feito para

confirmação do gene HSP70 do parasita. A reação de sequenciamento foi feita utilizando 300ng do vetor recombinante, 1 µL do tampão de sequenciamento, 1µL de *Big DyeTM* (Perkin Elmer) e 1,6µM de *primer* (5'- gaattcATGACATTTCGAGGGCGCCAT- 3' ou 5'- aagcttTTAGTCGACCTCCTCGACCT- 3') em um volume final de 10µL. Os parâmetros para programação do termociclador *Vapo Protect Master cycler Pro S* (Eppendorf[®]) foram: 1 ciclo de 2 min. a 94°C, 35 ciclos de 20 seg. a 94°C, 30 seg. a 51°C e 50 seg a 60°C.

3.3. Cultura de bactérias *E. coli* da linhagem DH5α

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura LB (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de cloreto de sódio, pH 7,0) e no caso de LB-agar adicionou-se a esse meio 15g/L de agarose. Após a transformação as bactérias eram cultivadas em meio LB com adição de 50µg/mL de ampicilina (Enzo[®]) (Sambrook & Russel, 2001).

3.4. Transformação de bactéria *E. coli* da linhagem DH5α

As bactérias foram cultivadas em meio LB, a 200 rpm, 37°C até que atingissem a densidade óptica (OD) de 0,3 (Ambrósio, 2005). Bactérias competentes foram obtidas, transformadas e selecionadas pela resistência a ampicilina como descrito em Sambrook & Russel (2001). Após a seleção, células de uma colônia foram crescidas no meio de cultura LB contendo ampicilina e a extração de plasmídeos foi feita utilizando o *PureLink[®] Quick Plasmid Miniprep Kit* (InvitrogenTM), obtendo uma quantidade de DNA plasmidial de 30 a 50 µg para a eletroporação.

3.5. Eletroporação dos parasitas *L.(L.) amazonensis*

Os promastigotas de *L.(L.) amazonensis*, em fase *logarítmica* de crescimento, foram centrifugados 2x, a 1800 rpm, 10 min a 4°C com PBS estéril (137mM de cloreto de sódio, 2,7mM de cloreto de potássio, 8,1mM de Na₂HPO₄ e 1,5mM de KH₂PO₄, pH 7,4). Após a resuspensão, os parasitas foram centrifugados com tampão *cytomix* (2mM de EGTA, 120mM de KCl, 0,15mM de CaCl₂, 10mM de solução K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25mM de Hepes, 5mM de MgCl₂.6H₂O, 0,5% de glicose, 100µg/mL de BSA e 1mM de hipoxantina, pH 7,6). Os parasitas foram resuspenso em concentração final de 5x10⁸ parasitas/mL neste mesmo tampão, colocados na cubeta de eletroporação de 0,2 cm juntamente com 30 a 50µg de plasmídeo e submetidos a 2-3 pulsos de 1,5kV, 25µF (Papadopoulou et al., 1992) no aparelho *Biorad Gene Pulser II*. Posteriormente, as células foram colocadas em 5mL de meio RPMI, e após dois dias, foram centrifugadas a 1800rpm por 10 min. a 4°C. O sedimento foi resuspenso em 5 mL de meio RPMI na presença de 50µg/mL antibiótico G418 (Geneticin, Amresco[®]) e as células foram então mantidas neste meio para obtenção das células selecionadas (Finzi et al., 2004). As eletroporações foram realizadas no laboratório de Genética e Biologia Molecular do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, IB, Unicamp, docente responsável Prof. Dr. Marcelo Brocchi.

3.6- Ensaio de *Western blotting*

Os parasitas transfectados com pTEX-HSP70 e pTEX foram centrifugados a 1800rpm, 10 min a 4°C seguida de uma lavagem com PBS. O sedimento foi resuspenso em PBS e um coquetel de inibidores de proteases (1mM PMSF e 2% de coquetel de inibidores de proteases-Calbiochem[®]) e um volume igual de tampão de amostra (100mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0,02% bromofenol azul, 20% glicerol, 200mM β-mercaptoetanol). Os extratos foram homegenizados e estocados a -20°C para determinação protéica pela técnica de Lowry (Lowry et al., 1951) em amostras sem tampão. Os extratos de proteína (13,45µg) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida no sistema *XCell™ II mini cell system* (Novex™) a 100V, 120mA durante 3h. Posteriormente, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o *XCell™ II mini cell system* (Novex™) a 120mA por 70 min. As membranas foram bloqueadas pela incubação com 5% de leite em pó desnatado em PBS 0,05% Tween 20 (PBS-T) por 1h, em seguida foram lavadas e incubadas na presença do anticorpo policlonal contra HSP70 de *L.(L.) amazonensis* (*Stress Marq Bioscience*[®], 1:1500), durante a noite. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3x por 15 min. com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado com HRP (*Cell Signaling*[®], diluição 1:5000) por 1h em temperatura ambiente e lavadas 3x por 15 min. com PBS. Em seguida a membrana de nitrocelulose foi incubada com o Kit de detecção *Super Signal*[®] (Pierce) para revelação das bandas reativas. Para o controle de *loading*, o gel de poliacrilamida foi corado com *Commassie blue* 0,1% por 1h em temperatura ambiente e posteriormente incubado em solução descorante (5% de ácido acético, 10% de metanol e 85% H₂O₂) até a retirada do excesso de corante (Peloso et al., 2011).

3.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Culturas de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* não transfectados (WT), transfectados pTEX ou pTEX-HSP70 (10^6 céls/mL) em fase logaritmica de crescimento foram centrifugadas a 600 rpm por 10 min. O sedimento foi resuspenso em 2,5% de Glutaraldeído e 1% de ácido tânico em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e fixados por 40 min. Após a fixação as células foram lavadas 2x com tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e adicionadas em lamínulas redondas com Poli-L-Lisina (Sigma). Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e fixadas com 1% de tetróxido de ósmio em banho de gelo por 45 min. As lamínulas foram lavadas com água destilada, transferidas para um suporte de ponto crítico e desidratadas com diversos gradientes de etanol (50, 70 e 90% durante 5 min. e 2x em 100% durante 10 min.). Logo em seguida as lamínulas foram secas em Aparelho de Ponto Critico (Balzers CTD 030), montadas em stubs, cobertas por evaporação com ouro (Sputter, Balzers CTD 050) e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura operando a 10kV e distância de trabalho previamente fixas (JEOL 5800LV, IB/Unicamp) (Eaton et al., 2013). Estas etapas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro do Departamento de Histologia e Embriologia, IB, Unicamp. As medidas de padrões biométricos foram tomadas em 20 micrografias eletrônicas (imagens digitais) de 3.000x de aumento de promastigotas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 isolados (Programa *Image J*. Instituto Nacional de Saúde, EUA).

3.8. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Culturas de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70 (10^6 céls/mL) foram fixadas com glutaraldeído, lavadas com tampão cacodilato de sódio e pós fixadas com tetróxido de ósmio da mesma forma como descrito no item 3.7. Posteriormente, as células foram lavadas 2x em solução salina glicosilada e pós-fixadas com acetato de uranila 1% a 4°C durante a noite. As células foram lavadas 2x com água destilada e o sedimento foi incluído em agarose 4%. Posteriormente as células foram desidratadas com diferentes concentrações de etanol (30, 50, 75 e 100%) por 10 min cada e 3x com acetona PA por 10 min. As células foram embebidas com acetona e resina Epon 812 na proporção 1:1 por 24h e apenas com resina Epon por 6h e feita a inclusão em resina Epon pura por 72h a 60°C. Cortes ultrafinos foram feitos das células que foram contrastadas (acetato de uranila e citrato de chumbo) e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão operado a 60kV (LEO 906) (Cyrino et al., 2012). Estas etapas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro do Departamento de Histologia e Embriologia, IB, Unicamp. As análises morfométricas de densidades de áreas e numéricas foram tomadas em 10 ou 20 micrografias eletrônicas (imagens digitais) com aumento de 21.560x de promastigotas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 isolados (Programa *Image J*. Instituto Nacional de Saúde, EUA).

3.9. Avaliação das curvas de proliferação dos parasitas

Promastigotas WT, transfectados pTEX e pTEX-HSP70 foram adicionados a frasco de cultura de 25 cm² com 5 x 10⁶ parasitas em 5mL de meio RPMI, suplementado com 10% de SFB inativado e incubados em estufa seca a 26-28°C. Os parasitas foram contados diariamente, durante 9 dias, em câmara de Neubauer, para a determinação da curva de crescimento.

3.10. Exposição dos parasitas ao H₂O₂

Os promastigotas transfectados pTEX e pTEX-HSP70 foram incubados em PBS (10⁶ céls/mL) e submetidos a diferentes concentrações de H₂O₂ (Sigma) durante 30min. Após esse período, os promastigotas foram lavados, contados e incubados (10⁶ céls/mL) em meio RPMI. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer durante 4 dias para a determinação da curva de proliferação e IC₅₀ para o H₂O₂ (Finzi et al., 2004).

3.11. Exposição dos parasitas ao choque térmico

Promastigotas *L.(L.) amazonensis* pTEX-HSP70 ou pTEX foram incubados em RPMI à concentração de 10⁶ céls/mL e submetidos ao choque térmico (Banho Maria a 37°C) ou mantidos a 26°C (controle) durante 2, 4 e 6h. Após o tratamento as células foram contadas em câmara de Neubauer e incubadas à concentração de 10⁶ céls/mL em meio RPMI. Os parasitas foram também contados durante 4 dias para determinação da curva de proliferação (Wilson et al., 1994).

3.12. Exposição dos parasitas à oxigenação hiperbárica (HBO)

Promastigotas pTEX ou pTEX-HSP70 (10^6 céls/mL) em tampão PBS foram incubados em frascos de cultura de 25cm^2 (TPP). Os parasitas foram expostos a HBO (100% de O_2 à pressão de 2,5 ATA) em câmara hiperbárica (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist Inc., Inaheim, CA – USA) ou mantidos em condições de normóxia (150 mm Hg de tensão O_2 , 1 ATA) por 2,4 ou 6h. Após o tratamento, as células foram contadas em câmara de Neubauer e incubadas à concentração de 10^6 céls/mL em meio RPMI. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer durante 4 dias para a determinação da curva de proliferação (Arrais-Silva et al., 2005).

3.13. Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais

Células peritoneais murinas foram coletadas de camundongos BALB/c como descrito em Colhone e colaboradores (2004). Resumidamente, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e no peritônio foi injetado PBS estéril suplementado com gentamicina. O exsudato foi retirado da cavidade peritoneal com uma seringa estéril e armazenado em frasco estéril imerso em banho de gelo (Colhone et al., 2004). As células foram adicionadas em lamínulas de 13mm de diâmetro (GlassTecnica) em placas de 24 poços com 2×10^5 macrófagos/poço por 2h. Posteriormente a cultura de macrófagos murinos foi lavada com PBS para remover as células não aderentes e foi adicionado meio RPMI 1640 (Nutricell) suplementado com $50\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Sigma) e 10% de Soro Fetal Bovino (Nutricell). A cultura de macrófagos foi mantida por 24 h em estufa com 21% de O_2 , 5% de CO_2 e N_2 balanceado, a 37°C (Degrossoli et al., 2007). Os promastigotas WT, pTEX ou pTEX-HSP70,

tratados previamente com choque térmico (2h a 37°C em Banho Maria) ou mantidos a 26°C, foram adicionados às culturas de macrófagos na proporção de 10 parasitas: 1 macrófago e mantidos por 2h à 37°C. Em seguida algumas lamínulas foram fixadas com metanol (Synth) e coradas com Giemsa (Sigma) para avaliar a porcentagem de invasão (número de células infectadas durante 2h de contato com o parasita) e o número de amastigotas por macrófago. As outras lamínulas foram lavadas com meio RPMI e mantidas por 24h em meio RPMI a 37°C em estufa com 21% de O₂, 5% de CO₂ e N₂ balanceado. Após esse período, as lamínulas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa para determinar a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas intracelulares (Costa et al., 2011).

Nas culturas de macrófagos infectadas por 2h com parasitas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 sem tratamento com choque térmico foi adicionado 16µg/mL de Glucantime[®] (antimoniato de *N*-metil-glucamina, Sanofi Aventis[®]). Após 24h as lamínulas foram fixadas e coradas com Giemsa para determinar a porcentagem de infecção e o número de amastigotas/macrófago na presença ou ausência do fármaco (Ayres et al., 2008).

3.14. Infecção *in vitro* em macrófagos primários de sangue periférico

Culturas de monócitos humanos derivados de sangue periférico foram obtidas como descrito em Bosseto e colaboradores (2010). O sangue periférico de voluntários saudáveis foi coletado em tubos a vácuo contendo heparina sódica como anticoagulante (Vacuette). Nas alíquotas foi adicionado Histopaque 1077 (Sigma) e centrifugadas a 400 g, 30 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação a camada de leucócitos (na qual se encontram também os monócitos) foi isolada, lavada em PBS e resuspensa em meio RPMI 1640. O número de células e

a viabilidade foram determinados por Tripan Blue em câmara de Neubauer. O cálculo do número de monócitos foi feito considerando-se 20% das células como monócitos.

A cultura de monócitos (5×10^5 céls/poço) foi adicionada em lamínulas de 13mm de diâmetro (GlassTecnica) em placas de 24 poços e cultivada com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, durante 7 dias, para a diferenciação em macrófagos, a 37°C, a 21% de O₂ e 5% de CO₂. A obtenção das culturas de macrófagos humanos derivados de sangue periférico foi realizada em colaboração com o projeto aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (nº CAAE 00574312.6.0000.5404, discente responsável Solange dos Santos Costa).

Promastigotas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 foram adicionados a cultura de macrófagos humanos derivados de sangue periférico na proporção de 10 parasitas: 1 macrófagos por 24h a 34°C. Posteriormente, a cultura de macrófagos infectados foi mantida por mais 24h a 37°C onde foram fixadas e coradas com Giemsa para determinar a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas/ macrófago.

3.15. Infecção *in vivo*

Camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 6-8 semanas foram fornecidos pelo Centro Multi-Disciplinar de Bioterismo – CEMIB/UNICAMP e, mantidos em gaiolas na presença de água destilada e ração autoclavada, no Biotério do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia – UNICAMP. Os ensaios deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP, nº 3056-1.

Os camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente no coxim plantar da pata direita traseira com 1×10^7 promastigotas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 (Arrais-Silva et al., 2006).

O tamanho da lesão foi medido semanalmente com auxílio de um paquímetro e comparado com o tamanho da pata esquerda não infectada. Na 12^a semana de infecção o número de amastigotas totais e a carga parasitária (número de amastigotas/ grama de tecido) da lesão dos camundongos foram determinados após a eutanásia dos animais como descrito em Araújo e colaboradores (2012). Adicionalmente, foi realizado o *imprint* do baço e fígado desses camundongos e as lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa para observar a visceralização nestes órgãos (Arrais-Silva et al., 2006).

3.16. Determinação do consumo de O₂

O consumo de O₂ foi monitorado utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark com agitação contínua a 28°C acoplado a um computador (Hansatech[®] Systems Inc., Norfolk, England). Parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 (5×10^7 céls/mL) em fase logarítmica foram incubados em meio intracelular padrão (125 mM sacarose, 65 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES pH 7,2, 1 mM EGTA e 1 mg/mL BSA) na presença de 40µM de digitonina e 5mM de succinato. O controle respiratório (RCR) mitocondrial (Estado 3/Estado 4) foi determinado após a adição de 400µM ADP (Estado 3) e 1µg/mL de oligomicina (Estado 4) (Silva et al. 2011).

3.17. Determinação do ATP intracelular

Parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 (10^8 céls/mL) foram centrifugados a 1800 rpm por 10 min a 4°C e lavados com PBS. Posteriormente, os parasitas foram adicionados a placas de 96 poços na presença do reagente reconstituído (tampão de lise, D-luciferina e luciferase). A luminescência que foi obtida pela reação entre D-luciferina, luciferase e ATP liberado pela lise das células foi medida por um luminômetro (Packard Bioscience Company®) acoplado ao aplicativo de Controle de Instrumentos MFC, versão 3.02. A quantidade de luminescência emitida foi determinada a partir de uma curva padrão de concentração de ATP (Peloso et al., 2011).

3.18. Determinação da liberação de H₂O₂

Parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 (10^7 céls/mL) foram incubados em PBS com 1mM MgCl₂ na presença de 5mM de succinato, 40µM de digitonina, 1 U/mL de peroxidase de rábano (HRP), 25µM da Sonda Amplex Red (Molecular Probes®) ou antimicina A (AA) (1,5µg/mL). A fluorescência foi determinada pela excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 563 e 587nm, respectivamente, utilizando espectrofotômetro de fluorescência (Hitachi F2500) com agitação contínua (Peloso et al., 2011).

3.19. Determinação da produção de superóxido mitocondrial

A produção de O_2^- foi determinada utilizando a sonda específica para mitocôndria MitoSOX (Molecular Probes®). Primeiramente parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 (3×10^8 céls/mL) foram incubados em tampão Krebs-Henseleit (tampão KH, 15mM $NaCO_3$, 5mM KCl, 120mM NaCl, 0,7mM Na_2HPO_4 , 1,5mM NaH_2PO_4) a 28°C com 5µM de MitoSOX. Após 10 min, as células foram lavadas e resuspensas em tampão KH. Posteriormente, 10^8 céls/mL foram incubadas em tampão KH na presença de 40µM de digitonina, 5mM de succinato e 1,5µg/mL antimicina A e a detecção de MitoSOX oxidado (oxMitoSOX) foi determinada. A fluorescência foi obtida pela excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 510 e 580nm, respectivamente, utilizando espectrofotômetro de fluorescência (Hitachi F2500) com agitação contínua (Peloso et al., 2012).

3.20. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em dias diferentes, em triplicatas, e os resultados expressos com média e desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo *t*-test no Origin versão 6.0 e $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 – RESULTADOS

4.1. Obtenção do vetor de expressão pTEX-HSP70.

Para obter o vetor de expressão pTEX-HSP70, primeiramente o gene da HSP70 da *L.(L.) amazonensis* foi obtido pela técnica de PCR (Figura 3B, linha1) e clonado nos sítios *Eco* RI e *Spe* I do vetor *pGEM*[®]-*T Easy Vector* (Hu et al., 2002) (Figura 1).

