

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



SOLANGE DOS SANTOS COSTA

**“A PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS UTILIZANDO A
LEISHMANIA AMAZONENSIS EXPRESSANDO A GREEN
FLUORESCENT PROTEIN”**

Esta dissertação corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
SOLANGE DOS SANTOS COSTA
[assinatura]
Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C823p

Costa, Solange dos Santos

A padronização de ensaios utilizando a *Leishmania amazonensis* expressando a Green Fluorescent Protein / Solange dos Santos Costa. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Selma Giorgio.

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

1. *Leishmania*. 2. Proteínas de fluorescência verde.
3. Fluorescência. 4. Seleção in vitro. 5. Seleção in vivo.
I. Giorgio, Selma. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Standardization of *Leishmania amazonensis* expressing the Green Fluorescent Protein assays.

Palavras-chave em inglês: *Leishmania*; Green fluorescent proteins; Fluorescence; In vitro selection; In vivo selection.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Selma Giorgio, Silmara Marques Allegretti, Márjorie de Assis Golim.

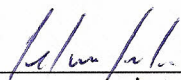
Data da defesa: 26/08/2010.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

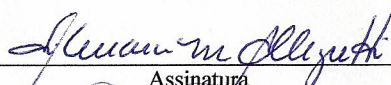
Campinas, 26 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

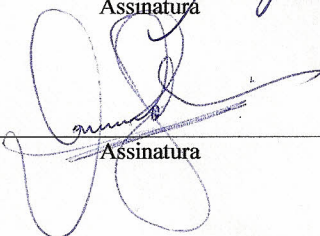
Profa. Dra Selma Giorgio (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Dra. Márjorie de Assis Golim


Assinatura

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

Assinatura

Dra. Edlaine Linares

Assinatura

Dedico este trabalho aos meus pais José Homero e Rita Ofélia os quais me apoiaram e se dedicaram para o meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado até aqui.

À Profa. Dra. Selma Giorgio, pela sua orientação aplicada com dedicação e paciência, por sua confiança e credibilidade em meu potencial e suas palavras de incentivo sempre presente.

Aos meus pais e irmãs, pelo amor incondicional e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Leishmaniose, Camila, Diana, Adriana, Alexandra, Larissa, Flávia, Juliana, André, Marina e Ademar, pelo apoio técnico e pelos grandes momentos compartilhados.

Aos funcionários do Depto de Biologia Animal, em especial Cirene, João, Dorvalino, e Nilson, pelo carinho e disponibilidade em ajudar.

À Profa. Dra. Bartira Rossi-Bergmann do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, por ter nos cedido a *L. amazonensis*-GFP.

À Profa. Dra. Maria Isabel N. Cano e todo o pessoal do Laboratório de Telômeros da UNESP de Botucatu, pela acolhida, apoio e atenção.

À Dra. Márjorie de Assis Golim do Hemocentro de Botucatu, UNESP, pela realização das análises de citometria de fluxo.

À minha amiga Sandra, pelos momentos compartilhados.

A todos os professores e colegas do Depto de Biologia Animal, pela amizade e apoio técnico.

As Profas. Dras. Silmara M. Allegretti, Regina Maura B. Franco e a Dra. Márjorie A. Golim pela participação na análise prévia.

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”

(John Dewey)

RESUMO

A utilização da *Leishmania*-GFP tem facilitado o monitoramento de ensaios *in vitro* e *in vivo* de infecção para avaliação de fármacos leishmanicidas. A vantagem de usar a *Leishmania*-GFP como uma ferramenta de quantificação da infecção sobre os métodos tradicionais de fixação e coloração de ensaio *in vitro* é que consiste em método rápido, de análise direta da amostra sem uma pré-preparação. No entanto, a expressão do gene GFP é heterogênea nas populações de parasitas transfectados e no hospedeiro o plasmídio é perdido na ausência de pressão seletiva ao marcador de resistência resultando em perda da intensidade de fluorescência. Os métodos de seleção dos transfectados são destinados aos promastigotas e não há relatos de seleção de amastigotas de *Leishmania*-GFP. Em nossos ensaios, a seleção *in vitro* com o antibiótico geneticina das formas promastigotas-GFP foi bem sucedida, atingindo 90% de parasitas fluorescentes. Na seleção *in vivo* das formas amastigotas presentes na lesão de camundongos infectados com *L. amazonensis*-GFP foi observado tanto redução como aumento em relação ao tamanho da lesão e da carga parasitária de camundongos infectados, dependendo do protocolo utilizado. Contudo observamos um aumento da intensidade de fluorescência dos amastigotas retirados da lesão de camundongos tratados com geneticina comparado aos não tratados, bem como um aumento da porcentagem de parasitas fluorescentes. A *L. amazonensis*-GFP foi utilizada com sucesso para testes com fármacos, usando como controles miltefosina e glucantime tanto em ensaios com culturas de promastigota e como em ensaios de infecção com macrófagos. A diminuição da intensidade de fluorescência foi dose-dependente para miltefosina e glucantime. Nós também avaliamos se durante o

momento de adesão dos promastigotas em macrófagos peritoneais, o microambiente hipóxico confere interferência neste processo. Na análise dos resultados verificamos que não houve diferença na porcentagem de macrófagos com promastigotas aderidos cultivados em hipóxia 6% de oxigênio comparado a normóxia 21% de oxigênio, mas houve uma diminuição de adesão na condição hipóxia 1% de oxigênio assim como na intensidade de fluorescência dos promastigotas. Concluimos que há uma boa manutenção da fluorescência dos parasitas, usando ensaios de seleção *in vitro* das formas promastigotas-GFP. Isto torna a *L. amazonensis*-GFP totalmente viável para o “screening” de fármacos. As formas amastigotas-GFP parecem ser menos sensíveis a geneticina que as formas promastigotas-GFP. Sendo assim, as formas promastigotas-GFP são melhores para o processo de seleção.

ABSTRACT

Leishmania-GFP has facilitated the monitoring of *in vitro* and *in vivo* assessment of infection to antileishmanial drugs. The advantage *Leishmania*-GFP as a tool for quantification of infection over traditional methods of fixation and staining is that it consists of fast and direct analysis without sample pre-preparation. However the expression of the GFP gene is heterogeneous in populations of transfected parasites and in the host, plasmid is lost in the absence of selective pressure for resistance marker resulting in low of fluorescence intensity. The methods of selection are used to promastigotes and there are no reports using amastigotes. In our tests, *in vitro* selection with the antibiotic geneticin, GFP-promastigotes, reaching a 90% of fluorescent parasites. *In vivo* selection of amastigotes from lesions of mice infected with *L. amazonensis*-GFP was observed as well as reduction in the lesion size and parasite load. However we observed an increase of fluorescence intensity in amastigotes from geneticin-treated mice compared to amastigotes from untreated mice as well as an increase of fluorescent parasites. *L. amazonensis*-GFP was successfully assayed for drug screening of using, miltefosine and glucantime, tested with promastigote and infected macrophages. The decrease of fluorescence intensity was miltefosine and glucantime dose-dependent concentration. We also evaluated adhesion of promastigotes to macrophages; hypoxic microenvironment (1% O₂) confers interference in this process. In the analysis of the results we found no difference in the percentage of macrophages with attached promastigotes cultured in 6% oxygen hypoxia compared to normoxia 21% oxygen, but there was a decrease of adhesion in hypoxia condition 1% oxygen as well as in fluorescence intensity of promastigotes. We conclude that there is a

good maintenance of parasites fluorescence, Which makes *L. amazonensis*-GFP fully viable for drug screening. The GFP-amastigote appears to be less sensitive to geneticin that GFP-promastigotes. Thus the GFP-promastigotes are better for the selection process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de restrição para pXG- GFP.....	13
Figura 2: Curva de crescimento <i>L. amazonensis</i> -GFP e <i>L. amazonensis</i> não transfectado (“selvagem”).....	25
Figura 3: Intensidade de fluorescência de promastigotas-GFP.....	26
Figura 4: Intensidade de fluorescência de amastigotas-GFP.....	27
Figura 5: Visualização de <i>L. amazonensis</i> -GFP.....	27
Figura 6: Intensidade de fluorescência ao longo de 56 dias de cultura.....	28
Figura 7: Visualização da perda da intensidade de fluorescência.....	29
Figura 8: Fluorescência de amastigotas-GFP retirados de lesão.....	30
Figura 9: Fluorescência dos promastigotas selecionados e não selecionados.....	32
Figura 10: Número de promastigotas-GFP após seleção <i>in vitro</i>	33
Figura 11: Análise de parasitas fluorescentes pela citometria de fluxo.....	33
Figura 12: Fluorescência dos amastigotas-GFP selecionados <i>in vitro</i>	35
Figura 13: Número de amastigotas-GFP após seleção <i>in vitro</i>	35
Figura 14: Visualização de amastigotas-GFP selecionados <i>in vitro</i>	36
Figura 15: Análise de amastigotas fluorescentes pela citometria de fluxo.....	37
Figura 16: Ensaio <i>in vivo</i> 1.....	39
Figura 17: Ensaio <i>in vivo</i> 2.....	41
Figura 18: Ensaio <i>in vivo</i> 3 e 4.....	43
Figura 19: Ensaio <i>in vivo</i> 5 e 6.....	46
Figura 20: Ensaio <i>in vivo</i> 7.....	48

Figura 21: Intensidade de fluorescência dos promastigotas-GFP tratados com diferentes concentrações de miltefosina.....	49
Figura 22: Contagem dos promastigotas-GFP tratados com diferentes concentrações de miltefosina.....	50
Figura 23: Ensaio de infecção com macrófagos J774.....	51
Figura 24: Ensaio de infecção com macrófago peritoneal.....	52
Figura 25: Avaliação da infecção de macrófagos tratados com glucantime.....	54
Figura 26: Fluorescência de macrófagos infectados com promastigotas-GFP e tratados com glucantime.....	54
Figura 27: Ensaio de adesão de promastigotas-GFP em macrófagos peritoneais em condição normóxia e hipóxia.....	56
Figura 28: Fluorescência da cultura de macrófagos com promastigotas-GFP aderidos.....	56
Figura 29: Visualização de macrófagos peritoneais aderidos com promastigotas-GFP.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	3
---------------	---

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Leishmaniose.....	2
1.2 Aspectos da patologia das lesões cutâneas.....	5
1.3 Interação <i>Leishmania</i> e macrófagos.....	7
1.4 Relevância fisiológica da hipóxia.....	8
1.5 Efeitos da hipóxia em macrófagos.....	9
1.6 Green Fluorescent Protein e <i>Leishmania</i> -GFP.....	10
1.7 <i>Leishmania</i> -GFP.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Parasitas.....	18
3.2 Medição da fluorescência.....	18
3.2.1 Espectrofluorímetro.....	18
3.2.2 Microscópio acoplado a fluorescência.....	19
3.2.3 Citômetro de fluxo.....	19
3.3 Seleção <i>in vitro</i> dos parasitas.....	19
3.4 Seleção <i>in vivo</i> dos parasitas.....	20
3.5 Ensaio de toxicidade de promastigota com miltefosina.....	20
3.6 Ensaio de infecção de macrófagos com <i>L. amazonensis</i> -GFP.....	20
3.7 Ensaio de adesão de <i>L. amazonensis</i> -GFP em macrófagos peritoneais.....	21

3.8 Microambientes celulares.....	22
3.9 Análise dos resultados.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Comparação entre <i>L. amazonensis</i> -GFP e <i>L. amazonensis</i> não transfectada.....	25
4.2 Intensidade de fluorescência da <i>L. amazonensis</i> -GFP.....	25
42.1 Verificação da diminuição da intensidade de fluorescência.....	28
4.3 Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>L. amazonensis</i> -GFP.....	31
4.3.1 Ensaio <i>in vitro</i> de seleção de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> - GFP.....	31
4.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> de seleção de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> - GFP.....	34
4.4 Ensaio <i>in vivo</i> de seleção de <i>L. amazonensis</i> -GFP.....	37
4.5 Ensaio <i>in vitro</i> para avaliar a eficiência de <i>L. amazonensis</i> -GFP.....	49
4.5.1 Ensaio de toxicidade de promastigotas de miltefosina.....	49
4.5.2 Ensaios de infecção de macrófagos J774.....	50
4.5.3 Ensaios de infecção de macrófagos J774 com <i>L. amazonensis</i> -GFP e tratamento com glucantime.....	53
4.5.4 Ensaios de adesão de promastigotas-GFP em macrófagos peritoneais.....	55
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1- INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A primeira observação do parasita *Leishmania* foi feita por Cunnigham em 1885 e, posteriormente, a descrição foi feita por Leishman (1900) e Donovan (1903) de parasitas encontrados no tecido esplênico de pacientes na Índia (HANDMAN, 1999). Em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania* e denominou *Leishmania donovani* o agente causador do calazar (DONOVAN, 1903). No Brasil, o primeiro a relatar a doença e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores foi Cerqueira em 1885, na Bahia (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A leishmaniose é prevalente nas regiões dos trópicos e subtropicais, desde a América Central e Sul até o oeste da Ásia e Sul da Europa (CUNNINGHAM, 2002). Esta parasitose figura como um importante problema de Saúde Pública, endêmica em 88 países, com incidência estimada em 2 milhões de novos casos por ano (HANDMAN, 2001; World Health Organization; SAKTHIANANDESWAREN et al., 2009). No Brasil, tem ocorrido a progressão da doença, pois, no período entre 2001 a 2007, foram registrados 185.037 casos de leishmaniose tegumentar e, no ano de 2008, foram notificados 1.580 casos na Região Sudeste (Ministério da Saúde).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, apresentam ciclo de vida heteroxênico, vivendo em insetos vetores na forma promastigota e em hospedeiros vertebrados, na forma amastigota (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A *Leishmania* na forma flagelada promastigota parasita o intestino médio do inseto vetor, onde multiplica-se por divisão binária e ocorre a formação de estágios infectantes, os promastigotas metacíclicos que migram para a probóscida do inseto durante o repasto sanguíneo e são inoculados no hospedeiro vertebrado. No

hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* parasita as células do sistema fagocítico mononuclear onde diferencia-se na forma aflagelada amastigota e multiplica-se no vacúolo parasitóforo até que haja o rompimento celular quando infecta novas células. No momento do repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere células infectadas com amastigotas que no seu intestino vão se diferenciar em promastigotas fechando o ciclo de vida da *Leishmania* (HANDMAN, 2001).

O protozoário *Leishmania* é responsável pelo aparecimento de doenças que variam de lesões cutâneas simples, caracterizadas pelo desenvolvimento de uma úlcera no local da picada, que curam espontaneamente; lesões cutâneas difusas que ocorrem em indivíduos com sistema imunológico deficiente; lesões mucosas com destruição tecidual intensa e lesões viscerais, doença sistêmica severa que quando não tratada, é fatal (MURRAY et al., 2005; HANDMAN, 2001, HANDMAN, 1999). As leishmanioses estão tradicionalmente divididas em dois grupos: leishmaniose do Velho Mundo (Sul da Europa, Oriente Médio, Ásia e África) e leishmaniose do Novo Mundo (América Latina). A maioria das espécies do Velho Mundo causa a doença benigna cutânea enquanto que as espécies do Novo Mundo causam desde lesão cutânea até lesão da mucosa (BLUM & HATZ, 2009).

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas por insetos vetores do gênero *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) (HANDMAN, 1999). A leishmaniose pode ter caráter zoonótico, sendo os animais silvestres e domésticos potenciais reservatórios do parasita e os seres humanos hospedeiros acidentais. A leishmaniose também pode ter caráter antroponótico (DESJEUX, 2004; HANDMAN, 2001).

A maioria das leishmanioses pode ser tratada, porém a eficácia do fármaco dependerá da espécie de *Leishmania*, da resistência do parasita ao fármaco, da disseminação e localização da lesão no corpo do hospedeiro, estado imunológico do hospedeiro, toxicidade ao fármaco, frequência de recidiva e re-infecção e faixa etária (GONZÁLEZ et al., 2008).

Os fármacos anti-leishmania incluem: glucantime, fármaco de primeira escolha, é um antimonial pentavalente utilizado há décadas e com vários efeitos colaterais descritos (BALANÃ-FOUCE et al., 1998). Pentamidina, fármaco também de primeira escolha e os possíveis mecanismos de ação incluem a interferência com a síntese de DNA, alteração morfológica do citoesqueleto e fragmentação da mitocôndria do parasita (DAVID & CRAFT, 2009). Paramomicina, um aminoglicosídeo de formulação tópica e parenteral, sendo que a administração tópica é pouco eficiente se aplicada isoladamente, e a administração parenteral é tão eficaz quanto os antimoniais (DAVID & CRAFT, 2009). A anfotericina B, causa efeitos colaterais nos pacientes; seu mecanismo de ação é a ligação ao ergosterol da membrana do parasita (MISHRA et al., 2007; CROFT et al., 2006; CROFT et al., 1996). Miltefosina, um lisofosfolípídio-análogo, usado originalmente no tratamento de câncer, foi liberado para uso em humanos com leishmaniose, mostrando resultados bastante favoráveis em pacientes com leishmaniose visceral na Índia (CROFT et al., 1996); teria um efeito no metabolismo de fosfolípidios, na biosíntese de glicolípidios e glicoproteínas e induziria a morte do parasita por apoptose (MISHRA et al., 2007; CROFT et al., 1996). Os antifúngicos como cetoconazol e fluconazol também tem atividade anti-leishmania, porém os resultados da terapia são duvidosos (GONZÁLEZ et al., 2008; CROFT et al., 2006). Além destes fármacos, alguns métodos de terapia física tem sido testados, como a vaporização,

cauterização, excisão cirúrgica, termoterapia, crioterapia (que é a utilização de nitrogênio líquido para tratar lesões individuais e destruir o tecido infectado), porém todos estes processos são trabalhosos e inadequados para lesões múltiplas (GONZÁLEZ et al, 2008).

O controle da leishmaniose depende de uma detecção rápida de casos, tratamento precoce, controle de vetores em focos zoonóticos e do reservatório animal (REITHINGER et al., 2007; DESJEUX, 2004). O tratamento é caro, tóxico e há resistência aos fármacos utilizados tradicionalmente (CROFT et al., 2006).

No controle dos vetores, evidências atuais indicam que a nebulização espacial de inseticidas é pouco eficaz e que o efeito residual de pulverização na casas é mínimo. Além disso, cada mudança ambiental seja um fenômeno natural ou pela intervenção humana altera, o “equilíbrio” ecológico e o contexto do desenvolvimento dos vetores (AMÓRA et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 2008).

No controle do reservatório animal o caráter zoonótico de transmissão acaba limitando intervenções eficazes; em animais domésticos, há problemas quanto ao diagnóstico de cães assintomáticos e as medidas de controle como eutanásia do animal acabam sendo impedidas pelos proprietários dos animais (ROMERO & BOELAERT, 2010).

1.2 Aspectos da patologia das lesões cutâneas

As leishmanioses cutâneas podem ser causadas por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo (EL-ON, 2009). As leishmanioses cutâneas variam em severidade, aparência clínica e tempo de cura (REITHINGER et al., 2007). Dependendo da espécie de

Leishmania, as lesões podem progredir em nódulos eritematosos, placas endurecidas, placas escamosas e úlceras com relevo. As lesões podem ser secas, com crostas ou acompanhadas de exsudatos (DAVID & CRAFT, 2009). Determinantes da patogenicidade da leishmaniose cutânea, incluindo cura espontânea, persistência, disseminação e reativação são ainda mal compreendidos, mas estão relacionados à virulência do parasito e estado imunológico do hospedeiro (HERWALDT, 1999).