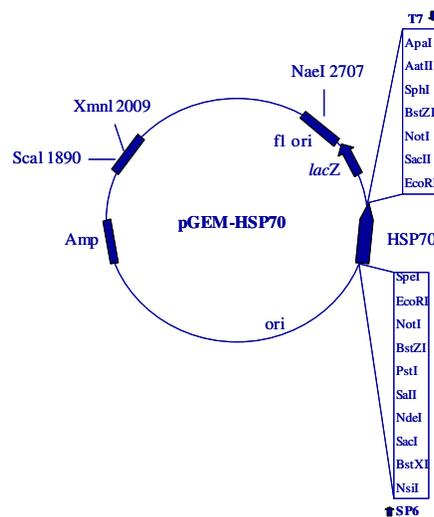


Figura 1: Vetor de expressão pGEM contendo o gene HSP70. O gene HSP70 foi clonado entre os sítios de restrição *Spe* I e *Eco* RI presente no vetor pGEM.

Após a clonagem no vetor pGEM, tratamento com enzimas de digestão e purificação do inserto, o gene HSP70 foi clonado nos sítios *Eco* RI e *Hind* III do vetor pTEX, e obteve-se o vetor de expressão pTEX-HSP70 (Figura 2).

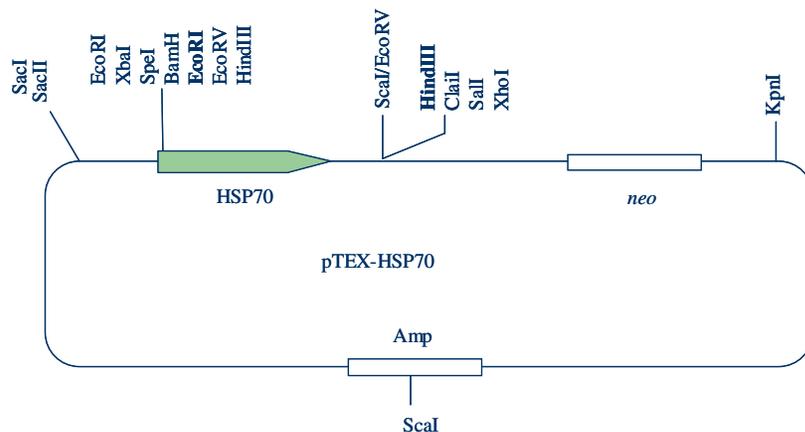


Figura 2: Vetor de expressão pTEX-HSP70. O gene HSP70 foi clonado nos sítios de restrição *Eco RI* e *Hind III* presente no vetor pTEX.

Após a obtenção do vetor, foi feita a digestão com as enzimas *Eco RI* e *Hind III*, sendo confirmada por eletroforese, a inserção do inserto no vetor (bandas 5000 pb e 2000 pb, correspondentes somente ao vetor e o inserto, respectivamente) (Figura 3A). A figura 3B mostra as etapas de clonagem descritas anteriormente.

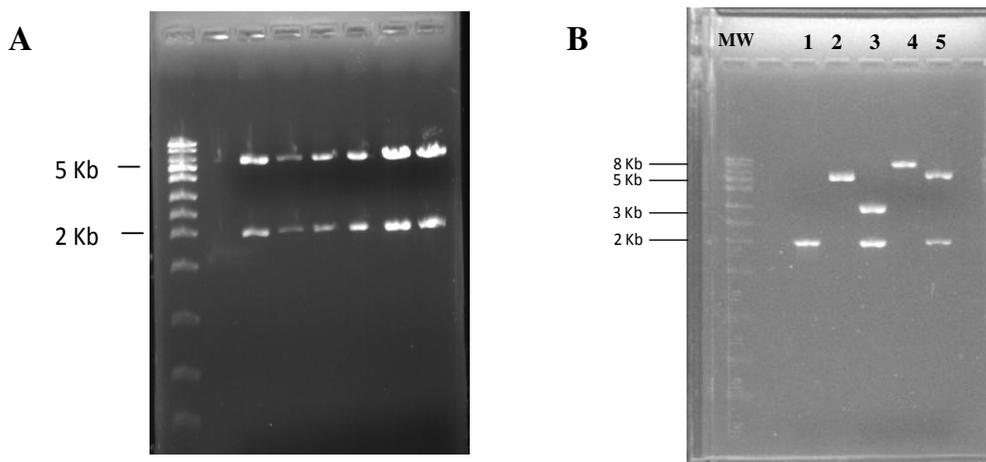


Figura 3: Eletroforese exibindo o vetor de expressão clonado digerido e as etapas de clonagem. (A) vetor pTEX-HSP70 digerido (5Kb e 2Kb) de seis colônias transformadas com o vetor; (B) linha 1: gene HSP70 amplificado (2Kb); linha 2: vetor pGEM-HSP70 (5Kb); linha 3: vetor pGEM-HSP70 digerido (3Kb e 2Kb); linha 4: vetor pTEX-HSP70 (7Kb) e linha 5: vetor pTEX-HSP70 digerido (5Kb e 2Kb). Marcador peso molecular (MW).

A presença do gene HSP70 de *L.(L.) amazonensis* no plasmídeo clonado foi confirmada com o sequenciamento do vetor pTEX-HSP70. Para análise do sequenciamento, um alinhamento foi feito entre a seqüência de bases nitrogenadas do gene HSP70 de *Leishmania* (depositado no GenBank: AY423868.1) e o resultado do sequenciamento. Obteve-se identidade de 95% confirmando a presença do gene HSP70 do parasita no vetor pTEX, além de demonstrar que o inserto estava em fase de leitura (dados não mostrados).

4.2. Obtenção da *L.(L.) amazonensis* superexpressando HSP70.

Os promastigotas de *L.(L.) amazonensis* em fase logaritmica de crescimento foram então, eletroporados na presença do vetore pTEX ou pTEX-HSP70. As células eletroporadas foram selecionadas na presença do antibiótico G418. A concentração ideal deste antibiótico foi determinada pela incubação da *L.(L.) amazonensis* WT na presença de várias doses de G418 (25 a 100µg/mL). Após duas semanas de cultivo, na presença de 50µg/mL não foram observadas células vivas e assim essa concentração foi utilizada para a seleção de células resistentes (dados não mostrados). Os promastigotas contendo o vetor pTEX ou pTEX-HSP70 resistentes ao G418 foram obtidos após 6 semanas de cultivo. Os parasitas transfectados somente com o vetor foram denominados parasitas pTEX e os parasitas transfectados com o vetor clonado foram denominados pTEX-HSP70.

O ensaio de *Western blotting*, permitiu a detecção do nível de expressão da proteína HSP70 nos parasitas pTEX e pTEX-HSP70. Na Figura 4A e B observa-se a maior intensidade de expressão da proteína HSP70 nas células pTEX-HSP70 do que nas pTEX, confirmando a superexpressão da proteína HSP70 nesses parasitas.

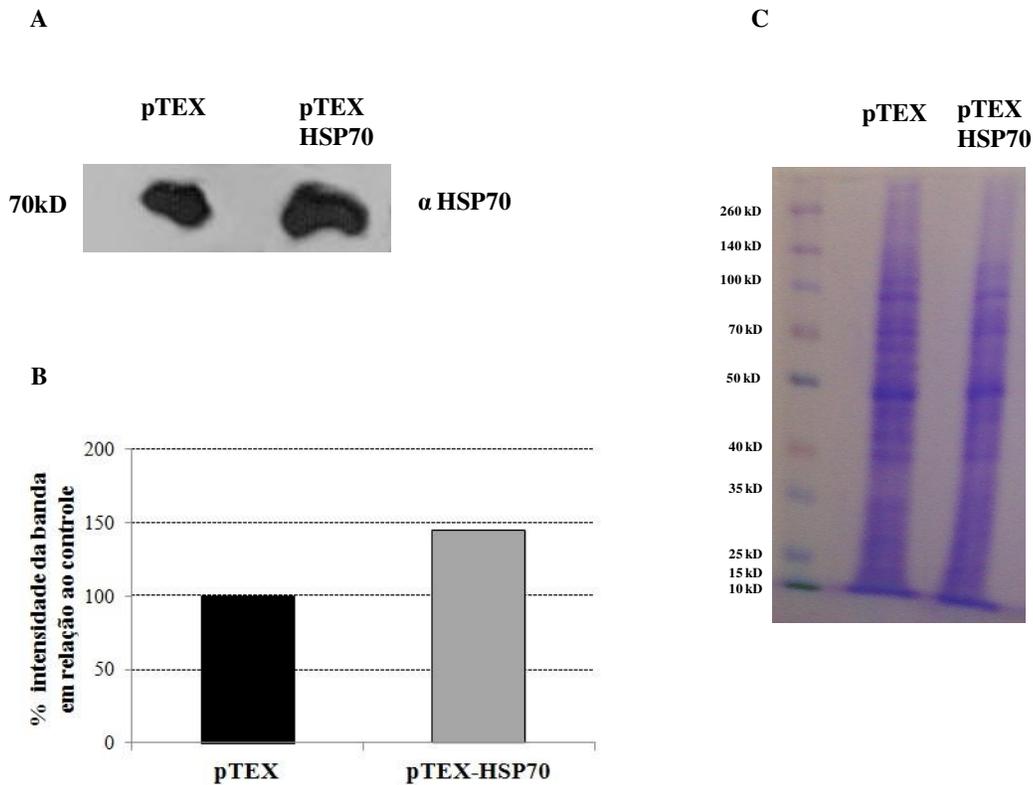


Figura 4: Superexpressão da proteína HSP70 nos parasitas pTEX-HSP70. (A) *Western blotting* da α HSP70 nos promastigotas *L.(L.) amazonensis* transfectadas com pTEX (linha 1) e pTEX-HSP70 (linha 2) cultivados em RPMI a 26°C. (B) porcentagem da intensidade das bandas que foram normalizadas com a banda pTEX, o qual foi definido como 100%. (C) Controle de *loading* com *Commassie blue* 0,1% dos parasitas transfectados pTEX (linha 1) e pTEX-HSP70 (linha 2).

4.3. Microscopia eletrônica de varredura.

Após obtenção dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70, os aspectos ultraestruturais dos promastigotas foram avaliados e, comparados com os dos parasitas WT, por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 5 e 7).

A análise qualitativa evidenciou a manutenção da morfologia celular e flagelar característica dos promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 comparados à dos parasitas WT, particularmente relativa ao corpo alongado, membrana protoplasmática íntegra, contínua e sem

danos celulares (Figuras 5-7).

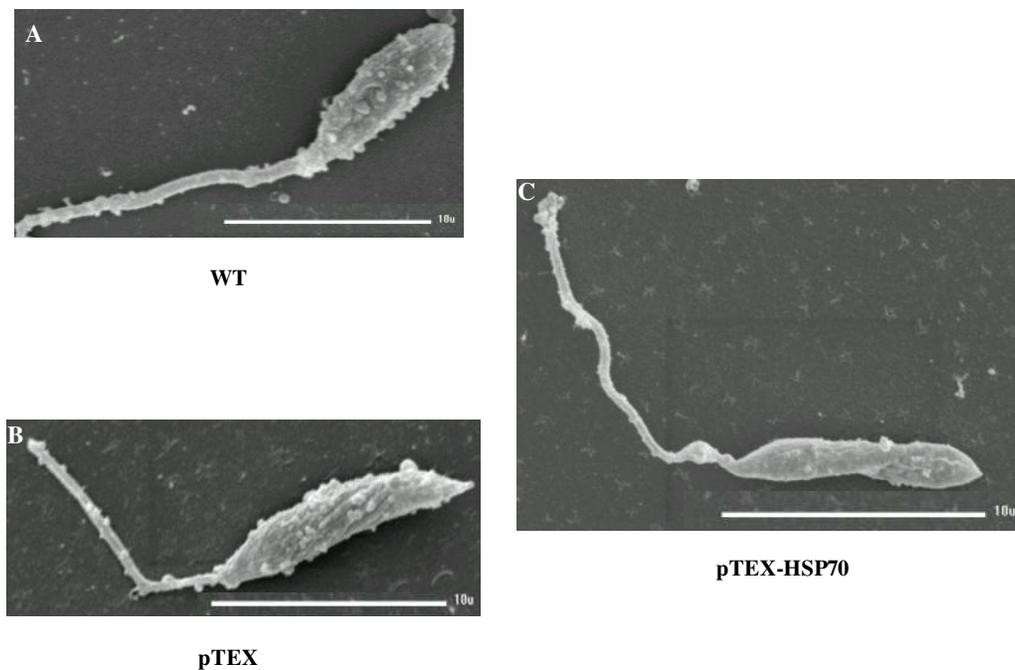


Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* WT, transfectados pTEX e pTEX-HSP70. Análise ultraestrutural superficial de parasitas selvagens (WT) (A), transfectados somente com o vetor pTEX (B) e transfectados com o vetor pTEX-HSP70 (C). Barra de escala representa 10µm para as imagens A-C.

Apesar de os parasitas transfectados apresentarem superfície celular organizada e semelhanças com os parasitas WT, o tamanho celular e flagelar dos três tipos de promastigotas pareciam diferentes e foram então quantificados. Para análises biométricas, mediu-se o comprimento celular de 20 promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70, aleatoriamente (Figura 6).

Os resultados mostraram diferenças significantes no comprimento celular dos parasitas transfectados, que se mostraram maiores, em relação aos parasitas WT (Figuras 5 e 6); e uma maior dispersão no comprimento celular dos parasitas WT quando comparado aos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 (Figura 6).

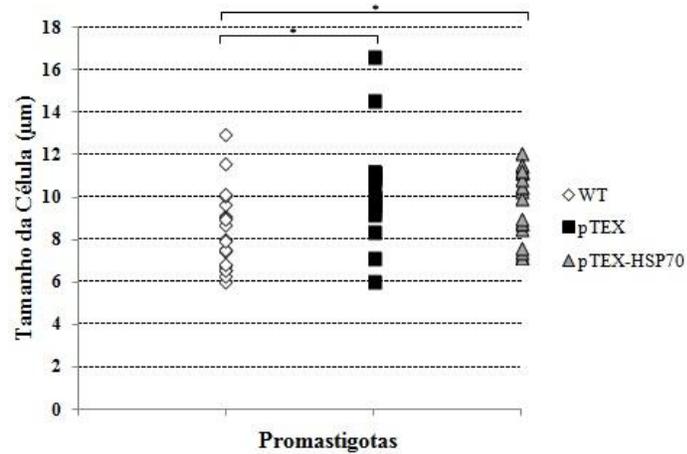


Figura 6: Medidas do comprimento celular de promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70. Promastigotas fotografados das lamina utilizadas para microscopia de varredura, analisadas quanto ao comprimento da célula com o programa *Image J*. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados, com $n=20$.

Em relação às dimensões flagelares, elas apresentaram dispersão em todos os parasitas (WT, pTEX e pTEX-HSP70). No entanto, evidências apontam diferenças significantes nos comprimentos de flagelos dos parasitas WT e pTEX-HSP70, onde o último apresentou uma tendência de flagelos mais longos (Figuras 7 e 8). A Figura 7 mostra fotos de flagelos com comprimentos representativos nas populações dos parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70.

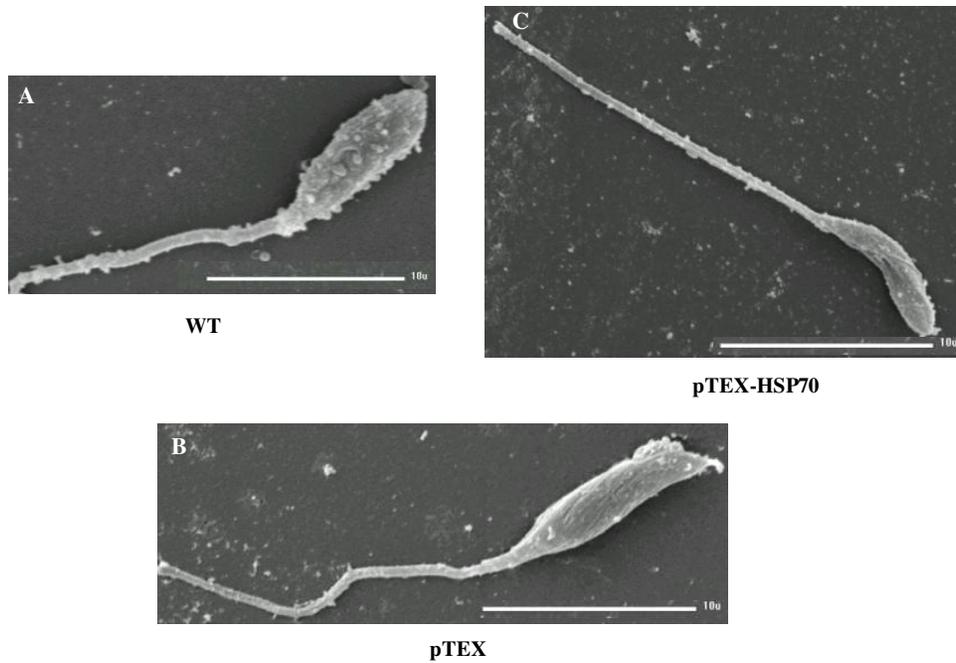


Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* WT, transfectados pTEX e pTEX-HSP70. Análise ultraestrutural superficial do flagelo de parasitas selvagens (WT) (A), transfectados somente com o vetor pTEX (B) e transfectados com o vetor pTEX-HSP70 (C). Barra de escala representa 10µm para as imagens A-C.

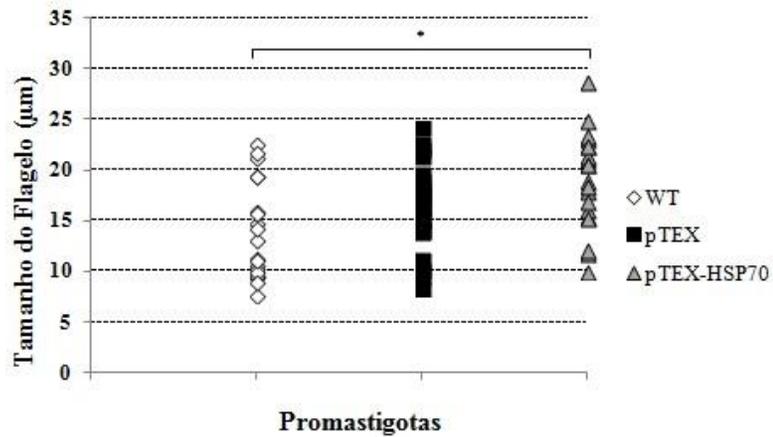


Figura 8: Medidas dos flagelos de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70. Promastigotas fotografados das lâminas utilizadas para microscopia de varredura, analisadas quanto ao comprimento flagelar da célula com o programa *Image J*. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados, com $n=20$.

Os resultados mostraram que parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram a manutenção da morfologia celular e flagelar característica de promastigotas WT. Entretanto, os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram comprimento celular maior. Em relação ao comprimento flagelar, só houve diferença significantes no tamanho dos parasitas pTEX-HSP70 comparados aos WT.