A leishmaniose cutânea é caracterizada inicialmente como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo; com a evolução, é notável o polimorfismo das lesões, sendo frequentes as ulcerações com bordas elevadas e fundo com tecido de granulação. Histologicamente, é um granuloma composto por infiltrado de linfócitos, células epiteliais e parasitas (HANDMAN, 2001). A lesão pode ter regressão espontânea, mas em alguns casos progride e surgem lesões cutâneas e/ou mucosas, conseqüente da disseminação hematogênica ou linfática do parasita (GONTIJO & CARVALHO, 2003). As lesões com pápulas, nódulos ou nódulos-ulcerados são mais comuns à leishmaniose do Velho Mundo e as lesões ulceradas são mais comuns na leishmaniose do Novo Mundo (MURRAY et al., 2005).

As lesões causadas pela infecção com *Leishmania amazonensis*, espécie utilizada neste estudo, apresentam inicialmente um pequeno eritema que se desenvolve em pápulas que progride lentamente para nódulo, ocorrendo a ulceração de bordas bem delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações grosseiras (REITHINGER et al., 2007; GONTIJO & CARVALHO, 2003). A infecção geralmente é limitada à pele e sistema linfático, apresenta cura espontânea e é suscetível ao tratamento, mas pode provocar a forma cutânea difusa caracterizada por lesões

nodulares disseminadas nos membros e no rosto (WEIGLE & SARAIVA, 1996; GRIMALDI & TESH, 1993).

O processo de infecção e multiplicação intracelular da *Leishmania*, juntamente com a incapacidade do hospedeiro em diminuir a carga parasitária conduz a uma inflamação crônica com infiltrado celular e formação de granuloma, apresentando áreas com isquemia e consequente hipóxia tecidual.

1.3 Interação *Leishmania* e macrófagos

É descrito que a fagocitose do parasita é composta por dois eventos distintos, mas constitutivos: a adesão e a interiorização na célula hospedeira (ZENIAN et al., 1979). A infecção depende da interação de ligantes dos promastigotas com receptores dos fagócitos mononucleares, tanto para adesão como para a fagocitose. Essas interações incluem ligação das moléculas de superfície do parasita ou opsonização de moléculas derivadas do hospedeiro (SAMPAIO et al., 2007). A entrada da *Leishmania* no macrófago envolve a deposição de componentes do complemento, anticorpos e a presença de manose e proteínas ligadoras de heparina na superfície do parasita (HESPANHOL et al., 2005; LOVE et al., 1993; BLACKWELL et al., 1985; BOSETTO & GIORGIO, 2007).

Muitos estudos que investigam a interação de *Leishmania* e macrófagos têm sido descritos na literatura (SAMPAIO et al., 2007). As principais moléculas de adesão presentes na superfície de promastigotas são: glicoproteínas (gp63) e lipofosfoglicanos (LPG) sendo reconhecidos como os principais fatores de virulência (HANDMAN, 1999). A ligação de *Leishmania* aos macrófagos pode ocorrer por meio da interação direta das gp63 e LPG a receptores de manose/fucose de macrófagos (BUENO, 2006). Já a forma

amastigota apresenta expressão diminuída destas moléculas em sua superfície e menos se sabe sobre as moléculas que participam da entrada do amastigota na célula hospedeira (HANDMAN, 1999; KIMA et al., 2000).

Contudo, os estudos sobre a interação *Leishmania*-célula são importantes para compreender se estas interações específicas servem para a aderência do parasita ou se são importantes também para a fagocitose (WYLER et al., 1985).

1.4 Relevância fisiológica da hipóxia

Em tecidos saudáveis, a pressão parcial de oxigênio está entre 20 e 70 mmHg (2,5 % a 9% O₂). No parênquima pulmonar, fígado, rins e coração, por exemplo, a concentração de O₂ está entre 14% O₂ e 4% O₂; em tecidos menos irrigados, a concentração de O₂ é mais baixa, por exemplo, no olho, de 1% O₂ a 5% O₂ e na medula óssea, de 0% O₂ a 4% O₂ (IVANOVIC, 2009; LEWIS et al., 1999). Em várias patologias, são observadas a oclusão do fluxo sanguíneo, a vasoconstrição e a proliferação celular que resultam em queda acentuada da pressão parcial de oxigênio (hipóxia) tecidual.

Hipóxia é característica de neoplasias, arteriosclerose, fraturas ósseas, artrites e reações inflamatórias (MURDOCH et al., 2005; LEWIS et al., 1999). Por exemplo, em tecido dérmico lesado experimentalmente, a concentração de O₂ é de 0,7% O₂ a 4% O₂ sendo que a área central da lesão, composta por fibrina, plasma, infiltrado leucocitário e tecido conectivo, apresenta os níveis mais baixos de O₂ (REMENSNYDER & MAJNO, 1968). A presença de hipóxia nessas lesões tem sido relacionada à indução de citocinas angiogênicas e à síntese de proteínas da matriz extracelular, processo de cicatrização (MURDOCH et al., 2005). Por outro lado, em algumas patologias, a angiogênese estimulada pela hipóxia favorece a progressão da doença como no caso

da retinopatia, artrite reumatóide e tumores malignos. Há evidências de que dificuldades na difusão/infusão de quimio e radioterápicos durante o tratamento de carcinomas estão associadas à presença de hipóxia nos tecidos tumorais (MURDOCH et al., 2005).

Apesar da hipóxia ter sido, por muito tempo, relacionada a efeitos deletérios, como inibição da proliferação e morte celular, vários estudos tem demonstrado que as alterações na pressão parcial de oxigênio são fisiologicamente importantes, pois estas alterações conduzem o organismo a um processo adaptativo, com a finalidade de restaurar os níveis fisiológicos de oxigênio. As respostas celulares à hipóxia variam de mudanças no fluxo de íons na membrana plasmática e alterações na proliferação, indução de genes específicos e apoptose (HELFMAN & FALANGA, 1993; YUN et al., 1997; LEWIS et al., 1999; KOH; SPIVAK- KROIZMAN; POWIS, 2008; SEMENZA, 2009).

As lesões causadas pela *L. amazonensis*, espécie empregada nesta pesquisa, apresentam parasitas em proliferação, migração de células inflamatórias e infecções secundárias com bactérias anaeróbicas (GIORGIO et al., 1998), características de tecidos com baixa concentração de oxigênio. De fato, recentemente nosso grupo demonstrou que lesões murinas induzidas pela *L. amazonensis* são hipóxicas (ARRAIS-SILVA et al., 2005; DEGROSSOLI et al., 2007).

1.5 Efeitos da hipóxia em macrófagos

Nosso grupo demonstrou, pela primeira vez, o efeito da baixa tensão de oxigênio em macrófagos durante um processo infeccioso, com a *L. amazonensis* (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004; DEGROSSOLI & GIORGIO, 2007). A avaliação, com diferentes linhagens de macrófagos humanos e murinos, demonstrou que o cultivo

em 5%O₂ reduz em cerca de 50% o número de células infectadas e os parasitas intracelulares. As células estão integras nestas condições indicando que fatores tais como a capacidade de aderência dos parasitos na membrana do macrófago devem estar alteradas (COLHONE et al., 2004). A hipóxia também pode prejudicar o efeito dos fármacos, glucantime e miltefosina em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (AYRES et al., 2008).

1.6 Green fluorescent protein e *Leishmania*- GFP

A *Green fluorescent protein* (GFP) foi descoberta e isolada do cnidário *Aequorea victoria*, pelos pesquisadores Shimomura e Johnson em 1961 (*apud* SHIMOMURA, 2009). Em 1979, foi descoberta a estrutura química do cromóforo GFP. Entretanto, a GFP não foi utilizada nos 30 anos posteriores de sua descoberta. Apenas em 1994 a GFP foi clonada e expressa em organismos procarióticos e eucarióticos por Chalfie et al. (1994).

A GFP purificada é uma proteína de 238 aminoácidos, absorve a luz azul com pico de excitação de 470 nm e emite luz verde com emissão de 509 nm (CHALFIE et al., 1994). Esta fluorescência não requer nenhum gene adicional produzido pela *A. victoria* e a formação do cromóforo não é espécie-específica, ocorre através da utilização de componentes celulares ou por autocatálise (CHALFIE et al., 1994). A GFP requer apenas a irradiação de luz ultravioleta ou luz azul o que proporciona um excelente meio para o acompanhamento da expressão gênica e localização de proteínas em organismos vivos (CHALFIE et al., 1994).

A fluorescência da GFP tem sido expressa em bactérias, fungos, plantas, *Drosophila*, protozoários e células de mamíferos (YANG et al., 1996). A maioria das

fusões de proteínas hospedeiras com o gene GFP são fusões em “tandem” simples, em que o C-terminal de uma proteína é conectado ao N-terminal de outra proteína, o que resulta em um marcador fluorescente para monitorar atividades subcelulares como a expressão gênica. Nesse caso, o gene que codifica a GFP é fusionado no quadro de inserção no vetor, com o gene que codifica proteínas endógenas e a químera resultante é expressa na célula do organismo de interesse. A fusão ideal da GFP com a proteína hospedeira preserva tanto a fluorescência da GFP como todas as funções fisiológicas da proteína hospedeira (TSIEN, 1998; LIU et al., 1999; CUBITT et al., 1995).

A GFP originalmente clonada da *A. victoria*, ou GFP selvagem, apresenta algumas “deficiências”, como baixa luminosidade e atraso entre a síntese protéica e o desenvolvimento da fluorescência. Contudo, felizmente, a proteína pôde ser re-projetada por mutagênese de forma a melhorar essas deficiências e deslocar o comprimento de onda de excitação e emissão criando diferentes cores, por exemplo, o GFP recombinante S65T (utilizado neste estudo) e EGFP (CUBITT et al., 1995). A diferença entre a GFP selvagem e a GFP recombinante S65T está na substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo metil da proteína; resultando numa GFP recombinante de baixa toxicidade, maior solubilidade no citoplasma das células e fluorescência 18 vezes mais intensa (excitação 435nm e emissão 538nm), comparada com a GFP selvagem (CRAGGS, 2009; CHIARINI & PENNA, 2003).

A fluorescência da GFP pode ser visualizada diretamente sob iluminação com luz azul ou ultravioleta. O espectrofluorímetro é uma forma mais precisa de quantificar a fluorescência GFP e não requer a adição de substratos exógenos (CHALFIE & KAIN, 2006). Além disso, o uso da fluorescência como expressão de gene repórter permite o uso de tecnologias que, não somente quantificam a fluorescência, como separam

fisicamente microorganismos com base na sua intensidade relativa de fluorescência. Entre estas tecnologias, o citômetro de fluxo lê a intensidade de fluorescência de cada partícula que passa através da área de detecção do laser, permitindo analisar uma população grande de células e determinar os níveis de expressão gênica (CHALFIE & KAIN, 2006).

1.7 *Leishmania*- GFP

A GFP também tem várias propriedades que são favoráveis, como uso de gene repórter, viabilidade, a localização citoplasmática, baixa toxicidade, produção contínua durante a replicação celular, fácil visualização e quantificação detectada microscopicamente e por citometria de fluxo ("Fluorescence-activated cell sorting" - FACS) ou através de fluorimetria (COLLINS et al., 1998).

O resultado da fusão do gene GFP ao genoma da *Leishmania*, a *Leishmania*-GFP, é uma aplicação viável que facilita o monitoramento de ensaios *in vitro* e *in vivo* de infecção para avaliação de fármacos leishmanicidas (SINGH & DUBE, 2004; HA et al. 1996; SOUZA et al., 2007).

A transfecção dos promastigotas de *L. amazonensis*, utilizados neste trabalho, foi feita por eletroporação com o fragmento do gene que codifica para a extensão do C-terminal da cisteína proteinase fusionada ao gene repórter GFP no vetor pXG - 'GFP+ (S65T), desenvolvido por Beverly (Figura 1) (HA et al., 1996; ROSSI-BERGMANN et al., 1999). O vetor pXG é um derivado do pX63NEO, que contém um marcador de resistência à geneticina.