4.4. Microscopia eletrônica de transmissão.

Para verificar as características internas dos parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70, foi realizada a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 9).

A análise qualitativa permitiu observar que, em geral, as organelas celulares dos parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 exibiram características morfológicas (ultraestruturais) semelhantes e sem alterações nas estruturas. As membranas protoplasmáticas (celulares) não apresentaram protuberâncias (tipo Blebs), o que indica que o citoplasma, o arranjo do citoesqueleto e os elementos de microtúbulos estão bem organizados e que as proteínas estão bem distribuídas em torno da membrana desses parasitas. Danos mitocondriais, como por exemplo, inchaços, sinais de rompimento ou autofagia não foram observados nos promastigotas não transfectados e transfectados (Figura 9, m). Os corpos lipídicos mostraram elétrons de densidade, organização característica e contornos regulares (Figura 9, c). Os vacúolos apresentaram forma organizada, arredondados e tamanhos diversos (Figura 9, v). Os promastigotas eram na maioria das vezes mononucleados, sem distensões no envoltório nuclear, presença de heterocromatina característica na região central dos núcleos e ausência de sinais apoptóticos (Figura 9, n).

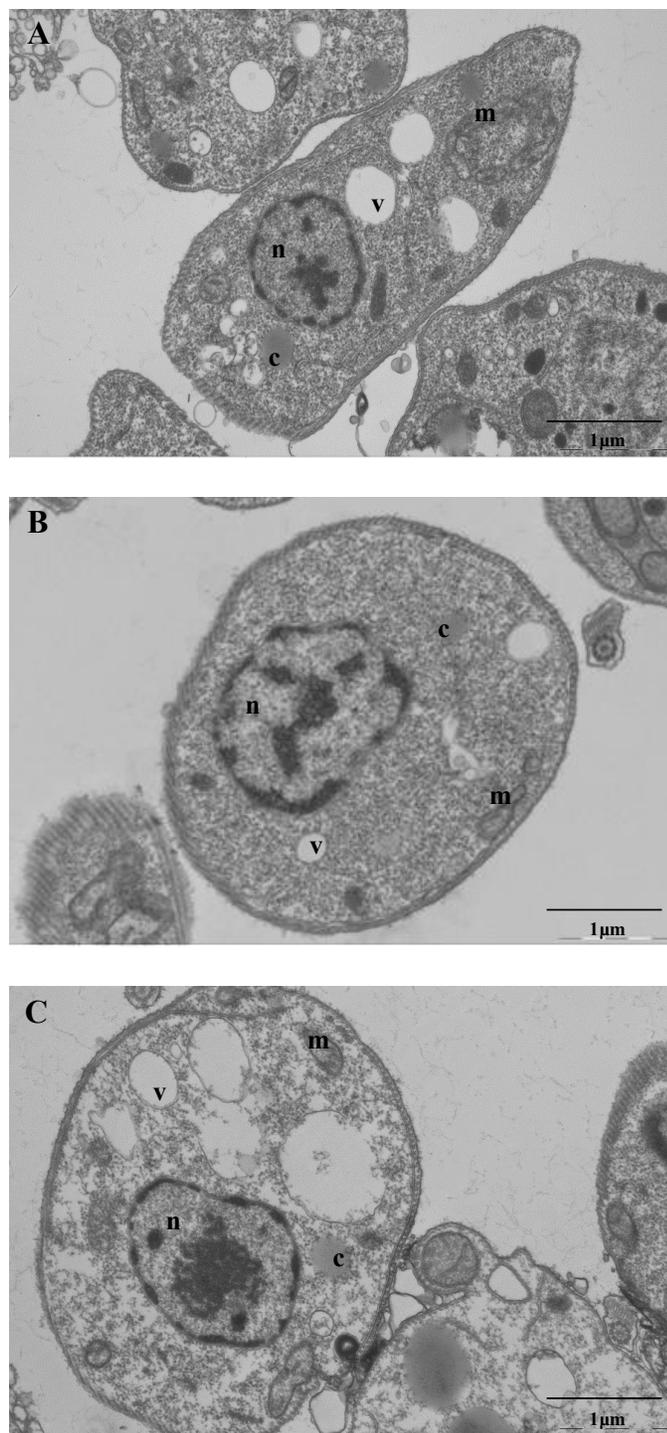


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* WT, transfectados pTEX e pTEX-HSP70. Análise ultraestrutural dos parasitas WT (A), transfectados somente com o vetor pTEX (B) e transfectados com o vetor pTEX-HSP70 (C). Nas figuras estão indicados o núcleo (n), vacúolos (v), mitocôndria (m) e corpos lipídicos (c).

A análise morfométrica das densidades de áreas das mitocôndrias, vacúolos, corpos lipídicos e núcleos foram determinadas e expressas em μm^2 com o intuito de verificar se a superexpressão da HSP70, ou mesmo o processo de transfecção, poderiam alterar algumas características das organelas dos parasitas (Figura 10). A análise comparativa dos parâmetros dos parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 não mostrou diferenças significantes em relação às densidades de áreas das mitocôndrias, vacúolos, corpos lipídicos e das células. No entanto, a quantificação permitiu detectar aumento da densidade da área nuclear nos grupos transfectados pTEX e pTEX-HSP70 quando comparada à dos parasitas WT (Figura 10D).

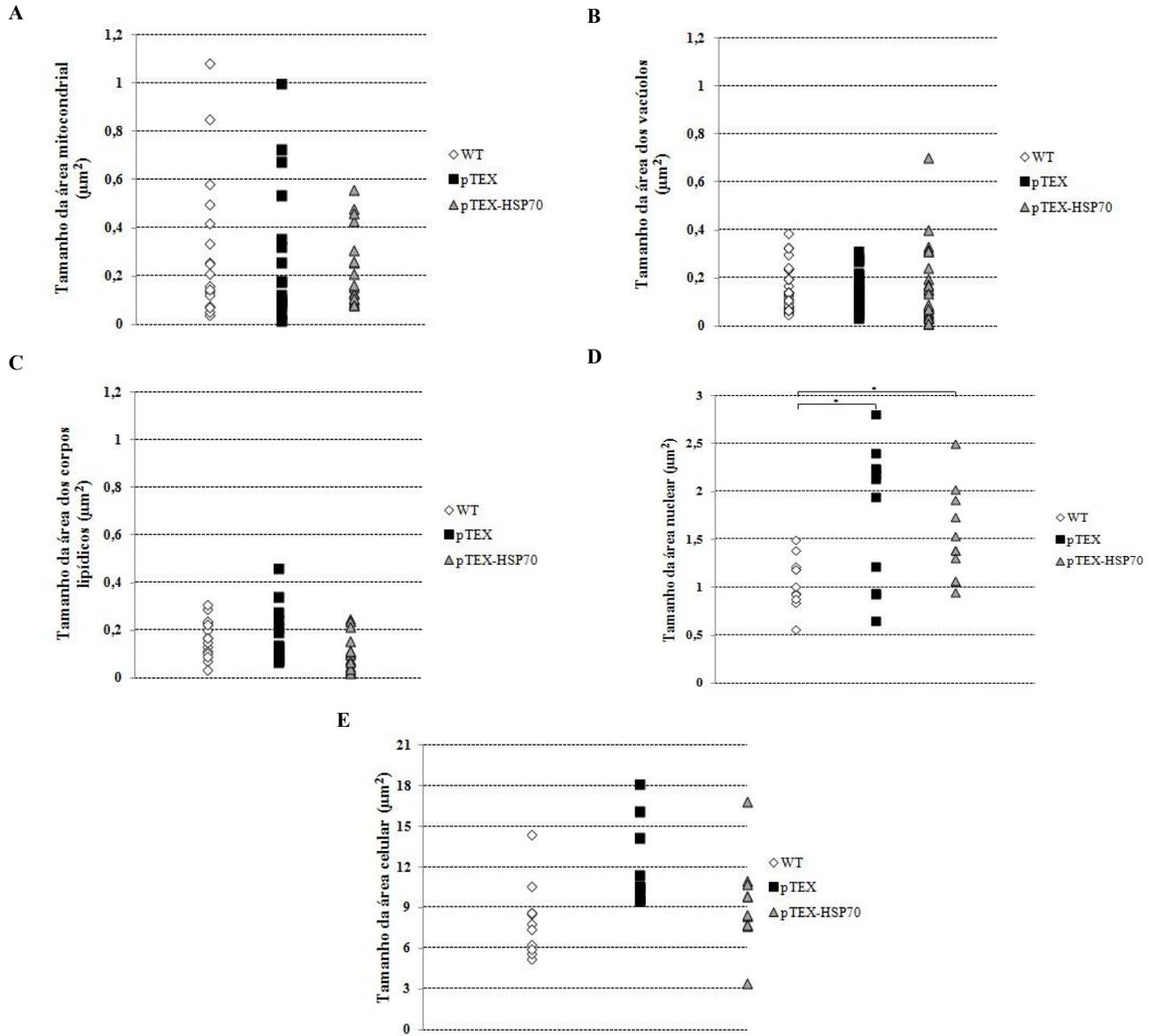


Figura 10: Densidade de área das organelas de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70. Os promastigotas foram fotografados das lamínas utilizadas para microscopia de transmissão e as áreas das organelas foram obtidas com o programa *Image J*. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados, com $n=20$ para A,B e C e $n=10$ para D e E. Áreas das mitocôndrias (A), vacúolos (B), corpos lipídicos (C), núcleos (D) e das células (E).

Os resultados obtidos das análises morfométricas das densidades numéricas de vacúolos e corpos lipídicos presentes em cada parasita não evidenciou diferenças significantes entre os promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70.

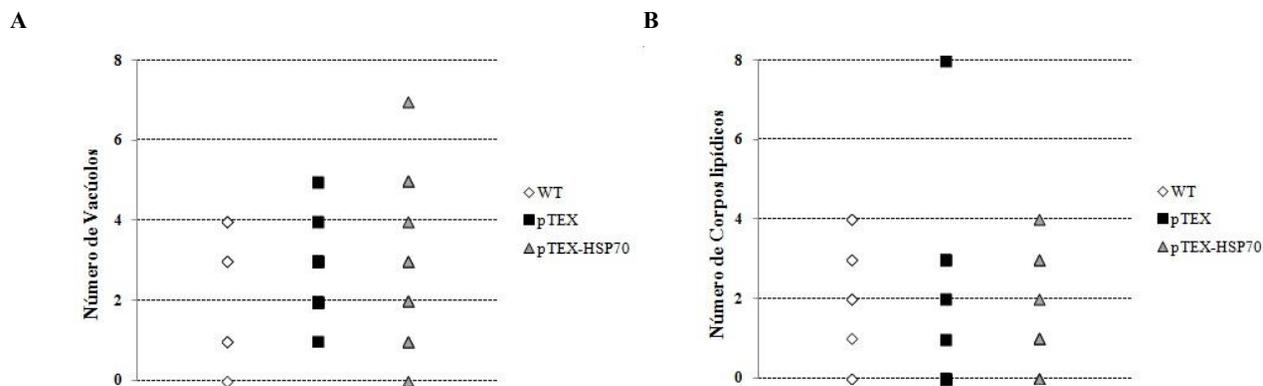


Figura 11: Densidade numérica de vacúolos (A) e corpos lipídicos (B) de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70. Os promastigotas foram fotografados das lâminas utilizadas para a microscopia de transmissão e o número das organelas foi obtido utilizando o programa *Image J*. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados, com $n=10$.

A análise ultraestrutural permitiu concluir que a superexpressão da HSP70 não modificou as estruturas internas dos parasitas. O processo de transfecção também não afetou as organelas dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70, mas houve diferenças comparados aos promastigotas WT em relação às densidade de área nuclear.

4.5. Curva de crescimento da *L.(L.) amazonensis* selvagem e transfectados.

Para verificar o padrão de proliferação dos parasitas transfectados, as curvas de crescimento foram construídas (Figura 12).

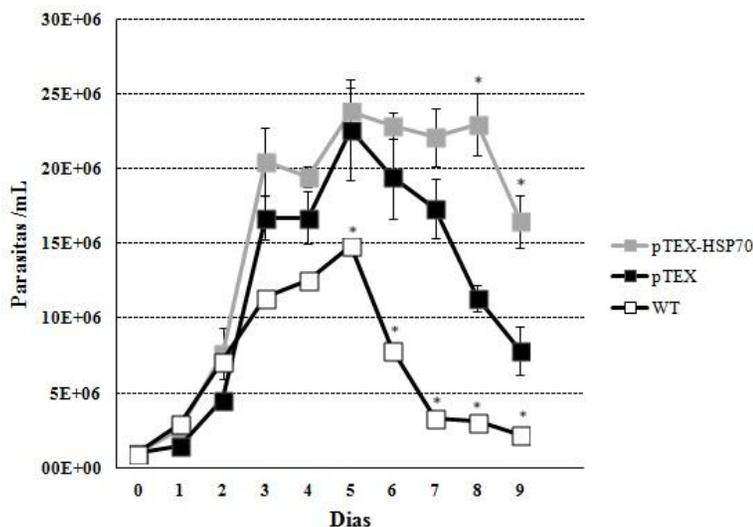


Figura 12: Curva de proliferação de promastigotas *L.(L.) amazonensis* WT (□), pTEX (■) e pTEX-HSP70 (▣). Um milhão de parasitas foi incubado em meio RPMI a 26°C e contados por nove dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados são médias de dois experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram curvas de crescimento padrão, com fases exponencial, estacionária e de declínio da replicação. Tanto parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 iniciaram uma fase logarítmica de crescimento no 3º dia de cultivo e, todos estes parasitas atingiram seu crescimento máximo no 5º dia de cultivo (Figura 12). A partir deste ponto, podemos observar que os parasitas WT não apresentaram uma fase estacionária bem estabelecida e uma capacidade proliferativa menor quando comparados aos parasitas transfectados. Isto pode ser visto no 5º dia de cultivo, onde parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram quase que 50%

a mais do número de células quando comparados aos parasitas WT (Figura 12).

Os parasitas transfectados pTEX iniciaram a fase estacionária a partir do 5º dia de cultivo e após o 7º dia ocorreu um declínio no número de células. Os promastigotas pTEX-HSP70 apresentaram fase estacionária mais longa, o número de parasitas entrou em declínio somente no 9º dia e as culturas apresentaram aproximadamente 90% a mais de parasitas do que as culturas do pTEX no 8º dia de cultura (Figura 12).

4.6. Tratamento dos parasitas transfectados com H₂O₂.

Durante a passagem do inseto vetor para o hospedeiro mamífero *Leishmania* depara com oxidantes tóxicos produzidos por macrófagos e estes EROs fazem com que a HSP70 seja mais expressa no parasita auxiliando a sua homeostase (Shonhai et al., 2011). Diante disso, a resistência dos promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 ao H₂O₂ foi avaliada, determinando-se a concentração de H₂O₂ capaz de inibir 50% da proliferação (IC₅₀) dos parasitas transfectados (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração de H₂O₂ capaz de inibir 50% da proliferação dos parasitas transfectados (IC₅₀).

Parasitas	IC ₅₀ H ₂ O ₂ (µM)
pTEX	269,5 ± 12,7
pTEX-HSP70	401 ± 4,9

Os parasitas (5x10⁶ céls/mL) foram pré- incubados em PBS com diferentes concentrações de H₂O₂ por 30 min. Após o tratamento, os parasitas foram centrifugados e resuspensos em meio RPMI. Alíquotas foram retiradas no terceiro dia de cultivo para contagem do número de células. Os resultados são representados pelas médias de dois experimentos, realizados em duplicata.

As células transfectadas que superexpressam a proteína HSP70 (parasitas pTEX-HSP70) foram mais resistentes ao H₂O₂ do que os parasitas pTEX, sendo o IC₅₀ cerca de 50% maior do que o IC₅₀ calculado sobre os parasitas pTEX.

A capacidade proliferativa dos parasitas transfectados, após o tratamento com diversas concentrações de H₂O₂ (0-1000μM), foi avaliada (Figuras 13-15). Os parasitas pTEX tratados com 250μM de H₂O₂ apresentaram redução de 50% da sua capacidade proliferativa quando comparados aos parasitas pTEX não tratados. Os parasitas pTEX-HSP70 não apresentaram diferenças significantes do número de células quando tratados ou não com 250μM H₂O₂ (Figura 13). Estes dados corroboram os resultados do IC₅₀ (Tabela 1), mostrando que os promastigotas pTEX-HSP70 são mais resistentes ao tratamento com H₂O₂ do que os promastigotas pTEX.

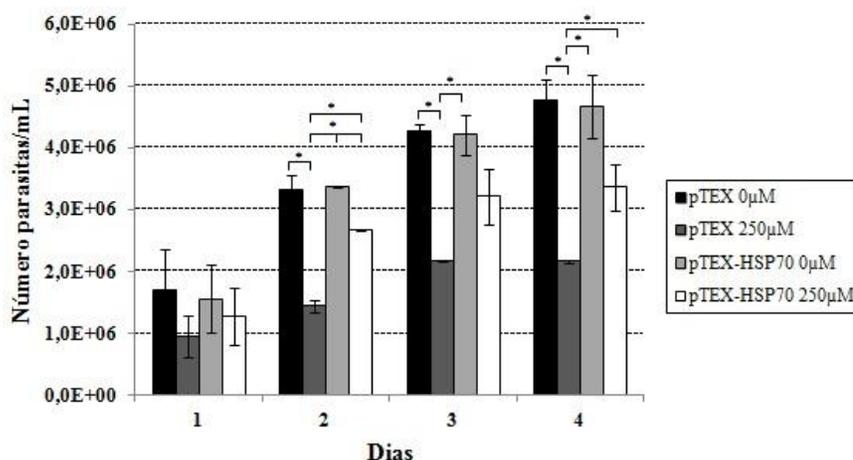


Figura 13: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento com 250μM H₂O₂. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) foram pré- incubados em PBS com 250μM de H₂O₂ por 30 minutos. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados são as médias obtidas de dois experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Nos tratamentos com 450 μ M de H₂O₂, os parasitas pTEX não proliferaram durante os 4 dias de cultivo. Da mesma forma, a partir do 2º dia, os parasitas pTEX-HSP70 diminuíram sua capacidade proliferativa em 100-150% durante os quatro dias de cultivo quando comparados aos parasitas pTEX-HSP70 não tratados com H₂O₂ (Figura 14).

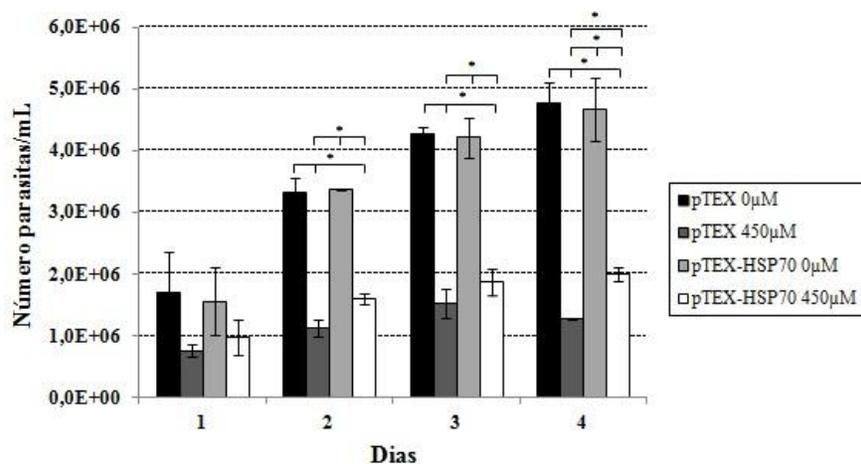


Figura 14: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento com 450 μ M H₂O₂. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) foram pré- incubados em PBS com 450 μ M de H₂O₂ por 30 minutos. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 /mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados são as médias de dois experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Nos tratamentos com 600 μ M H₂O₂ tanto os parasitas pTEX como os parasitas pTEX-HSP70 não proliferaram durante os 4 dias de cultivo (Figura 15). Nos tratamentos com concentrações superiores a 800 μ M de H₂O₂, os resultados foram semelhantes aos apresentados na Figura 15 (dados não mostrados).

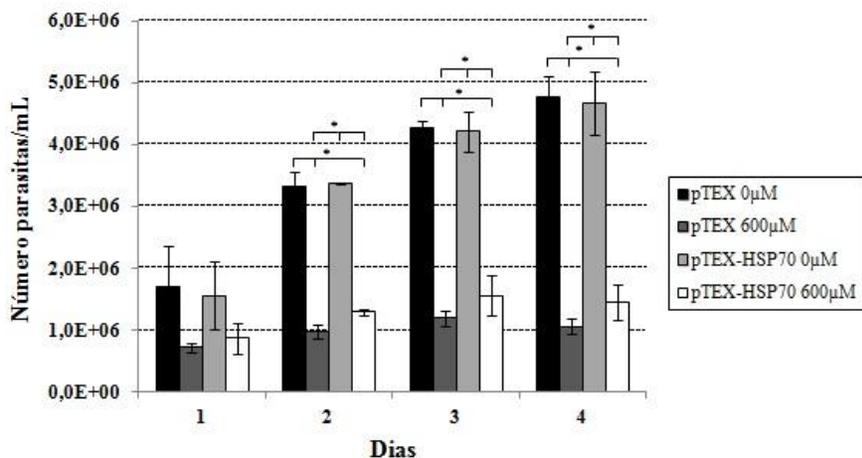


Figura 15: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento com 600µM H₂O₂. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) foram pré- incubados em PBS com 600µM H₂O₂ por 30 min. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados são as médias de dois experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Com os resultados descritos acima, conclui-se que parasitas pTEX-HSP70 são mais resistentes ao tratamento com H₂O₂ do que os parasitas pTEX.

4.7. Tratamento dos parasitas transfectados com choque térmico.

Outro tipo de estresse que os parasitas *L.(L.) amazonensis* encontram durante seu ciclo de vida é o choque térmico. Os promastigotas vivem em temperaturas de 26-28°C no interior do tubo digestivo do inseto vetor, e depois confrontam-se com temperatura de 37°C, presente no hospedeiro vertebrado, o que induz a maior expressão da HSP70 (Shonhai et al., 2011). Diante disto, foram avaliadas a resistência e a capacidade proliferativa dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 submetidos ao choque térmico.

Os parasitas pTEX submetidos a choque térmico (37°C) durante 2h apresentaram, a partir do 2º dia de cultivo, capacidade proliferativa 40-50% menor do que parasitas pTEX mantidos a 26°C (controle) (Figura 16). Interessantemente, os parasitas pTEX-HSP70 incubados a 37°C durante 2h proliferaram em taxas semelhantes ao de parasitas pTEX-HSP70 mantidos a 26°C. Portanto, com 2h de incubação a 37°C, os parasitas pTEX-HSP70 são mais resistentes ao choque térmico do que parasitas pTEX (Figura 16).

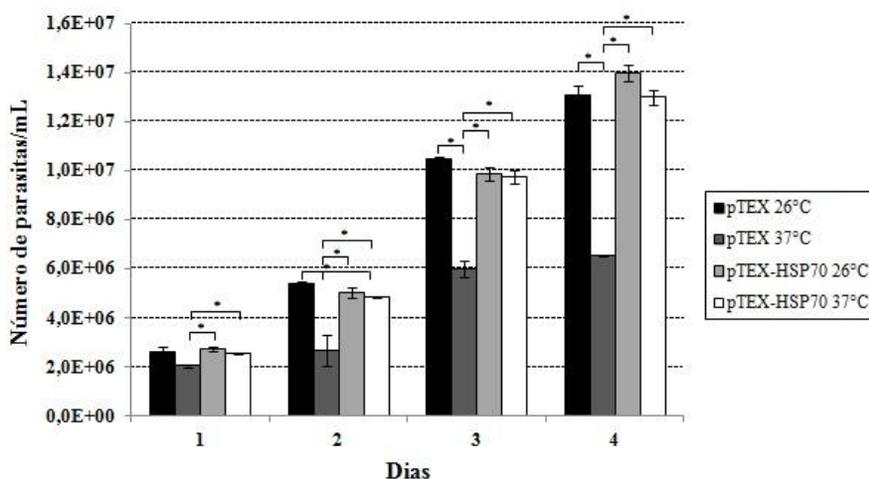


Figura 16: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 2h com choque térmico. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) em RPMI foram incubados a 26°C (C) ou a 37°C em banho-maria por 2h. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados são médias de dois experimentos realizado em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Já no tratamento por 4h com choque térmico, os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram capacidade proliferativa menor quando comparados aos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 mantidos a 26°C, durante os 4 dias de cultivo (Figura 17). Os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram, respectivamente, redução na capacidade proliferativa em torno de 65-70 e 40-60% em relação aos seus controles (Figura 17).

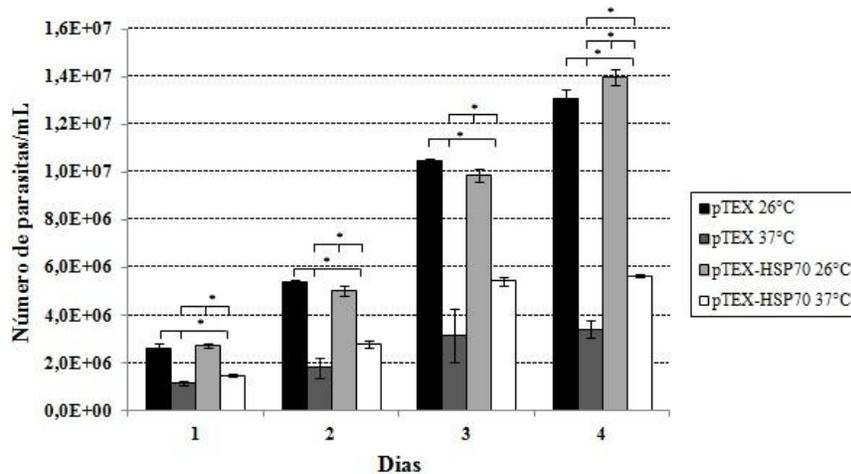


Figura 17: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após tratamento o por 4h com choque térmico. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) em RPMI foram incubados a 26°C (C) ou a 37°C em banho-maria por 4h. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados são médias de dois experimentos realizado em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

No tratamento com 6h de choque térmico tanto os parasitas pTEX como os pTEX-HSP70 não proliferaram quando comparados aos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 mantidos a 26°C (Figura 18).

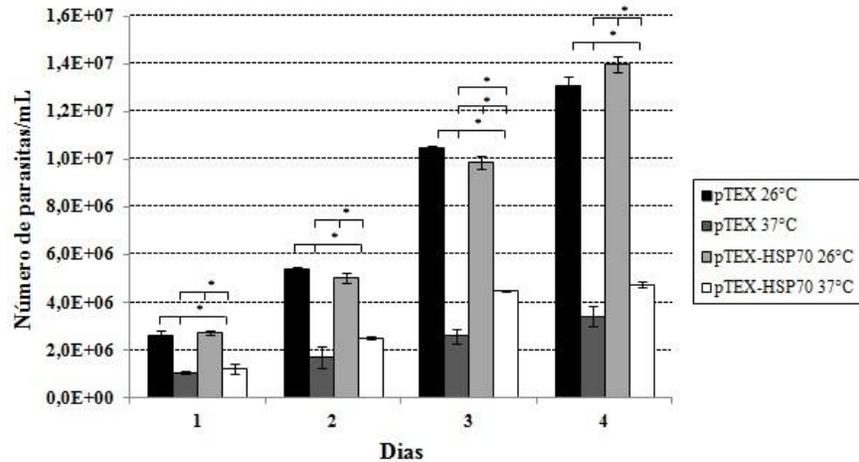


Figura 18: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 6h com choque térmico. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) em RPMI foram incubados a 26°C (C) ou a 37°C em banho-maria por 6h. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspenso em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados são médias de dois experimentos realizado em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Os resultados descritos neste item indicam que os parasitas que superexpressam a proteína HSP70 são mais resistentes ao choque térmico do que os parasitas transfectados somente com o vetor.

4.8. Exposição dos parasitas transfectados à HBO.

A oxigenação hiperbárica (HBO) consiste em um tratamento adjuvante que gera um ambiente 100% oxigenizado com uma pressão superior à atmosférica. Estudos na literatura mostram que a HBO promove toxicidade direta sobre a *L.(L.) amazonensis* provavelmente pela produção endógena de EROs por estes parasitas (Arrais-Silva et al., 2005). Devido ao ambiente oxidativo que a HBO promove, foi avaliada a capacidade proliferativa dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 expostos à HBO.

Os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 expostos durante 2h à HBO apresentaram redução do número de parasitas quando comparados aos mesmos sem exposição à HBO (Figura 19). No 3º dia de cultivo, os parasitas pTEX expostos durante 2h à HBO reduziram 30% da proliferação em relação aos parasitas pTEX sem tratamento. Já os parasitas pTEX-HSP70 com 2h de exposição à HBO apresentaram redução do número de parasitas em torno de 10% em relação ao seu controle (Figura 19), mostrando ser os parasitas pTEX-HSP70 mais resistentes ao ambiente hiperbárico.

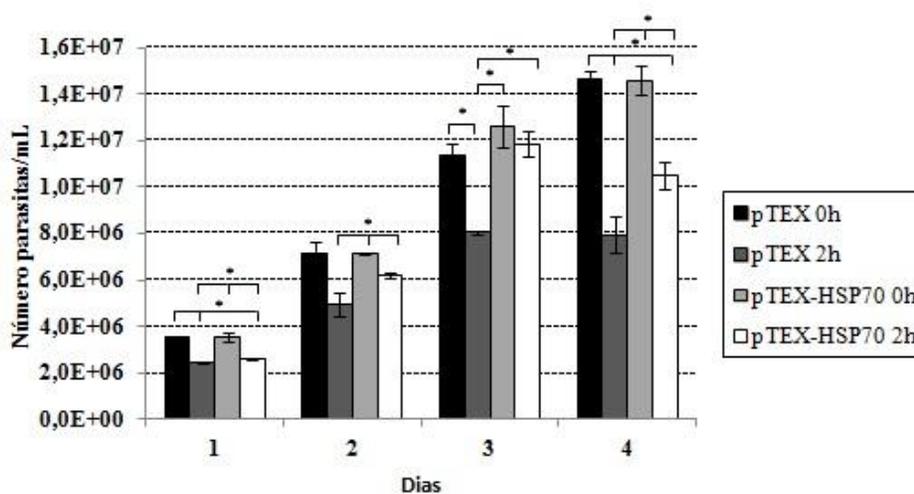


Figura 19: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 2h com HBO. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) em PBS foram expostos a condições de normóxia (150mm Hg e 1 ATA) ou à HBO (100% de O_2 , 700mm Hg e 2,5 ATA) por 2h. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. O resultado mostrado é representativo de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Na exposição durante 4h à HBO, ambos os promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 proliferaram de 70-100% menos em relação a parasitas pTEX e pTEX-HSP70 sem tratamento, exceto no 3º dia de cultivo (Figura 20).

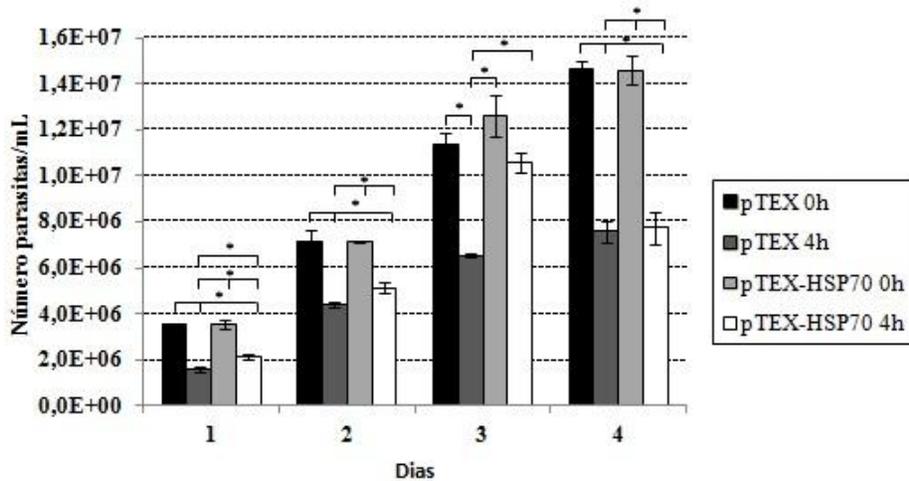


Figura 20: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 4h com HBO. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) em PBS foram expostos a condições de normóxia (150mm Hg e 1 ATA) ou à HBO (100% de O_2 , 700mm Hg e 2,5 ATA) por 4h. Após tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. O resultado mostrado é representativo de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Parasitas pTEX e pTEX-HSP70 expostos durante 6h à HBO não proliferaram nos 4 dias de cultivo e não apresentaram diferenças significantes do número de células entre eles (Figura 21).

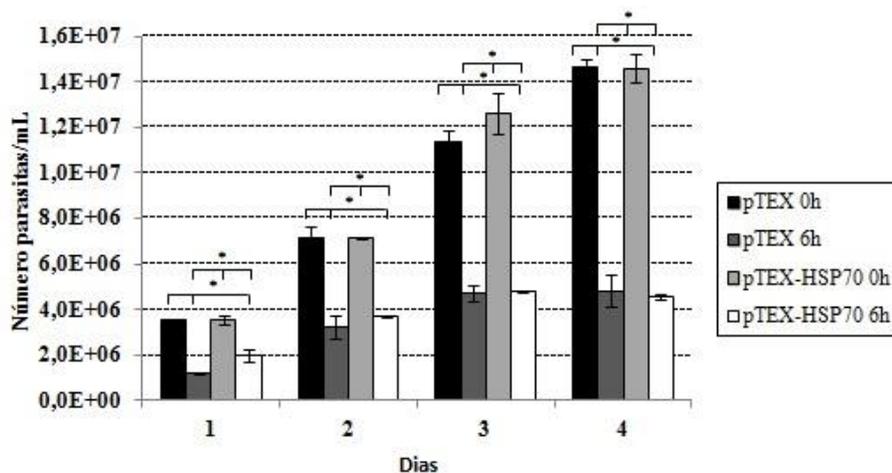


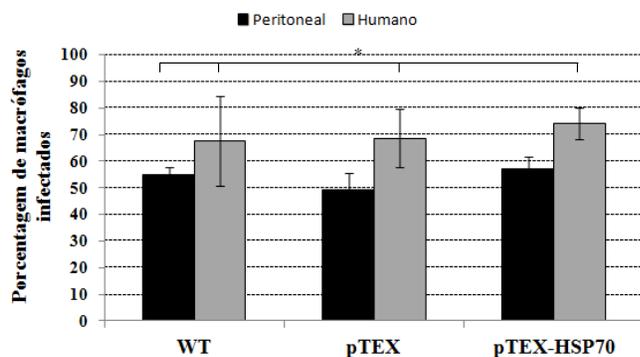
Figura 21: Gráfico da proliferação de promastigotas pTEX e pTEX-HSP70 após o tratamento por 6h com HBO. Os parasitas (5×10^6 céls/mL) em PBS foram expostos a condições de normóxia (150mm Hg e 1 ATA) ou à HBO (100% de O_2 , 700mm Hg e 2,5 ATA) por 6h. Após o tratamento os parasitas foram centrifugados, resuspensos em meio de cultura (1×10^6 céls/mL) e contados por 4 dias consecutivos em câmara de Neubauer. O resultado mostrado é representativo de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Esses resultados indicam que os parasitas pTEX-HSP70 são mais resistentes a ambientes oxidativos do que os parasitas pTEX.

4.9. Infecções de macrófagos *in vitro* com *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70.

Para verificar se a capacidade infectiva dos parasitas que superexpressam HSP70 foi alterada *in vitro*, inicialmente, macrófagos peritoneais murinos ou humanos foram infectados com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70. Os macrófagos peritoneais e humanos foram incubados com os parasitas por 24 e 48h, respectivamente, para avaliar a capacidade de os parasitas se manterem intracelularmente (Figura 22).

A



B

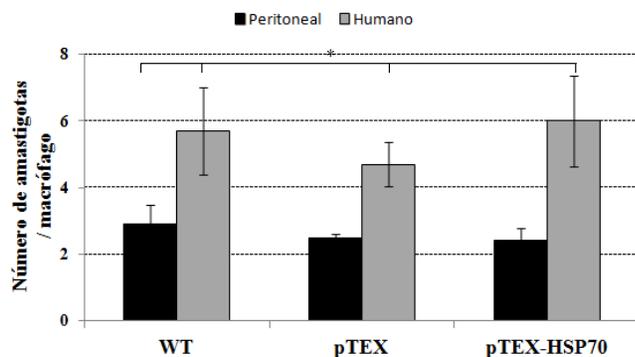


Figura 22: Infecção de macrófagos peritoneais e humanos incubados com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 (A) e o número de amastigota por macrófago (B). Os macrófagos peritoneais (5×10^5 céls/mL) foram infectados com 10 promastigotas: 1 macrófago por 2h a 37°C, lavados e mantidos por 24h a 37°C (24h). Os macrófagos humanos (5×10^5 céls/mL) foram infectados na proporção de 10 promastigotas: 1 macrófago durante 24h a 34°C e mantidos por 24h a 37°C. Após as infecções, os macrófagos foram lavados, fixados e corados com Giemsa. A porcentagem de infecção e o número de amastigotas foram determinados baseado na contagem de 200 células por lâmina em triplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Os macrófagos peritoneais infectados com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 durante 24h, não apresentaram diferenças tanto na porcentagem de células infectadas (em torno de 49-57%) como no número de amastigotas intracelulares (taxas em torno de 2 amastigotas/macrófago) (Figura 22).