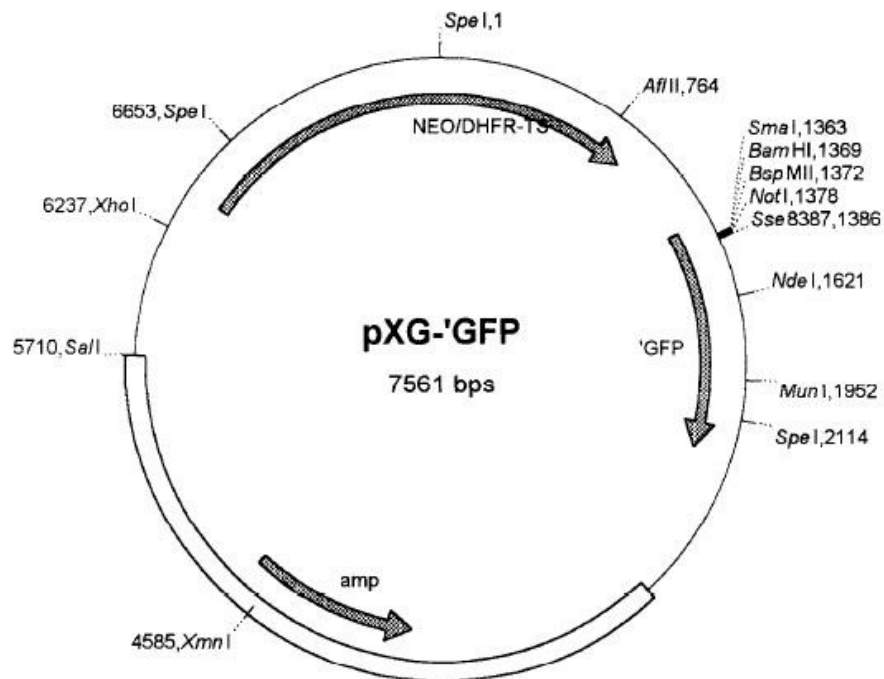


Figura 1: Mapa de restrição para pXG-'GFP. A região aberta representa o vetor bacteriano (pSP6-T3), a seta preta representa RNAm direcionado pelo processamento de sinais presentes nas regiões intergênicas de *L. amazonensis*. *NEO/DHFR-TS* representa o marcador de resistência *NEO* (neomicina) flanqueado pela região intergênica *DHFR-TS* (dihidrofolato redutase – timidilato sintase), enquanto o 'GFP representa o cassete de fusão da proteína GFP, flanqueado na margem 5' pela região intergênica *DHFR-TS DST* ("downstream") e na margem 3' pela região intergênica 1.7-/ RNAm. 'Amp' (ampicilina) marca a β -lactamase, que só é expressa em *E. coli*. Todos os sítios para as enzimas de restrição foram mostrados (Ha et al., 1996).

A vantagem de usar a *Leishmania*-GFP como uma ferramenta de quantificação da infecção sobre os métodos tradicionais de fixação e coloração de ensaios *in vitro* é que consiste em método rápido, de análise direta da amostra sem a necessidade de uma pré-preparação (CHAN et al., 2003; KAMAU et al., 2001). Sabe-se, no entanto, que a expressão do gene GFP é heterogênea nas populações de parasitas transfectados e, no hospedeiro vertebrado, o plasmídeo é perdido na ausência de pressão seletiva ao marcador de resistência (MIBLITZ et al, 2000). Isto resulta em perda da intensidade de fluorescência ao longo de vários repiques, fazendo-se necessária a contínua seleção dos parasitos fluorescentes com o antibiótico geneticina.

Na literatura são documentados métodos de seleção dos transfectados apenas com a forma promastigota de *Leishmania*. Não há relatos de seleção de amastigotas de *Leishmania*-GFP, esta última sendo a responsável pela manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado. Assim, embora a seleção *in vitro* das formas promastigotas transfectadas seja realizada com sucesso, é ainda mais desejável e informativo que estudos envolvendo as formas amastigotas, ocorrendo no hospedeiro mamífero e alvo do sistema imune e de fármacos, sejam realizados, justificando o desenvolvimento de métodos para manutenção da intensidade de fluorescência em amastigotas-GFP (MIBLITZ et al, 2000).

A Dra. Bartira Rossi-Bergmann, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, colaboradora do nosso grupo de pesquisa, nos cedeu promastigotas de *Leishmania amazonensis* expressando a GFP que foram usadas como ferramenta para a análise do potencial de seleção de amastigotas e promastigotas pela avaliação quantitativa da fluorescência por espectrofluorimetria, citometria de fluxo e avaliação qualitativa por microscopia (BOECK et al., 2006, PINHEIRO et al., 2005; HA et al. 1996).

2- OBJETIVOS

O objetivo principal deste projeto foi a análise do potencial de seleção das formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*-GFP.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Padronização de ensaio de seleção para a manutenção da fluorescência em promastigotas de *L. amazonensis*-GFP .
- 2- Padronização de ensaio de seleção para a manutenção da fluorescência em amastigotas de *L. amazonensis*-GFP .
- 3- Padronização de ensaios de infecção *in vitro* utilizando a *L. amazonensis*-GFP e avaliação de sua eficiência no “screening” de fármacos leishmanicidas.
- 4- Comparação da capacidade de aderência de *L. amazonensis*-GFP nos macrófagos expostos em microambiente normóxico e hipóxico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasitas:

Promastigotas *L. amazonensis*-GFP foram gentilmente cedidos pela Dra. Bartira Rossi-Bergmann do Instituto Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e foram mantidos em meio de cultura Earle 199 (Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell), L-glutamina 0,1g/L, D-glicose 1,0g/L, NaHCO₃ 2,2 g/L, Penicilina 10.000UI, Estreptomicina 0,050g/L e selecionados periodicamente com o antibiótico geneticina (G418) (Life Technologies, Sigma A8601) (BOECK et al., 2006; PINHEIRO et al., 2005). Os promastigotas foram cultivados em garrafas plásticas de cultura em estufa seca a temperatura de 26°C a 28°C.

Amastigotas foram mantidos em camundongos Balb/c, linhagem susceptível à infecção, sendo os camundongos infectados subcutaneamente no coxim plantar de uma das patas traseiras com 2×10^7 promastigotas (GIORGIO et al, 1998). Os amastigotas foram retirados das lesões de camundongos, através de raspagem com bisturi estéril em solução salina e o número de amastigotas contados em câmara de Neubauer.

Os animais foram fornecidos pelo Centro Multi-Disciplinar de Bioterismo – CEMIB/UNICAMP, sob condição SFP (*Specific Patogen Free*) e mantido sob as mesmas condições no Biotério do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia – UNICAMP.

3.2 Medição da fluorescência:

3.2.1 A fluorescência (excitação: 485nm e emissão 528nm) de promastigotas e amastigotas foi medida em microplacas pretas Nunc, de 96 poços, pela diluição seriada (concentração máxima de 1×10^7 promastigotas e 4×10^7 amastigotas) em espectrofluorímetro (Multi-Detection Microplate Reader- Synergy HT, Bio-Tek, USA).

3.2.2 Os parasitas-GFP foram retirados da cultura e colocados em lâmina de vidro coberta com lamínula e visualizados em microscópio acoplado à fluorescência Eclipse 50i (Nikon, USA) e as imagens capturadas pelo software ACT-1 (Nikon, USA).

3.2.3 A intensidade de fluorescência dos parasitas também foi avaliada pela citometria de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), constituído de laser de íon argônio de 488nm, do Laboratório de Citometria de Fluxo – Hemocentro de Botucatu, UNESP em colaboração com a Dra. Márjorie de Assis Golim. A população de parasitas foi selecionada com uso dos parâmetros de tamanho (Forward Scatter - FSC) versus complexidade interna (Side Scatter - SSC), usando escala logarítmica. A intensidade de fluorescência verde emitida foi avaliada em histograma. Os parasitos (2×10^6) foram fixados com formaldeído 1% por cinco minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 10.000 rpm (rotações por minuto) a 30 segundos e lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

3.3 Seleção *in vitro* dos parasitas:

Promastigotas mantidos em meio de cultura ou amastigotas retirados de lesão de camundongos Balb/c mantidos em meio de cultura foram contados em câmara de Neubauer, no Tempo 0, momento em que os amastigotas são retirados da pata, Tempo 2 = 2 horas após a adição da geneticina na cultura, Tempo 4 = 4 horas após a adição da geneticina na cultura e Tempo 19 = 19 horas após a adição da geneticina na cultura. A seleção foi feita com diferentes concentrações de geneticina (100µg/ml a 1mg/ml) e a observação dos parasitas foi feita por microscópio acoplado a fluorescência, leitura da intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro ou ainda a fixação com formaldeído dos parasitas e verificação no citômetro de fluxo.

3.4 Seleção *in vivo* dos parasitas:

A seleção foi feita por aplicação via intra-lesional de 40mg/kg de geneticina em camundongos infectados. Os camundongos infectados controle foram tratados com solução salina (MURPHY et al., 1993).

O tamanho da lesão foi medido semanalmente com paquímetro. A avaliação da carga parasitária se deu pela contagem de parasitas em câmara de Neubauer logo após a eutanásia dos camundongos. Após os procedimentos descritos, os amastigotas foram centrifugados e diluídos em solução salina. A leitura da intensidade de fluorescência dos amastigotas em microplacas pretas foi realizada em espectrofluorímetro e/ou ainda após fixação com formaldeído dos parasitas para verificação no citômetro de fluxo.

(Ensaio aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP, nº 1878-1, 01 de junho de 2009 e nº 2196-1, 05 de julho de 2010).

3.5 Ensaio de toxicidade de promastigotas com miltefosina:

O fármaco miltefosina foi obtido da Cayman Chemical (USA). Os promastigotas-GFP foram incubados em triplicata em microplaca Nunc de 96 poços a 26°C, durante 48 horas, na presença de miltefosina em diferentes concentrações (0,2 μ M, 2,5 μ M e 5 μ M). Como controle, os parasitas foram incubados na ausência do fármaco. O número de parasitas nas culturas foi determinado pela contagem na câmara de Neubauer e pela leitura da intensidade de fluorescência no espectrofluorímetro (ver subitem 3.2.1).

3.6 Ensaio de infecção de macrófagos com *L. amazonensis*-GFP:

Os macrófagos peritoneais murinos ou macrófagos tumorais murinos J774 foram cultivados conforme protocolos já padronizados em nosso laboratório (DEGROSSOLI et al, 2007; COLHONE et al, 2004; DEGROSSOLI et al, 2004). Resumidamente, as células foram infectadas com amastigotas ou promastigotas-GFP durante diferentes períodos, na proporção de 3:1 amastigotas/macrófago e 20:1 promastigotas/macrófago em triplicata nas placas de 24 poços ou 6 poços (2×10^6 células/poço, 3×10^6 célula/poço, respectivamente). Após o período de interação, as culturas células foram lavadas para remoção dos parasitas livres e incubadas a 37°C, em 21% O₂, 5% CO₂ e balanceado com N₂, durante 24 horas (infecção com amastigota) ou 48 horas a 34°C (infecção com promastigota). As células também foram tratadas com 50µg/ml, 500µg/ml, 2mg/ml e 4mg/ml de glucantime por 24 horas; após o tratamento, foram lavadas com salina e transferidas para microplacas pretas usando 200µl de água destilada. A intensidade de fluorescência foi lida no espectrofluorímetro (ver subitem 3.2.1). Concomitantemente, as células foram fixadas com metanol e coradas com solução corante Giemsa durante 8 minutos. A porcentagem de infecção (% de macrófagos infectados e número de amastigotas/macrófago) foi avaliada em microscópio óptico, (CROWTHER et al., 2001; BROWN, 2002; ARRAIS-SILVA et al., 2005).

3.7 Ensaio de adesão de *L. amazonensis*-GFP em macrófagos peritoneais:

Macrófagos peritoneais murinos (3×10^6) foram cultivados em placas de 6 poços. Após 48 horas de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C, foram adicionados promastigotas-GFP na proporção de 18:1 parasitas/célula. A interação foi permitida por 45 minutos a 4°C em protocolo adaptado de BUTCHER et al (1992). As células foram lavadas com salina e transferidas para microplacas pretas usando 200µl de água destilada. A

intensidade de fluorescência foi lida no espectrofluorímetro (ver subitem 3.2.1). Concomitantemente, células foram fixadas com paraformaldeído 1% durante 30 minutos e coradas com solução corante Giemsa (8 minutos). A avaliação da adesão baseou-se na contagem de 200 células, em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com parasitas aderidos e número de amastigotas aderidos por células (LOVE; ESKO; MOSSER, 1993).

3.8 Microambientes celulares: para o experimento em hipóxia foi utilizada uma mistura padrão de gases (“mistura hipóxica”) contendo 2% O₂, 5% CO₂, balanceada com nitrogênio (White Martins S/A – Campinas/SP) (DEGROSSOLI et al, 2007; COLHONE et al, 2004; DEGROSSOLI et al, 2004). A placa de cultura celular foi exposta ao microambiente hipóxico 24 horas antes da interação dos parasitas com as células, utilizando-se uma câmara hipóxica (Billups-Rothenberg), a qual foi preenchida imediatamente com a “mistura hipóxica” durante 15 minutos, com uma vazão de 2 L/min; em seguida, as mangueiras de entrada e saída de gás foram fechadas e a câmara mantida na estufa de CO₂ a 37°C. A tensão de oxigênio no meio de cultura foi 35 mmHg (5% O₂). Em meio normóxico, a pO₂ foi 150 mmHg (21% O₂) (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004). Após 24 horas, a cultura de células foi retirada da câmara de hipóxia, as células foram lavadas e a interação parasita – célula foi permitida por 45 minutos a 4°C, tempo requerido para adesão.

3.9 Análise dos resultados:

Pelo menos três repetições de cada um dos ensaios descritos acima foram realizados separadamente e os resultados de cada experimento são expressos pela

média + SD. As diferenças significativas entre os grupos experimentais foram analisadas usando-se o Teste T Student (SPIEGEL, 1974).

4- RESULTADOS

4.1 Comparação entre *L. amazonensis*-GFP e *L. amazonensis* não transfectada

Primeiramente, investigamos se o desenvolvimento da *L. amazonensis*-GFP (MHOM/BR/75/Josefa) é semelhante ao da *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) não transfectada (“selvagem”), esta última, rotineiramente utilizada em nosso laboratório. Iniciamos com a comparação da curva de crescimento em fase logarítmica dos promastigotas *L. amazonensis*-GFP e *L. amazonensis* não transfectados. Não houve nenhuma diferença significativa na curva de crescimento entre os parasitas transfectados e os parasitas não transfectados como mostrado na Figura 2.