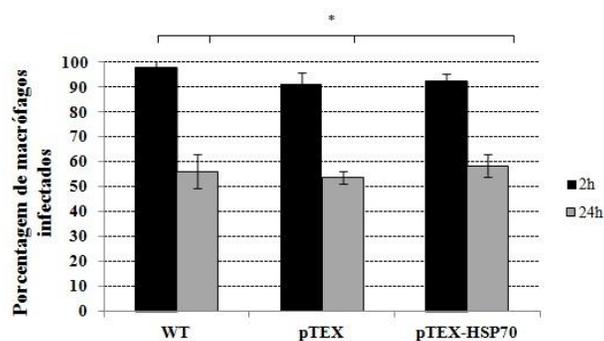
As culturas de macrófagos humanos foram infectadas durante 48h com os promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70 e mostraram que a porcentagem de macrófagos infectados (65-74%) e o número de amastigotas intracelulares (5 a 7 amastigotas/macrófago), é semelhante entre os três tipos de parasitas.

Os dados indicam que não há diferenças na capacidade infectiva dos parasitas transfectados em relação aos parasitas WT, tanto em macrófagos murinos como em humanos, sugerindo que a modificação genética (transfecção) não interfere na capacidade infectiva dos parasitas. Além disso, os resultados apontam que a superexpressão da proteína HSP70 também não interfere na capacidade infectiva dos parasitas pTEX-HSP70.

4.10. Infecções de macrófagos *in vitro* com *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70 submetidos a choque térmico.

Para verificar se com algum tipo de estresse, os parasitas poderiam alterar sua capacidade infectiva, os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 foram previamente submetidos ao choque térmico (2h a 37°C) e incubados com macrófagos peritoneais murinos por 2 e 24h. Não houve diferenças significantes da porcentagem de infecção e do número de amastigotas intracelulares nas culturas infectadas com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 com 2h (cerca de 95% macrófagos infectados e 6 amastigotas/macrófago) ou com 24h de infecção (cerca de 55% macrófagos infectados e 3 amastigotas/macrófago) (Figura 23).

A



B

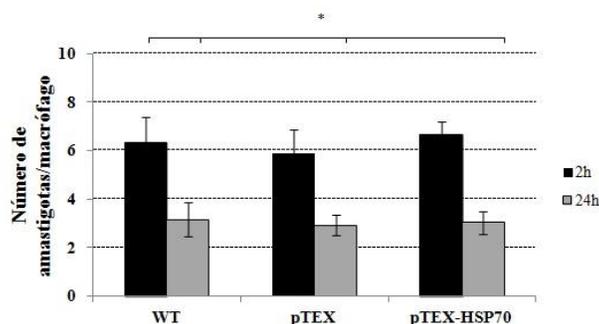


Figura 23: Infecção de macrófagos peritoneais com parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 (A) e o número de amastigota por macrófago (B) em condições de choque térmico. Os promastigotas foram previamente tratados com choque térmico por 2h a 37°C em banho maria. Os parasitas foram então incubados com os macrófagos peritoneais (5×10^5 céls/mL) na proporção (10 promastigotas: 1 macrófago) durante 2h a 37°C, lavados e corados com Giemsa (2h) ou incubados por mais 24h a 37°C (24h) e coradas com Giemsa. A porcentagem de infecção e o número de amastigotas por macrófago foram determinados e baseada na contagem de 200 células por lamínula em triplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

4.11. Infecções de macrófagos *in vitro* com *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70 e tratados com glucantime.

Para avaliar a suscetibilidade dos parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 a um fármaco utilizado no tratamento das leishmanioses, os macrófagos peritoneais murinos foram infectados com os parasitas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 e tratados com Glucantime.

As culturas de macrófagos infectadas com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 e tratadas com 16µg/mL de glucantime (concentração obtida de Fernández e colaboradores (2012) e previamente adaptada em nosso laboratório) também não apresentaram diferenças entre as taxas de células infectadas e o número de parasitas intracelulares (Figura 24). A concentração de glucantime (16µg/mL) utilizada nos experimentos não foi tóxica para os macrófagos, como pode ser visto na Figura 25.

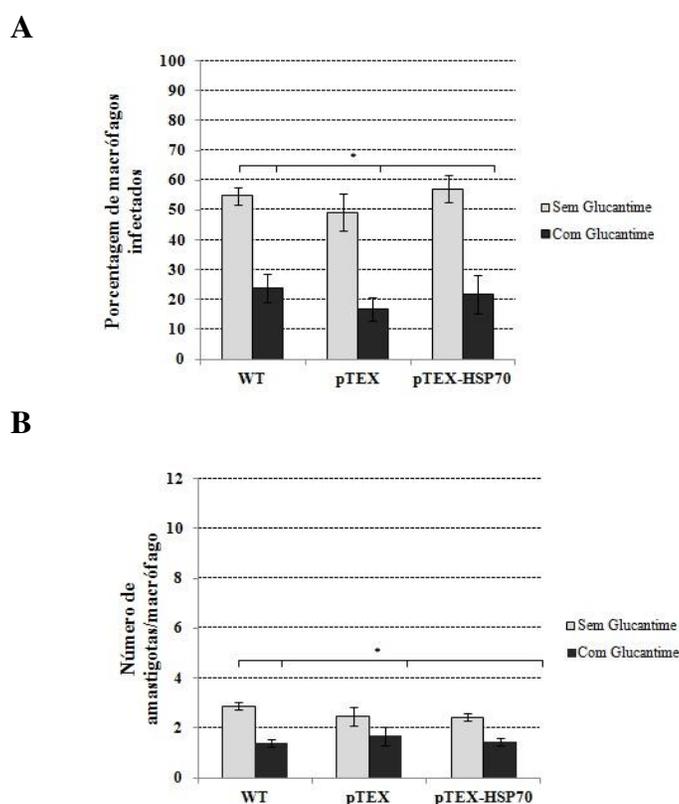


Figura 24: Infecção de macrófagos peritoneais incubados com parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 (A) e o número de amastigota por macrófago (B) tratados ou não com Glucantime. Os macrófagos peritoneais (5×10^5 céls/mL) foram infectados com 10 promastigotas: 1 macrófago por 2h a 37°C. Após, as células foram lavadas e incubadas ou não com 16µg/mL de Glucantime por 24h a 37°C. Após o tratamento as células foram lavadas, fixadas e coradas com Giemsa. A porcentagem de infecção e o número de amastigotas foram determinados baseados na contagem de 200 células por lâmina em triplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

Como esperado, houve redução da carga parasitária das culturas tratadas com glucantime em relação às culturas não tratadas tanto da porcentagem de macrófagos infectados (redução em torno de 50%) (Figura 24 A) como do número de amastigotas intracelulares (redução em torno de 50% de amastigota/macrófago) (Figura 24B). Isto pode ser exemplificado na Figura 25 que mostra redução do número de amastigotas (apontada por setas) no interior dos macrófagos.

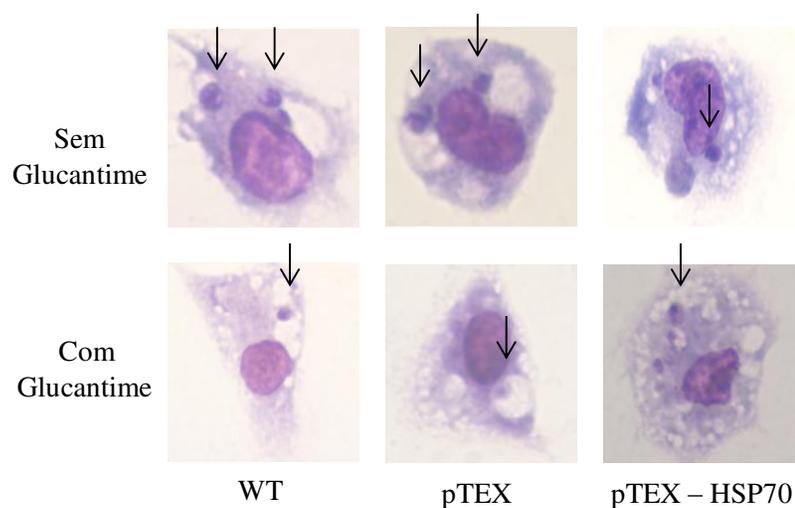


Figura 25: Fotos representativas das culturas de macrófagos peritoneais incubados com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 tratadas ou não com Glucantime. Os macrófagos peritoneais (5×10^5 cél/mL) foram infectados na proporção 10 promastigotas: 1 macrófago durante 2h a 37°C. Após as células foram lavadas e incubadas ou não com 16 μ g/mL de Glucantime durante 24h a 37°C. Após o tratamento as células foram lavadas, fixadas, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico. As setas apontam os amastigotas no interior dos macrófagos. (1000X).

4.12. Infecções de camundongos BALB/c com *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70.

Com o objetivo de avaliar a capacidade infectiva dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 *in vivo*, camundongos BALB/c fêmeas foram inoculados com formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* não transfectadas ou transfectadas. O tamanho da lesão da pata direita traseira induzida pelos parasitas foi medido com um paquímetro, semanalmente, e comparado com o tamanho da pata esquerda não infectada.

O curso da infecção induzida pelos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 na pata dos camundongos BALB/c está representada na Figura 26. A lesão induzida pelos parasitas pTEX-HSP70 ($0,05 \pm 0,001\text{mm}$, 4ª semana), foi maior que a lesão induzida pelo parasita pTEX ($0,026 \pm 0,005\text{mm}$, 4ª semana) no início da infecção. Após a 7ª semana de infecção, as lesões induzidas pelos parasitas pTEX e pTEX-HSP70, foram semelhantes ($0,105 \pm 0,012\text{mm}$ para pTEX e $0,114 \pm 0,005\text{mm}$ para pTEX-HSP70, na 8ª semana). A partir da 11ª semana de infecção os camundongos infectados com parasitas pTEX apresentaram lesão maior ($0,31 \pm 0,025\text{mm}$) do que a dos camundongos infectados com pTEX-HSP70 ($0,22 \pm 0,046\text{mm}$). Em estágios mais crônicos da infecção o tamanho das lesões induzidas pelos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 foram semelhantes ($0,56 \pm 0,266\text{mm}$ para pTEX e $0,57 \pm 0,06$ para pTEX-HSP70, na 17ª semana) (Figura 26A).

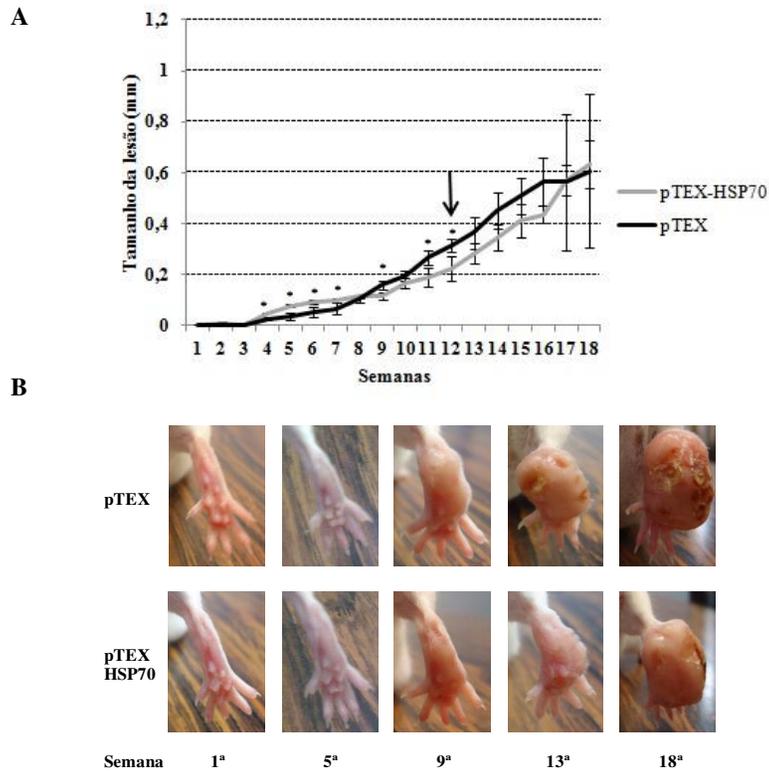


Figura 26: Infecção de camundongos BALB/c com promastigotas pTEX e pTEX-HSP70. (A) 1×10^7 promastigotas em 20 μ L de PBS foram inoculados via subcutânea no coxim plantar da pata traseira direita de camundongos BALB/c de parasitas pTEX (linha preta) e pTEX-HSP70 (linha cinza). As lesões foram medidas semanalmente com auxílio de um paquímetro. (B) Fotos da pata direita traseira infectada com parasitas pTEX (linha cima) e pTEX-HSP70 (linha baixo). Os resultados mostrados são representativos de dois experimentos independentes. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

A Figura 26B mostra fotos representativas das lesões dos camundongos BALB/c infectados com os parasitas pTEX e pTEX-HSP70. Interessantemente, nota-se que as lesões de animais infectados com parasitas pTEX foram mais ulcerosas do que as lesões de animais infectados com parasitas pTEX-HSP70 (13^a e 18^a semana).

Como na 12^a semana de infecção, as lesões induzidas pelos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 eram de tamanhos diferentes (Figura 26), foi realizada a análise da carga parasitária de amastigotas presentes nas lesões de camundongos infectados com os parasitas transfectados e WT (Figura 27). Verificou-se que na 12^a semana o tamanho das lesões de animais infectados com

parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 eram de $1,03 \pm 0,084$ mm (dados não mostrados), $0,31 \pm 0,025$ mm e $0,22 \pm 0,046$ mm, respectivamente (Figura 26A). O número total de amastigotas presentes nas lesões induzidas por esses parasitas foi $2,91 \times 10^9 \pm 0,41$; $1,15 \times 10^9 \pm 0,014$ e $0,77 \times 10^9 \pm 0,014$ amastigotas, respectivamente (Figura 27A). Estes dados indicam que quanto maior a lesão, maior foi o número de parasitas presentes na lesão.

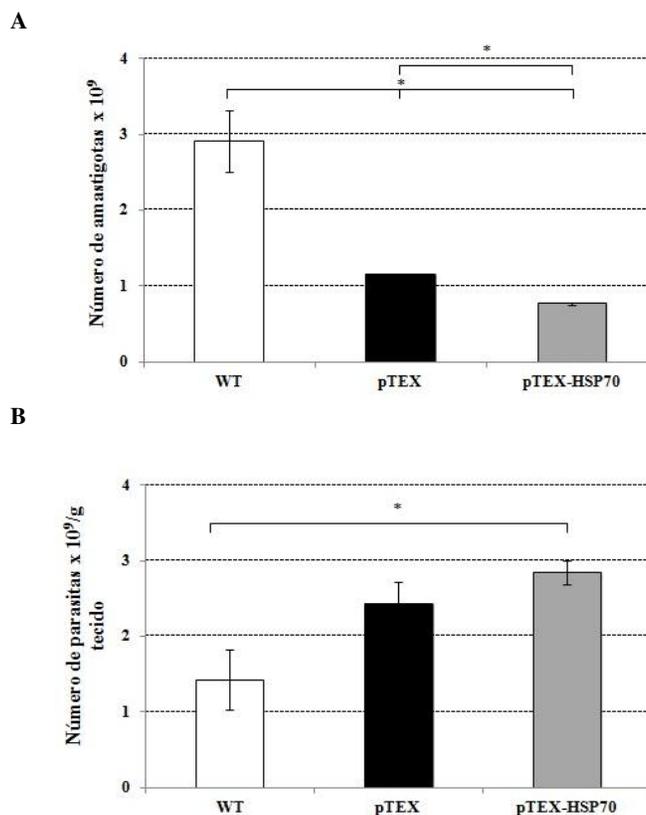


Figura 27: Carga parasitária na pata de camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* WT, pTEX e pTEX-HSP70. 1×10^7 promastigotas em $20 \mu\text{L}$ de PBS foram inoculados via subcutânea no coxim plantar da pata traseira direita de camundongos BALB/c. Após 12 semanas, os amastigotas foram extraídos da pata direita do camundongo e determinado o número total de amastigotas (A) e o número de amastigotas por grama de tecido (B). Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$) para os grupos indicados.

A carga parasitária das lesões dos camundongos infectados com os parasitas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 está representada na Figura 27B. Interessantemente, as cargas parasitárias (relação entre o número de amastigotas totais por grama de tecido) presentes nas lesões dos

camundongos infectados com parasitas pTEX e pTEX-HSP70 ($2,43 \times 10^9 \pm 0,282$ amastigotas/g tecido e $2,85 \times 10^9 \pm 0,162$ amastigotas/g tecido) foram superiores às cargas parasitárias presentes nas lesões de camundongos infectados com parasitas WT ($1,42 \times 10^9 \pm 0,395$ amastigotas/g tecido) (Figura 27B). Além disso, não houve diferenças significantes entre as cargas parasitárias presentes nas lesões induzidas por parasitas pTEX e pTEX-HSP70 (Figura 27B).

Para verificar se ocorreu visceralização no baço e fígado dos camundongos infectados com os parasitas WT, pTEX ou pTEX-HSP70, foi realizado *imprint* desses órgãos em animais com 12 semanas de infecção. As lâminas com o *imprint* de cada órgão foram fixadas, coradas e o número de amastigotas intracelulares presente em cada órgão foi determinado (Tabela 2).

Tabela 2: Dados da contagem de parasitas em *imprint* de baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com promastigotas WT, pTEX e pTEX-HSP70.

	BAÇO	FÍGADO
WT	1,1	0
pTEX	1,3	0
pTEX-HSP70	1,8	0

1×10^7 promastigotas em 20 μ L de PBS foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar da pata traseira direita de camundongos BALB/c. Após 12 semanas, um *imprint* de baço e fígado dos animais foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. O número de amastigotas intracelulares foi determinado pela contagem de 200 células.

Nos baços dos camundongos infectados com os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 foram encontrados $1,3 \pm 0,34$ e $1,8 \pm 0,07$ amastigotas por macrófago e nos baços de camundongos infectados com parasitas WT $1,1 \pm 0,001$ amastigota por macrófago (Tabela 2). Não foram encontrados indícios de visceralização nos fígados dos camundongos infectados com parasitas

consumo de oxigênio dos parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 o succinato foi adicionado nos experimentos como um doador de elétrons para o complexo II da cadeia respiratória. A digitonina também foi adicionada aos experimentos com o intuito de permeabilizar a membrana plasmática dos parasitas, permitindo que os substratos fossem internalizados e assim utilizados pelas células. O consumo de oxigênio dos parasitas transfectados está representado na Figura 29. Os parasitas pTEX-HSP70 apresentaram taxas de consumo de oxigênio de $2,97 \pm 0,35 \text{ nmol. min}^{-1}$, o que representa um consumo quase que 50% maior do que o utilizado pelos parasitas pTEX ($2 \pm 0,18 \text{ nmol. min}^{-1}$) (Figura 29A).

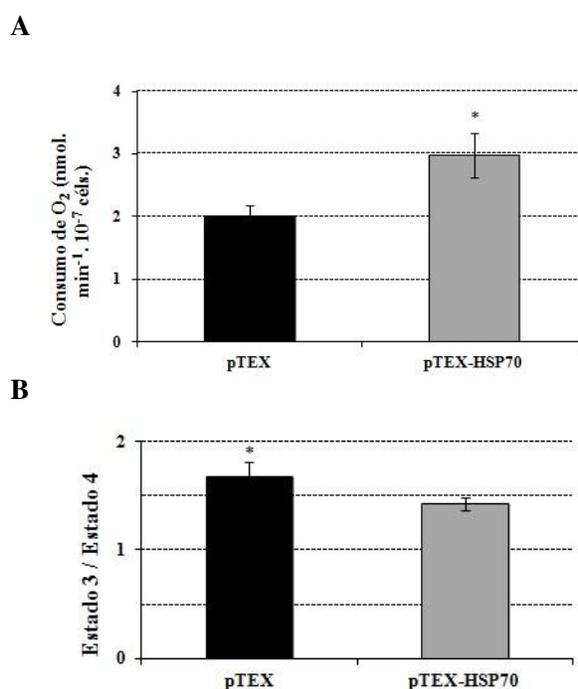


Figura 29: Consumo de oxigênio e controle respiratório dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70. (A) Promastigotas (céls/mL) foram incubados no tampão de respiração na presença de 40 μ M de digitonina e 5mM de succinato e (B) 400 μ M ADP (Estado 3), 1 μ g/mL de oligomicina (Estado 4) para determinar a razão do controle respiratório (RCR) (Estado 3/Estado 4). Os dados representam a média de três experimentos independentes feitos em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$).

A partir do consumo de oxigênio pode-se determinar o controle respiratório (CR) dos parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 pela razão entre o Estado 3 e o Estado 4. A adição primeiramente de ADP gera um estímulo no consumo de O₂ (Estado 3) e após a adição de oligomicina há um bloqueio na produção de ATP diminuindo o consumo de O₂ (Estado 4) (Figura 29B). Os parasitas pTEX apresentaram consumo de O₂ inferior aos parasitas pTEX-HSP70 e seu controle respiratório foi em torno de 1,67, o que corresponde a 15% superior ao controle respiratório apresentado por parasitas pTEX-HSP70 (CR=1,47). Esse CR menor sugere um desacoplamento da cadeia respiratória o que justifica as taxas de consumo de oxigênio observadas (Figura 29A).

Entretanto, pelo fato de os parasitas pTEX-HSP70 apresentarem um controle respiratório menor, foi investigado se a produção de ATP estaria sendo afetada. Assim, a produção de ATP intracelular dos parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 foi avaliada (Figura 30).

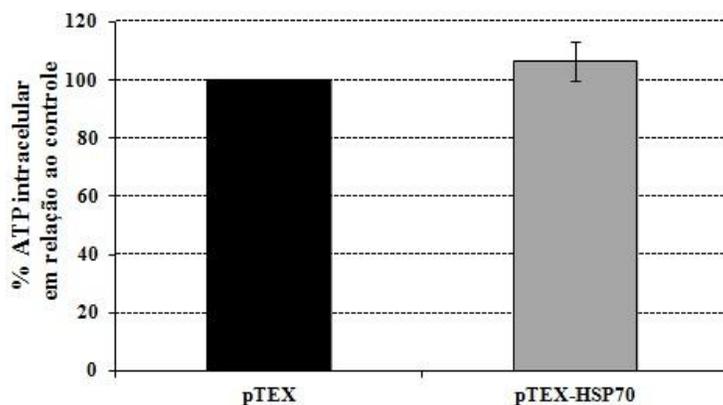


Figura 30: Porcentagem de ATP intracelular produzido por promastigotas pTEX-HSP70 em relação às células controle. Os níveis de ATP intracelular foram determinados com 10⁸ céls/mL de acordo com o protocolo do fabricante. Os dados representam a média de dois experimentos independentes feitos em duplicata. Análise estatística: *t*-test (*p* > 0,05).

De acordo com a Figura 30, a porcentagem de ATP intracelular produzido por parasitas pTEX-HSP70 em relação aos parasitas pTEX, mostrou ser apenas 6% superior, mas esta pequena diferença não é significativa.

Os resultados obtidos até aqui mostram que os parasitas pTEX-HSP70 consomem mais oxigênio do que os parasitas controle, apesar de apresentarem um controle respiratório menor que não influencia na sua produção de ATP.

4.14. Produção de espécies reativas de oxigênio pelos parasitas transfectados.

Com o intuito de verificar se a superexpressão da proteína HSP70 poderia alterar as taxas de produção de EROs, parasitas pTEX e pTEX-HSP70 foram incubados com diferentes tipos de sondas para a detecção da liberação de H_2O_2 e do radical $O_2^{\cdot-}$.

A liberação de H_2O_2 pelos parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 esta representada na Figura 31.

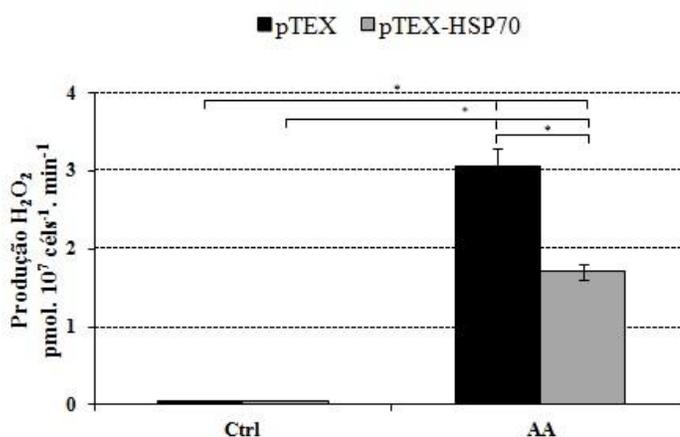


Figura 31: Células pTEX liberam mais H_2O_2 do que células pTEX-HSP70 com a inibição da cadeia respiratória mitocondrial. 10^7 céls/mL foram incubadas em PBS com 1mM $MgCl_2$ na presença de 40 μ M de digitonina, 5 mM de succinato, 1 U/mL HRP, 25 μ M de Amplex Red (Ctrl) ou com 1,5 μ g/mL de antimicina A (AA). Os dados representam a média de três experimentos independentes feitos em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p < 0,05$).

Em condições basais, baixas concentrações de H_2O_2 foram liberadas por ambos os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 (Figura 31, Ctrl). Nessas condições, não foi possível estabelecer diferença na liberação de H_2O_2 entre os parasitas estudados. Por este motivo o mesmo experimento foi repetido na presença de antimicina A (AA). Este antibiótico possui a função de bloquear o complexo III da cadeia transportadora de elétrons, o que possibilita o maior vazamento de elétrons e, conseqüentemente, a maior formação de EROs. Os parasitas pTEX quando incubados na presença de AA apresentaram taxa de liberação de H_2O_2 aproximadamente 80% maior do que a liberada pelos parasitas pTEX-HSP70 (Figura 31, AA).

A detecção da produção do radical superóxido pelos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 também foi avaliada e está representada na Figura 32.

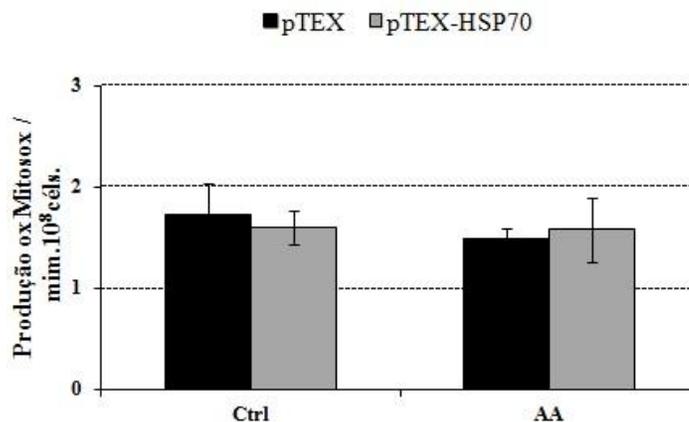


Figura 32: Produção de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial é a mesma entre os promastigotas transfectados. Células pTEX ou pTEX-HSP70 (10^8 cél/mL) foram carregadas com a sonda fluorescente MitoSox na presença do tampão KH por 10 min. Após as células foram lavadas e incubadas em tampão KH na presença de $40\mu M$ de digitonina, $5mM$ de succinato (Ctrl) e com $1,5\mu g/mL$ de antimicina A (AA). Os dados representam a média de três experimentos independentes feitos em duplicata. Análise estatística: *t*-test ($p > 0,05$).

Em condições basais a produção de O_2^- pelos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 foram de 1,73 e 1,6 Mitosox oxidado por $mim.10^8$ cels., respectivamente, não apresentando diferenças significantes entre eles. Quando os parasitas foram incubados na presença de AA também não apresentaram diferenças na produção de O_2^- (1,49 e 1,58 de mitosox oxidado por $mim.10^8$ céls) (Figura 32).

Os resultados obtidos com a produção de EROs mostraram que os parasitas pTEX-HSP70 apresentam diferenças apenas na liberação de H_2O_2 em relação ao seu controle, mostrando que a superexpressão da proteína HSP70 está relacionada apenas com este tipo de EROs.

5 – DISCUSSÃO

As proteínas HSP70 são chaperonas moleculares expressas em uma diversidade de organismos (Priya et al., 2013). Durante o ciclo de vida do parasita *Leishmania* as formas promastigotas ao saírem do inseto vetor e infectarem as células mononucleares do hospedeiro vertebrado experimentam diferenças de temperatura, pH e a presença de EROs produzidos pelos macrófagos. Estes tipos de estresses induzem o parasita a produzir mais HSP70, provavelmente com o objetivo de recuperação de um estado de homeostase (Shonhai et al., 2011). Sabendo-se que, juntamente com as enzimas antioxidantes, as proteínas HSP70 são as primeiras proteínas expressas em resposta aos estresses encontrados durante o ciclo de vida da *Leishmania* (Miller et al., 2000), este projeto teve como objetivo superexpressar a proteína HSP70 em *L.(L.) amazonensis*. O nosso intuito foi avaliar a importância dessa molécula para o parasita frente a situações de estresse, o seu papel na infectividade e a sua relação com a bioenergética mitocondrial. Além disso, o processo de transfecção também foi avaliado pela análise ultraestrutural dos parasitas.

Para a obtenção dos parasitas *L.(L.) amazonensis* superexpressando a HSP70, o vetor pTEX-HSP70 (Figura 2) foi construído e utilizado para a transfecção dos parasitas a técnica de eletroporação. O vetor pTEX foi escolhido para clonagem por ser específico para a transfecção em tripanosomatídeos (Kelly et al., 1992), sendo relatada em muitos trabalhos de clonagem com a utilização deste vetor para a transfecção de *Leishmania* e *Trypanosoma* (Taylor et al., 1994; Castro et al., 2002; Vergnes et al., 2002; Finzi et al., 2004; Cestari Idos et al., 2008). Como o vetor pTEX possui o gene de resistência para o antibiótico G418, as células transfectadas que continham o vetor clonado pTEX-HSP70 ou somente o vetor pTEX foram selecionadas e a

superexpressão da proteína HSP70 foi confirmada pela técnica de *Western blotting* (Figura 4). Essa mesma técnica foi utilizada para detectar a superexpressão da proteína HSP70 em promastigotas de *L.(L.) tarentolae*, *L.(L.) infantum* e *L.(L.) chagasi* (Brochu et al., 2004; Miller et al., 2000).

Com os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 obtidos, o processo de transfecção foi avaliado pela análise morfológica desses parasitas, comparando-os com parasitas não transfectados WT. Vannier-Santos & Castro (2009) trataram promastigotas *L.(L.) amazonensis* com compostos microbicidas e fizeram uma análise qualitativa das organelas e da superfície celular destes parasitas, por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, respectivamente. A análise qualitativa feita no trabalho do autor (promastigotas tratados ou não com compostos microbicidas) foram analisada e comparada com as estruturas dos parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 do nosso trabalho. A análises qualitativa mostrou que os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 exibiram características superficiais e estruturais similares. Os três tipos de parasitas apresentaram superfície celular organizada e sem evidência de danos. Não foram observadas alterações na distribuição das organelas e ausência de autofagossomos. A maioria dos promastigotas é mononucleado, o que indica que não houve alteração na capacidade de realizar citocinese (Figuras 5, 7 e 9).

Pelos dados obtidos da análise biométrica dos parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70, pode-se mostrar que os parasitas transfectados apresentaram diferenças no comprimento celular comparado ao comprimento de parasitas WT (Figura 6). Na literatura não há relatos de que o processo de transfecção pela eletroporação ou a utilização do vetor pTEX poderiam alterar o tamanho celular. Apesar disto há dados que mostram que uma das maneiras pelas quais as células reagem a mudanças celulares e ambientais (estresses, mudanças na sinalização e no ciclo celular)

é por meio de mediadores centrais de cascatas de sinalizações, como as proteínas quinases ativadas por mitógeno (*MAPK*) (Vonlaufen et al., 2008). No parasita *Leishmania*, existem diversas *MAPKs* envolvidas na proliferação, diferenciação e crescimento flagelar (Wiese et al., 2003a,b; Kuhn & Wiese, 2005; Erdmann et al., 2006). Possivelmente, o cultivo contínuo dos parasitas transfectados em meio seletivo (presença de G418) pode ter induzido uma resposta celular pela ativação de cascatas de sinalizações com *MAPK*, envolvidas na diferenciação e no crescimento flagelar (Wiese et al., 2003a), o que explicaria o aumento dessas células. Não houve diferenças no tamanho celular (Figura 6) e flagelar (Figura 8) entre os parasitas pTEX e pTEX-HSP70, evidenciando que a superexpressão da proteína HSP70 não está relacionada ao tamanho celular dos parasitas.

Os resultados obtidos pela análise morfométrica das densidades de área das mitocôndrias, vacúolos, corpos lipídicos e das células dos parasitas permitiram detectar o aumento de densidade de área nuclear nos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 quando comparados à densidades de áreas nucleares dos parasitas WT (Figura 10D).

Wheeler e colaboradores (2011) avaliaram a partir de medidas morfométricas, o comprimento do corpo e do flagelo de diversos promastigotas de *L.(L.) mexicana* com o objetivo de analisar as mudanças morfológicas do parasita durante seu ciclo celular. A partir das medidas individuais, os autores puderam estabelecer o posicionamento dos núcleos no interior destes parasitas. Com os resultados obtidos os autores estabeleceram uma correlação entre o comprimento celular e a posição nuclear do parasita *L.(L.) mexicana* (Wheeler et al., 2011). Já que os parasitas transfectados pTEX e pTEX-HSP70 têm o comprimento celular maior do que os parasitas não transfectados (Figura 6), a diferença na área nuclear desses parasitas poderia ser explicada a partir desta relação descrita por Wheeler e colaboradores (2011). Ou seja, o

posicionamento nuclear e, possivelmente a densidade de área nuclear, estariam correlacionados ao maior comprimento celular dos parasitas transfectados.

Em relação às análises morfométricas das densidades numéricas de vacúolos e corpos lipídicos, não foram detectadas diferenças no número destas organelas entre os promastigotas transfectados e parasitas WT (Figura 11).

Pela curva de crescimento dos parasitas transfectados verificou-se que os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 possuem capacidade proliferativa superior a dos parasitas WT (Figura 12). Dados da literatura corroboram nossas observações, pois parasitas transfectados de *T. cruzi* e *L.(L.) donovani* que também foram selecionados com G418 apresentaram taxas de crescimento superiores às dos parasitas WT (Finzi et al., 2004; Zhang & Matlashewski, 1997). É interessante notar que parasitas pTEX e pTEX-HSP70 têm capacidade proliferativa semelhante, isto é, curva de crescimento similar, exceto no final da fase estacionária, quando as culturas de parasitas pTEX-HSP70 conseguem manter o número de células por 24h a mais do que as culturas de parasitas pTEX (Figura 12). As culturas de *Leishmania* apresentam diminuição das taxas de glicólise e da oxidação de aminoácidos com os dias de cultivo (Blum, 1994), gerando um ambiente de estresse nutricional. A proteína HSP70 é mais expressa frente a diversos tipos de estresses, como por exemplo, o nutricional (West et al., 2012). Assim, a superexpressão da HSP70 poderia auxiliar os parasitas pTEX-HSP70 no redobramento de proteínas com conformação alterada, que são geradas durante um estado de estresse e podem ser evitadas por sistemas proteolíticos (Saibil, 2013), o que resultaria na manutenção da homeostade na fase estacionária.

Quando os parasitas transfectados foram submetidos a diferentes concentrações de H₂O₂, os parasitas pTEX-HSP70 mostraram-se mais resistentes do que os parasitas pTEX, com IC₅₀

(concentração de H₂O₂ capaz de inibir 50% da proliferação) 50% superior (IC₅₀= 401 e 269,5µM respectivamente) (Tabela 1). Miller e colaboradores (2000) superexpressaram a proteína HSP70 em *L.(L.) chagasi*, e esses parasitas apresentaram maior resistência ao H₂O₂ do que os parasitas transfectados com somente o vetor, confirmando os resultados obtidos em nosso trabalho. No tratamento com 250µM de H₂O₂, somente parasitas pTEX apresentaram capacidade proliferativa reduzida em relação aos parasitas sem tratamento (Figura 13). E nos tratamentos com 450µM de H₂O₂, ambos os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 proliferaram menos do que os mesmos parasitas sem tratamento (Figura 14). Dados da literatura relatam a correlação entre o aumento da expressão da HSP70 e o estresse oxidativo em parasitas como *L.(L.) chagasi*, *L.(L.) infantum* e *L.(L.) donovani* (Wilson et al., 1994; Dea-Ayuela et al., 2009; Adhuna et al., 2000), *T. cruzi* (Urményi et al., 2014) e larvas de *T. spiralis* (Martínez & Rodríguez, 2005) e maior resistência ao H₂O₂ como descrito por Miller e colaboradores (2000) para *L.(L.) chagasi*. A superexpressão da HSP70 pode estar protegendo os parasitas pTEX-HSP70 do estresse oxidativo interferindo com a sinalização apoptótica (Raina & Kaur, 2012) ou induzindo o aumento de enzimas antioxidantes (Madeira et al., 2013) que metabolizam o H₂O₂ em componentes não tóxicos.