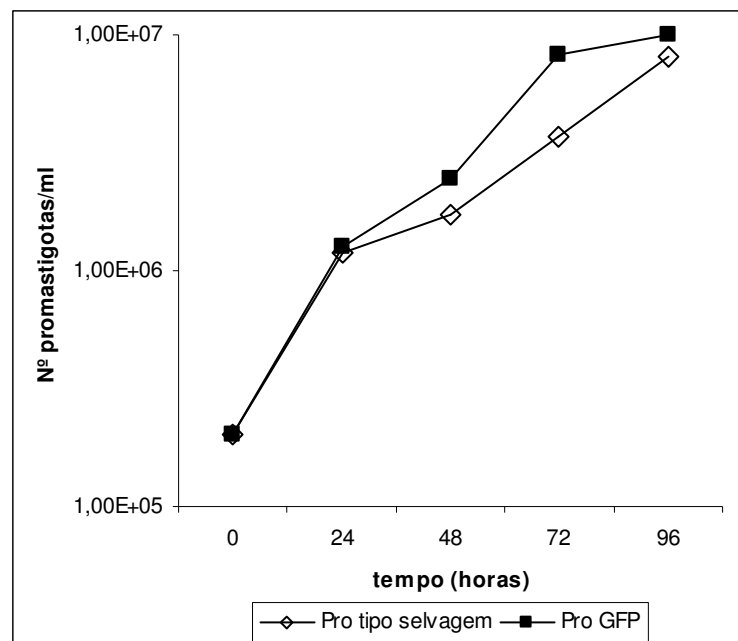


Figura 2: Curva de crescimento *L. amazonensis*-GFP e *L. amazonensis* não transfectado (“selvagem”). Promastigotas foram cultivados a $2,0 \times 10^5$ parasitas/ml em meio 199 em garrafas de cultura de 25cm². O número de parasitas foi contado em intervalos de 24 horas em câmara de Neubauer. Estatística $p > 0.05$

4.2 Intensidade de fluorescência da *L. amazonensis*-GFP

O próximo passo foi a investigação da intensidade de fluorescência dos promastigotas-GFP e amastigotas-GFP em espectrofluorímetro (Figura 3 e 4). Ambos,

promastigotas e amastigotas mostraram-se fluorescentes tanto pela leitura no espectrofluorímetro como pela visualização no microscópio; vale salientar que a fluorescência é mais intensa em promastigotas, por isso utilizou-se 1×10^7 promastigotas e 4×10^7 amastigotas para a leitura.

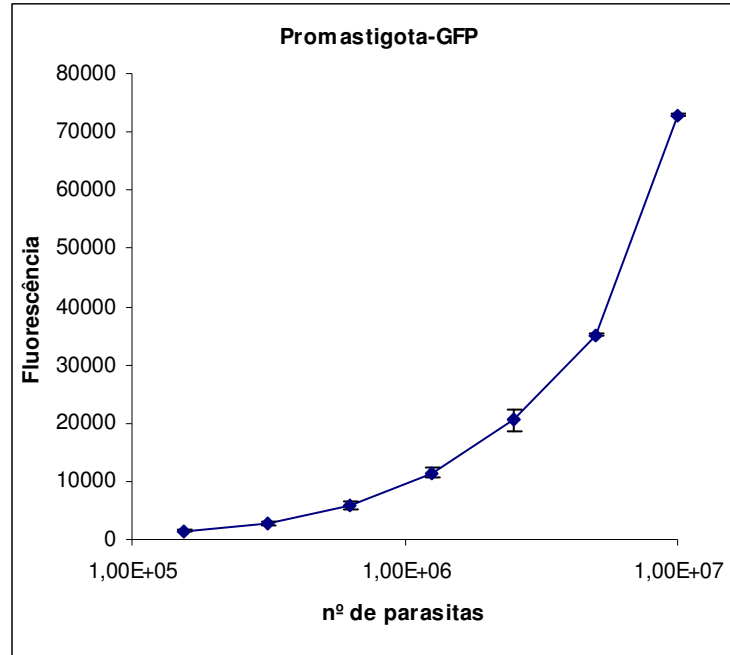


Figura 3: Intensidade de fluorescência de promastigotas-GFP. Através da diluição seriada dos parasitas (concentração inicial de 1×10^7) a intensidade de fluorescência foi medida em leitor espectrofluorimétrico.

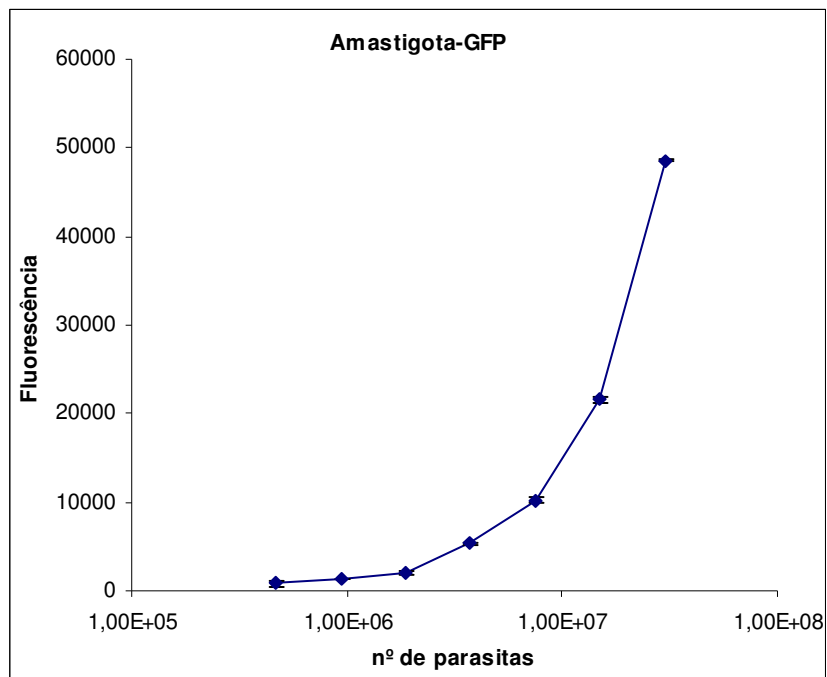


Figura 4: Intensidade de fluorescência de amastigotas-GFP. Através da diluição seriada dos parasitas (concentração inicial de 4×10^7) a intensidade de fluorescência foi medida em leitor espectrofluorimétrico.