Com outros tipos de estresses, como por exemplo, o choque térmico, a superexpressão da proteína HSP70 também promoveu resistência. De fato, promastigotas pTEX submetidos durante 2h ao choque térmico apresentaram proliferação reduzida pela metade quando comparados a parasitas pTEX mantidos a 26°C, enquanto que com o mesmo choque térmico (2h, 37°C), a capacidade proliferativa de parasitas pTEX-HSP70 não foi alterada em relação ao seu controle (mantidos a 26°C) (Figura 16). Há quase trinta anos os estudos nessa área têm mostrado que o aumento da expressão da proteína HSP70 em *L.(L.) chagasi*, *L.(L.) amazonensis*, *L.(L.) donovani* e *L.(L.) tropica* está associado a temperaturas consideradas como choque térmico para os

promastigotas e que são próximas de 37°C (Lawrence & Gero, 1985; Shapira et al., 1988; Wilson et al., 1994; Streit et al., 1996). Adicionalmente, a literatura indica que *L.(L.) tarentolae* transfectada somente com o vetor e que submetida ao choque térmico por 2h apresentou metade da viabilidade quando comparada a *L.(L.) tarentolae* superexpressando a proteína HSP70 (Brochu et al., 2004). Os dados desses autores confirmam os nossos resultados e também evidenciam a importância da HSP70 na proteção de *Leishmania* diante do choque térmico. Nas incubações a 37°C durante 4h (Figura 17) e 6h (Figura 18) os parasitas pTEX e pTEX-HSP70 apresentaram sua capacidade proliferativa reduzida em relação aos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 mantidos em temperatura de 26°C. Além disso, os parasitas transfectados pTEX e pTEX-HSP70 submetidos ao choque térmico durante 4h e 6h não apresentaram diferenças significantes na capacidade proliferativa. Dados da literatura indicam que *L.(L.) donovani* submetida ao choque térmico por 1 h ou por mais 3h não apresentam diferenças na síntese da HSP70. Isto é, as proteínas induzidas pelo tratamento de 1h a 37°C são estáveis e mesmo se as células forem tratadas por mais 3h a 37°C não produzem mais HSP70 (Brandau et al., 1995). Assim, sugerimos que não ocorreram diferenças na proliferação entre os parasitas transfectados tratados durante 4h ou 6h a 37°C porque os níveis de expressão da HSP70 já estavam muito altos. Em tratamentos mais curtos (2h a 37°C) a diferença na proliferação pôde ser observada (Figura 16).

A exposição dos parasitas pTEX e pTEX-HSP70 à HBO também foi avaliada no nosso trabalho. Dados da literatura mostram que o ambiente hiperbárico é tóxico para promastigotas de *L.(L.) amazonensis* e reduz a carga parasitária em macrófagos (Arrais-Silva et al., 2005). Camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) amazonensis* e tratados na HBO mostraram redução nas lesões (Arrais-Silva et al., 2006). Adicionalmente, na literatura há relatos do efeito adjuvante da HBO em modelos *in vivo* e *in vitro* da leishmaniose. Macrófagos infectados com

L.(L.) amazonensis reduziram mais efetivamente a infecção quando tratados com HBO e antimonias pentavalentes (Ayres et al., 2011). A toxicidade foi mais elevada em culturas de promastigotas de *Leishmania braziliensis panamensis* tratadas com HBO e anfotericina B (Muhvich et al., 1993). Além disso, dados na literatura também mostram os efeitos que a HBO promove reduzindo infecções e sintomas com parasitas tais como *Plasmodium berghei* (Blanco et al., 2008) e *Acanthamoeba sp* (Maritschnegg et al., 2011). Uma vez que a HBO causa efeitos tóxicos para *Leishmania* e outros parasitas, o intuito de nosso trabalho foi avaliar se o aumento da expressão da HSP70 poderia promover proteção para *Leishmania* contra o ambiente gerado pela HBO. Os resultados mostraram que embora ambos os parasitas transfectados expostos durante 2h a HBO apresentaram redução na capacidade proliferativa, os parasitas pTEX-HSP70 foram significativamente mais resistentes ao ambiente hiperbárico por dias do que parasitas pTEX (Figura 19).

Diversos trabalhos mostram que a HBO promove aumento na expressão da proteína HSP70 em diversos tipos de células e animais (Shyu et al., 2004; Mori et al., 2007; Lin et al., 2012; Ueng et al., 2013). Além disso, Wong e colaboradores (1998) superexpressaram a proteína HSP70 em células tumorais de carcinoma de pulmão (A549), submetem estas células a hiperóxia por 24h e mostraram que estas sobreviveram 20% a mais do que as células transfectadas com o vetor sem o inserto. Os mecanismos pelos quais a HSP70 protege o parasita dos efeitos do ambiente oxidativo não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que a HSP70 protege as células da peroxidação lipídica (Wong et al., 1988), promove um aumento de enzimas antioxidantes (Madeira et al., 2013) e está envolvida em mecanismos que suprimem a apoptose (Ueng et al., 2013), que poderiam possibilitar aos parasitas pTEX-HSP70 uma maior resistência a HBO.

Com o intuito de avaliar se a superexpressão da HSP70 poderia alterar a capacidade infectiva da *L.(L.) amazonensis*, culturas de macrófagos peritoneais e humanos foram infectados com parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 e comparados com culturas de macrófagos infectados com parasitas WT. Os resultados não mostraram diferenças significantes na porcentagem de células infectadas com os parasitas WT e transfectados (Figura 22A). Em relação ao número de amastigotas intracelulares, também não houve diferenças nas culturas infectadas com os três tipos de parasitas durante 24h de infecção (Figura 22B).

Para confirmar que a superexpressão da HSP70 não alterava as taxas infectivas do parasita *Leishmania*, outro tipo de macrófago primário foi escolhido para realizar os experimentos. Culturas de macrófagos humanos derivados de sangue periférico infectadas com parasitas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 não apresentaram diferenças tanto na porcentagem de células infectadas como o número de amastigotas intracelulares (Figura 22).

Com os dados obtidos, pôde-se verificar que a superexpressão da proteína HSP70 não altera a capacidade infectiva dos parasitas pTEX-HSP70 quando comparados aos parasitas pTEX. Além disso, pôde-se observar que a modificação genética não alterou a capacidade infectiva dos parasitas transfectados.

Os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 foram submetidos a choque térmico de 2h a 37°C e, incubados com macrófagos peritoneais murinos por 2 e 24h, para analisar possíveis diferenças na suas capacidade infectiva. Os resultados mostraram que as culturas de macrófagos infectadas com estes parasitas também não mostraram diferenças no número de células infectadas e no número de amastigotas intracelulares (Figura 23).

A literatura mostra que a proteína HSP70 de *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) panamensis*, *L.(L.) donovani*, *L.(L.) tarentolae* e *L.(L.) infantum* está associada à resistência dos promastigotas aos

antimoniais pentavalentes (Matrangolo et al., 2013; Peláez et al., 2012; Biyani et al., 2011; Brochu et al., 2004). Assim, culturas de macrófagos murinos foram infectados com os parasitas WT, pTEX ou pTEX-HSP70 e tratados com glucantime para verificar o efeito da HSP70 nestas condições. Os resultados mostraram que as culturas de macrófagos infectados com os 3 tipos de parasitas não apresentaram diferenças na porcentagem de células infectadas e no número de amastigotas intracelulares (Figuras 24 e 25). Apesar disso, os dados na literatura citados acima mostram que existe um aumento na expressão da HSP70 em parasitas tratados com antimonias. Os nossos experimentos foram realizados com as formas amastigotas, enquanto que nos estudos citados utilizaram as formas promastigotas.

A capacidade infectiva dos parasitas transfectados também foi avaliada *in vivo* (Figura 26), tendo-se observado que as lesões dos camundongos inoculados com parasitas pTEX-HSP70 foram maiores do que as lesões de animais inoculados com parasitas pTEX até a 7^o semana de infecção, mas se tornaram iguais nos estágios finais da infecção. Além disso, as lesões induzidas por parasitas WT apresentaram mais amastigotas do que as lesões induzidas pelos parasitas transfectados (Figura 27A). Apesar disso, quando se verificou a carga parasitária (número de amastigotas totais por grama de tecido da lesão), camundongos infectados com os parasitas WT apresentam 70% menos parasitas por grama de tecido do que em lesões de camundongos infectados com parasitas pTEX ou pTEX-HSP70 (Figura 27B). Não houve diferenças nas cargas parasitárias das lesões induzidas pelos parasitas transfectados, o que confirma o fato que a superexpressão da proteína HSP70 não altera a infectividade desses parasitas. Os camundongos infectados com os parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 também mostraram indícios de visceralização no baço, contabilizando em torno de um a dois amastigotas por macrófagos (Tabela 2) e ausência de parasitas nos fígados destes animais (Figura 28).

Os ensaios de infecção com parasitas WT, pTEX e pTEX-HSP70 a partir dos modelos *in vitro* e *in vivo* indicam que a superexpressão da proteína HSP70 não altera a capacidade infectiva da *L. (L.) amazonensis*. Dados na literatura mostram que a *T. gondii* virulento diminuem as taxas de expressão da HSP70 temporariamente quando tratadas com oligonucleotídeos *antisense* e sua capacidade infectiva também é reduzida (Dobbin et al., 2002). *L.(L.) major* nocaubiado no gene HSP70 e incubado com macrófagos, apresentou redução na capacidade infectiva quando comparado a *L.(L.) major* não modificado geneticamente (Folgueira et al., 2008). Da mesma forma, mutantes de *L.(L.) infantum* que não expressam HSP70, apresentaram menor infectividade em camundongos BALB/c (Carrión et al., 2011). Por outro lado, *Mycobacterium tuberculosis* com superexpressão da HSP70 foi tão infectiva quanto as bactérias não mutantes, não apresentando também diferenças nas taxas infectivas no início da infecção (Stewart et al., 2001).

Os dados da literatura mostram que a não expressão da HSP70 em *Leishmania* reduz a capacidade infectiva desses parasitas. Não há relatos na literatura que mostram que a *Leishmania* que superexpressam a proteína HSP70 levam à mudanças nas suas taxas infectivas. Por outro lado, Kültz (2003) apresenta uma visão mais geral sobre o que seria o estresse celular. De acordo com esse autor são danos macromoleculares gerados nas células em resposta a mudanças ambientais e a resposta gerada ao fator estressor não envolve apenas a simples indução da expressão de chaperonas moleculares (HSPs), mas também a indução de outros mecanismos adaptadores. Estes outros fatores que também estão envolvidos na resposta ao estresse celular seriam reguladores do ciclo celular, do proteassoma e proteínas de reparo do DNA. Assim, possivelmente a superexpressão da proteína HSP70 não promove diferenças nas taxas infectivas na *Leishmania* pelo fato de a resposta gerada pelos parasitas durante a infecção não ser apenas relacionada à maior presença da HSP70. Provavelmente exista também o envolvimento de outras

proteínas e cascatas de sinalizações, como por exemplo, a ativação da cascata de sinalização das proteínas quinases ativadoras de mitógeno (*MAPK*) ou da família de quinases eIF2, ambas presentes em *Leishmania* e envolvidas na resposta ao estresse em diversos organismos (Vonlaufen et al., 2008). Contudo, a superexpressão da HSP70 em condições de estresse é importante, como foi apresentado em nossos experimentos de proliferação de promastigotas submetidos a diferentes estresses (H_2O_2 , choque térmico e HBO), mas não deve ser o único e exclusivo mecanismo utilizado pelos parasitas para a homeostase durante o estresse e a infecção.

Analisando os parâmetros bioenergéticos dos parasitas transfectados pTEX e pTEX-HSP70, pôde-se constatar que parasitas pTEX-HSP70 consomem quase que 50% a mais de oxigênio do que parasitas pTEX (Figura 29A). Pelo fato de os parasitas pTEX-HSP70 estarem expressando mais proteínas HSP70 do que parasitas pTEX, possivelmente o aumento do consumo de oxigênio de parasitas pTEX-HSP70 é devido ao aumento na demanda metabólica para a síntese da HSP70. Quando se determinou o controle respiratório (CR), que indica o quanto a cadeia transportadora de elétrons está acoplada à fosforilação oxidativa (Silva et al., 2011), verificou-se que apesar de os parasitas pTEX-HSP70 apresentarem maior consumo de oxigênio, seu controle respiratório foi 15% inferior ao CR observado nos parasitas pTEX (Figura 29B). Entretanto, os parasitas pTEX-HSP70 não apresentaram diferenças significantes na produção de ATP intracelular em relação aos parasitas pTEX (Figura 30), evidenciando que o pequeno desacoplamento mitocondrial não afetou as taxas de ATP do parasita. Dados na literatura mostraram que *T. cruzi* superexpressando a enzima triparedoxina peroxidase, envolvida nos mecanismos antioxidantes do parasita, também aumentaram o consumo de oxigênio e apresentaram um pequeno desacoplamento mitocondrial, sem afetar a produção de ATP intracelular (Peloso et al., 2011). Além disso, há relatos de que a superexpressão da proteína

HSP70 em células HeLa afetam seu metabolismo energético, diminuindo a atividade de enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa, mas a produção de ATP intracelular também não é afetada (Wang et al., 2012). Sabendo-se que a cadeia transportadora de elétrons é uma das maiores fontes de EROs celular, uma das formas pelas quais as células podem utilizar estratégias antioxidantes seria por mecanismos desacopladores, que diminuem a produção de EROs sem afetar o transporte de elétrons (Kowaltowski et al., 2009). Essa seria uma possível explicação do que levou os parasitas pTEX-HSP70 a ter um pequeno desacoplamento na membrana mitocondrial que poderia auxiliá-los a combater a produção de EROs intracelular. Além disso, o aumento no consumo de oxigênio pelos parasitas pTEX-HSP70 não afetou a produção de ATP nestas células (Figura 30). Possivelmente, os prótons que foram bombeados para o espaço entre membranas durante a passagem de elétrons, não estariam retornando para a matriz mitocondrial pelo complexo ATPase, pois não houve aumento na produção de ATP pelos parasitas. Assim, uma possível explicação para este achado seria que os prótons presentes nesse espaço estariam voltando para a matriz mitocondrial através de canais presentes na membrana da mitocôndria. Dados na literatura relatam que há uma relação entre a proteína HSP70 do retículo endoplasmático com canais de ânion dependentes de voltagem (CADV) presentes na membrana da mitocôndria (Szabadkai et al., 2006). Este envolvimento da HSP70 com canais na membrana da mitocôndria poderia estar relacionado com o influxo de prótons para a matriz mitocondrial sem afetar as taxas de ATP nos parasitas pTEX-HSP70.

A produção intracelular de ERO_s pelos parasitas transfectados também foi avaliada. Em condições basais, a liberação de H₂O₂ pela mitocôndria pôde ser detectada, mas não foi possível estabelecer diferenças significantes entre as células estudadas (Figura 31, Cltr). Na presença de AA os parasitas pTEX-HSP70 liberaram cerca de 80% menos H₂O₂ do que parasitas pTEX

(Figura 31, AA). No entanto, quando foi avaliada a produção do radical superóxido com a presença ou ausência de AA, ambos os parasitas não apresentaram diferenças entre si na porcentagem de produção do ânion (Figura 32), evidenciando que a superexpressão da proteína HSP70 está relacionada somente com a liberação de H₂O₂. Diversos trabalhos mostram que o aumento de temperatura e da síntese da HSP70, está relacionada ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes, principalmente da glutatona peroxidase (Mitchell et al., 1983; Currie et al., 1988; Gu et al., 2012; Liu et al., 2013; Madeira et al., 2013). Além disso, outras chaperonas como a HSP27 também promovem um aumento de enzimas antioxidantes (Mehien et al., 1996). Interessantemente, a enzima glutatona é responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio e está localizada na membrana mitocondrial (Raza, 2011). Diante desses resultados, pode-se sugerir que a superexpressão da proteína HSP70 aumentou as taxas de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase, o que levou à menor liberação mitocondrial de H₂O₂ nos parasitas pTEX-HSP70.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a superexpressão da HSP70 em *L.(L.) amazonensis* não interfere na morfologia dos parasitas; reforçam a importância da HSP70 para a sobrevivência do parasita diante de estresses encontrados durante seu ciclo de vida; sugerem que HSP70 não age sozinha na proteção dos parasitas e que está associada com mecanismos antioxidantes. Assim, como perspectiva o estudo da interação da HSP70 da *Leishmania* com proteínas do hospedeiro seria interessante para compreender a relação parasita-hospedeiro e para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas.

6-CONCLUSÕES

- Foi possível a construção do vetor pTEX-HSP70 e a obtenção de parasitas transfectados pTEX e pTEX-HSP70 que superexpressaram a HSP70.

Comparando-se parasitas pTEX-HSP70 com os parasitas pTEX, conclui-se que:

- os aspectos ultraestruturais são semelhantes.
- a curva de proliferação de parasitas pTEX-HSP70 apresenta fase estacionária estendida.
- os parasitas pTEX-HSP70 são mais resistentes aos tratamentos com H₂O₂, choque térmico e a exposição a HBO.
- a capacidade de infectar macrófagos murinos e humanos e de se manterem intracelularmente é semelhante em ambos os parasitas.
- a capacidade de infectar camundongos BALB/c é semelhante em ambos os parasitas.
- os parasitas pTEX-HSP70 exibem pequena alteração na bioenergética mitocondrial que não se reflete na produção de ATP.
- os parasitas pTEX-HSP70 liberam menos H₂O₂ do que parasitas pTEX.

Comparando-se parasitas transfectados (pTEX e pTEX-HSP70) com parasitas não transfectados, conclui-se que:

- vários aspectos ultraestruturais são semelhantes, mas os tamanhos celulares são aumentados em parasitas transfectados.
- a área nuclear é maior ao quantificado em parasitas não transfectado.

7– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHUNA, A., et al. Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunology Letters*, v. 71, p. 171–176, 2000.
- AMBRÓSIO, D.L. Caracterização Molecular de UsnRNAs em *Trypanosoma cruzi*. Araraquara: 2005. Dissertação apresentada a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- ARAÚJO, A.P., et al. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: A potential model for chronic hypoxia. *Acta Histochemica*, v. 114, p. 797– 804, 2012.
- ARRAIS-SILVA, W.W., et al. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitology International*, v. 54, p. 1–7, 2005.
- ARRAIS-SILVA, W.W., et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. *Acta Tropica*, v. 98, p. 130–136, 2006.
- ASEA, A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*, v. 183, p. 111–127, 2008.
- ASTELBAUER, F. & WALOCHNIK, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 38, p. 118– 124, 2011.
- AYRES, D.C., et al. Efficacy of Pentavalent Antimony, Amphotericin B, and Miltefosine in *Leishmania amazonensis*-infected Macrophages Under Normoxic and Hypoxic Conditions. *Parasitol.*, v. 94 (6), p. 1415-1417, 2008.
- AYRES, D.C., et al. Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 53(6), p. 329-334, 2011.
- BEAUMIER, C.M., et al. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Translational Research.*, v. 162 (3), p. 144-155, 2013.
- BEERE, H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest*, v. 115(10), p. 2633–2639, 2005.
- BIYANI, N., et al. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.*, v. 179, p. 91-9, 2011.
- BLANCO, Y.C., et al. Hyperbaric Oxygen Prevents Early Death Caused by Experimental Cerebral Malaria. *PLoS ONE*, v. 3(9), e3126, 2008.
- BLUM, J.J. Energy metabolism in *Leishmania*. *J.Bioenerg Biomembr.*, v. 26 (2), p.147-55, 1994.
- BOER, M., et al. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect.*, v. 17(10), p. 1471-7, 2011.
- BOSSETO, M.C., et al. Hypoxia modulates phenotype, inflammatory response, and leishmanial infection of human dendritic cells. *APMIS*, v. 118, p. 108–114, 2010.
- BRANDAU, S., et al. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem. J.*, v. 310, p. 225-232, 1995.
- BROCHU, C., et al. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Stress & Chaperones*, v. 9(3), p. 294–303, 2004.
- CARRILLO, E., et al. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 26(15), p. 1902-11, 2008.
- CARRIÓN, J., et al. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against

- leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasites & Vectors*, v. 4, p. 150, 2011.
- CASTRO, H., et al. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33 (11), p. 1552–1562, 2002.
- CESTARI IDOS, S., et al. Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis.*, v. 198(9), p. 1276-83, 2008.
- CHATTOPADHYAY, A. & JAFURULLA, M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 416, p. 7–12, 2011.
- CLARE, D.K. & SAIBIL, H.R. ATP-Driven Molecular Chaperone Machines. *Biopolymers*, v. 99 (11), p. 846-859, 2013.
- COLHONE, M.C., et al. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. *J. Parasitol.*, v. 90, p. 510-515, 2004.
- CORRALES, R.M., et al. Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 58, p. 27–38, 2010.
- COSTA, S.S., et al. Use of *In Vivo* and *In Vitro* Systems to Select *Leishmania amazonensis* Expressing Green Fluorescent Protein. *Korean J Parasitol.*, v. 49 (4), p. 357-364, 2011.
- CROFT, S.L. & OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.*, v. 17, p. 1478–1483, 2011.
- CUERVO, P., et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J. of Proteomics*, v. 73, p. 79– 92, 2009.
- CURRIE, R.W., et al. Heat-Shock Response Is Associated With Enhanced Postischemic Ventricular Recovery. *Circ Res.*, v. 63, p. 543-549, 1988.
- CYRINO, L.T., et al. *In vivo* and *in vitro* *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in Macrophages. *Tissue and Cell*, v. 44, p. 401–408, 2012.
- DEA-AYUELA, M.A., et al. Changes in the proteome and infectivity of *Leishmania infantum* induced by *in vitro* exposure to a nitric oxide donor. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 299, p. 221–232, 2009.
- DEGROSSOLI, A.; BOSETTO, M.C.; LIMA, C.B.; GIORGIO, S. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. *Immunology Letters*, v. 114, p. 119–125, 2007.
- DE SOUZA, W., et al. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *The Intern. J. of Bioch. & Cell Biol.*, v. 41, p. 2069–2080, 2009.
- DOBBIN, C.A., et al. Heat Shock Protein 70 is a Potential Virulence Factor in Murine *Toxoplasma* Infection Via Immunomodulation of Host NF-κB and Nitric Oxide. *The Journal of Immunology*, v. 169, p. 958–965, 2002.
- DOSTÁLOVÁ, A. & VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 276, 2012.
- EATON, P., et al. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells. *Nanomedicina*, v. S1549-9634 (13), p. 00478-4, 2013.
- ERDMANN, M., et al. Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. *Mol Biol Cell.*, v. 17, p. 2035–2045, 2006.

- FERNÁNDEZ, O., et al. Novel Approach to *In Vitro* Drug Susceptibility Assessment of Clinical Strains of *Leishmania spp.* J. Clin. Microbiol., v. 50 (7), p. 2207-2211, 2012.
- FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. J. Cell Biol., v. 194, p. 7–15, 2011.
- FINZI, J.K., et al. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. Biochem Parasitol., v. 133(1), p. 37-43, 2004.
- FOLGUEIRA, C. & REQUENA, J.M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev., v. 31, p. 359–377, 2007.
- FOLGUEIRA, C., et al. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. Parasitology, v. 134, p. 369–377, 2007.
- FORESTIER, C.L. Imaging host–*Leishmania* interactions: significance in visceral leishmaniasis. Parasite Immunology, v. 35, p. 256–266, 2013.
- GARLAPATI, S., et al. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. Molecular and Biochemical Parasitology, v 100, p. 95–101, 1999.
- GASTPAR, R.; GROSS, C.; ROSSBACHER, L.; ELLWART, J.; RIEGGER, J.; MULTHOFF, G. The cell surface localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. J Immunol., v. 172, p. 972–980, 2004.
- GOLAS, E., et al. Simulation of the opening and closing of Hsp70 chaperones by coarse-grained molecular dynamics. J Chem Theory Comput, v. 8(5), p. 1750–1764, 2012.
- GU, X.H., et al. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Poult Sci., v. 91 (4), p. 790-9, 2012.
- HECK, T.G., et al. Hsp70 expression: does it a novel fatigue signaling factor from immune system to the brain? Cell Biochem Funct., v. 29, p. 215–226, 2011.
- HU, X., et al. Difference in DNA sequences in SSU rDNA variable regions among pathogens isolated from different epidemic foci of visceral leishmaniasis in China. Chin Med J (Engl)., v. 115(10), p. 1457-9, 2002.
- JAIN, K. & JAIN, N.K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. Drug Discovery Today, v. 18 (23/24), p. 1272-81, 2013.
- KAUR, J., et al. Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. Acta Trop., v. 119 (1), p. 50-6, 2011.
- KELLY, J., et al. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. Nucleic Acids Res., v. 20(15), p.3963-9, 1992.
- KENDALL, A.C., et al. Changes in inflammatory gene expression induced by hyperbaric oxygen treatment in human endothelial cells under chronic wound conditions. Exp Cell Res., v. 318(3), p. 207-16, 2012.
- KHALIL, E.A.G., et al. Safety and immunogenicity of a candidate vaccine for visceral leishmaniasis (Alumprecipitated autoclaved *Leishmania major* + BCG) in children: an extended phase II study. Annals of tropical paediatrics, v. 26, p. 357–361, 2006.
- KLING, J.C. & KORNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. International Journal for Parasitology, v. 43, p. 417–425, 2013.
- KOVALCHIN, J.T.; WANG, R.; WAGH, M.S.; AZOULAY, J.; SANDERS, M.; CHANDAWARKAR, R.Y. *In vivo* delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. Wound Repair Regen, v. 14, p. 129–137, 2006.
- KOWALTOWSKI, A.J., et al. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radical Biology & Medicine, v. 47, p. 333–343, 2009.

- KRAUTH-SIEGEL, R.L. & LEROUX, A.E. Low-molecular-mass antioxidants in parasites, v. 17(4), p. 583-607, 2012.
- KUHN, D. & WIESE, M. LmxPK4, a mitogenactivated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Mol Microbiol.*, v. 56, p. 1169–1182, 2005.
- KULTZ, D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *The Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 3119-3124, 2003.
- KUMAR, A., et al. Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 70(4), p. 609-617, 2010.
- LAWRENCE, F. & GERO, M.R. Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 82, p. 4414-7, 1985.
- LIN, H., et al. Attenuating brain edema, hippocampal oxidative stress, and cognitive dysfunction in rats using hyperbaric oxygen preconditioning during simulated high-altitude exposure. *J. Trauma*, v. 72, p. 1220–1227, 2012.
- LIU, C.C., et al. Transgenic overexpression of heat shock protein 72 in mouse muscle protects against exhaustive exercise-induced skeletal muscle damage. *J. Formos Med Assoc.*, v. 112 (1), p. 24-30, 2013.
- LIU, T., et al. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 136, p. 354–374, 2012.
- LOUW, C.A., et al. The Hsp70 chaperones of the Tritryps are characterized by unusual features and novel members. *Parasitology International*, v. 59, p. 497–505, 2010.
- LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.*, v. 193, p. 265, 1951.
- MADEIRA, D., et al. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 166, p. 237–243, 2013.
- MAILLOUX, R.J., et al. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 38 (12), p. 592-602, 2013.
- MARITSCHNEGG, P., et al. Granulomatous Amebic Encephalitis in a Child with Acute Lymphoblastic Leukemia Successfully Treated with Multimodal Antimicrobial Therapy and Oxygen. *J. of Clin. Microb.*, v. 49 (1), p. 446–448, 2011.
- MARTÍNEZ, J. & RODRÍGUEZ, C.F. Relationship between heat shock protein levels and infectivity in *Trichinella spiralis* larvae exposed to different stressors. *Parasitol Res.*, v. 97(3), p. 213-8, 2005.
- MATRNGOLO, F.S., et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol Biochem Parasitol.*, v. 190 (2), p. 63-75, 2013.
- MAYER, M.P. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 38 (10), p. 507-514, 2013.
- MCGWIRE, B.S. & SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med.* 2013. *In printing* doi:10.1093/qjmed/hct116.
- MEHIEN, P., et al. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human aB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death. *The EMBO Journal*, v. 15 (11), p. 2695-2706, 1996.

- MILER, M.A., et al. Inducible Resistance to Oxidant Stress in the Protozoan *Leishmania chagasi*. The Journal of biological chemistry, v. 275(43), p. 33883–89, 2000.
- MITCHELL, J.B., et al. Glutathione Elevation during Thermotolerance Induction and Thermosensitization by Glutathione Depletion. Cancer Res., v. 43, p. 987-991, 1983.
- MONDOLFI, A.E.P., et al. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. International Journal of Dermatology, v. 52, p. 446–455, 2013.
- MONTALVO, A.M., et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. , v. 137(8), p. 1159-68, 2010.
- MORI, H., et al. Beneficial Effects of Hyperbaric Oxygen Pretreatment on Massive Hepatectomy Model in Rats. Transplantation, v. 84, p. 1656–1661, 2007.
- MUHVICH, K.H., et al. Hyperbaric hyperoxia enhances the lethal effects of amphotericin B in *Leishmania braziliensis panamensis*. Submarino Hyperb Med. v. 20 (4), p. 321-8, 1993.
- MUKBEL, R.M., et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotas requires both nitric oxide and superoxide. Am J Trop Méd Hyg., v. 76, p. 669–675, 2007.
- NYLÉN, S. & EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunology, v. 34, p. 551–561, 2012.
- OLIVEIRA, L.F., et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Tropica, v. 118, p. 87–96, 2011.
- PAPADOPOULOU, B., et al. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. The EMBO Journal, v. 11(10), p. 3601 – 3608, 1992.
- PELÁEZ, R.G., et al. Differential expression of proteins in *Leishmania (Viannia) panamensis* associated with mechanisms of resistance to meglumine antimoniate. Biomedica, v. 32 (3), p. 418-29, 2012.
- PELOSO, E.F., et al. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. J Bioenerg Biomembr, v. 43, p. 419–424, 2011.
- PELOSO, E.F., et al. Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 520, p. 117–122, 2012.
- PRIYA, S., et al. Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. FEBS Letters, v. 587, p. 1981–1987, 2013.
- RAINA, P. & KAUR, S. Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in *Leishmania donovani*. Mol Cell Biochem, v. 359, p. 135–149, 2012.
- RAMÍREZ, C.A., et al. Identification of proteins interacting with HSP70 mRNAs in *Leishmania braziliensis*. J. of Proteomics, v. 94, p. 124–137, 2013.
- RAZA, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. FEBS Journal, v. 278, p. 4243–4251, 2011.
- READY, P.D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. Annu. Rev. Entomol., v. 58, p. 227–50, 2013.
- REAL, F., et al. The Genome Sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional Annotation and Extended Analysis of GeneModels. DNA Research, p. 1–15, 2013. *In printing*.

- ROBINSON, K.A., et al. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 128, p. 217–228, 2003.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, v. 18(12), p. 571–573, 1962.
- SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Mol. Cell Biol.*, v. 14, p. 630-42, 2013.
- SALOTRA, P., et al. Tumour necrosis factor-alpha induces preferential expression of stress proteins in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunology Letters*, v. 44, p. 1-5, 1995.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainville, NY. 2001.
- SHAPIRA, M., et al. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *The EMBO Journal*, v. 7(9), p. 2895 – 2901, 1988.
- SHONHAI, A., et al. Intracellular Protozoan Parasites of Humans: The Role of Molecular Chaperones in Development and Pathogenesis. *Protein & Peptide Letter*, v. 18, p. 143-157, 2011.
- SHYU, W.C., et al. Hyperbaric oxygen enhances the expression of prion protein and heat shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *Cell Mol. Neurobiol.*, v. 24 (2), p. 257-68, 2004.
- SILVA-ALMEIDA, M., et al. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 160, 2012.
- SILVA, T.M., et al. O₂ consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr.*, v. 43, p. 409–417, 2011.
- SINGH, N., et al. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 5(6), p. 485-497, 2012.
- SMYTH, A.J., et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, v. 105(2), p. 183-92, 1992.
- SOONG, L. Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 1-7, 2012.
- STEWART, G.R., et al. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nature Medicine*, v. 7 (6), p. 732-37, 2001.
- STOCKDALE, L. & NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7 (6), p. e2278, 2013.
- STREIT, J.A., et al. Developmental Changes in the Expression of *Leishmania chagasi* gp63 and Heat Shock Proteins in a Human Macrophage Cell Line. *Infection and Immunity*, v. 64(5), p. 1810–1818, 1996.
- STRICHER, F., et al. HSPA8/HSC70 chaperone protein: Structure, function, and chemical targeting. *Autophagy*, v. 9 (12), p. 1937-1954, 2013.
- SZABADKAI, G., et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. of Cell Biology*, v. 175 (6), p. 901–911, 2006.
- TAYLOR, M.C., et al. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Mol Biochem Parasitol.*, v. 64(2), p. 293-301, 1994.

- THOM, S.R. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol.*, v. 106, p. 988–995, 2009.
- TOMÁS, A.M. & CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19 (7), p. 696-707, 2013.
- TRA, W.M., et al. Hyperbaric oxygen treatment of tissue-engineered mucosa enhances secretion of angiogenic factors *in vitro*. *Tissue Eng Parte A*. 2013 *In printing*.
- UENG, S.W.N., et al. Hyperbaric Oxygen Treatment Prevents Nitric Oxide-Induced Apoptosis in Articular Cartilage Injury via Enhancement of the Expression of Heat Shock Protein 70. *J Orthop Res.*, v. 31, p. 376–384, 2013.
- URMÉNYI, T.P., et al. The Heat Shock Proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem.*, v. 74, p. 119-35, 2014.
- VANNIER-SANTOS, M.A. & CASTRO, S.L. Electron Microscopy in Antiparasitic Chemotherapy: A (Close) View to a Kill. *Current Drug Targets*. v. 10, p. 246-260, 2009.
- VELEZ, I.D., et al. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, p. 593–598, 2005.
- VELICHKO, A.K., et al. Mechanisms of heat shock response in mammals. *Cell Mol Life Sci.*, v. 70 (22), p. 4229-41, 2013.
- VERGNES, B., et al. Cytoplasmic SIR2 homologue overexpression promotes survival of *Leishmania* parasites by preventing programmed cell death. *Gene*, v. 21 (296), p. 139-50, 2002.
- VONLAUFEN, N., et al. Stress response pathways in protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, v. 10 (12), p. 2387–2399, 2008.
- WALKER, D.M., et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013. *In printing*. Doi: 10.1007/s00018-013-1491-1.
- WANG, L., et al. Heat shock protein 70 (Hsp70) inhibits oxidative phosphorylation and compensates ATP balance through enhanced glycolytic activity. *J Appl Physiol.*, v. 113, p. 1669–1676, 2012.
- WANG, Y., et al. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Infect Immun.*, v. 79, p. 1124–1133, 2011.
- WEST, J.D., et al. Small Molecule Activators of the Heat Shock Response: Chemical Properties, Molecular Targets, and Therapeutic Promise. *Chem Res Toxicol.*, v. 25(10), p. 2036-53, 2012.
- WHEELER, R.J., et al. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular Microbiology*, v. 79 (3), p. 647–662, 2011.
- WIESE, M., et al. Protein kinase involved in flagellar-length control. *Eukaryot Cell*, v. 2, p. 769–777, 2003a.
- WIESE, M., et al. Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol.*, v. 33, p. 1577–1587, 2003b.
- WILSON, J., et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog.*, v. 4 (10), p. e1000179, 2008.
- WILSON, M.E., et al. Response of *Leishmania chagasi* Promastigotes to Oxidant Stress. *Infection and Immunity.*, v. 62(11), p. 5133-41, 1994.
- WONG, H.R., et al. Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. *Am J Physiol.*, v. 275 (4 Pt 1), p. L836-41, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en. Acesso em 24 de fevereiro de 2013.

ZHANG, W.W. & MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 94, p. 8807–8811, 1997.

ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação do efeito da superexpressão da proteína HSP70 em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

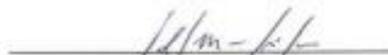
(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. CIBio/IB-2008/II , Instituição: IB/Unicamp.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 3056-1, Instituição: IB/Unicamp.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.


Aluno: Bárbara Santoni Codonho


Orientador: Dra. Selma Giorgio

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

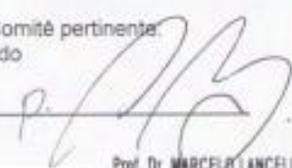
Carimbo e assinatura


Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP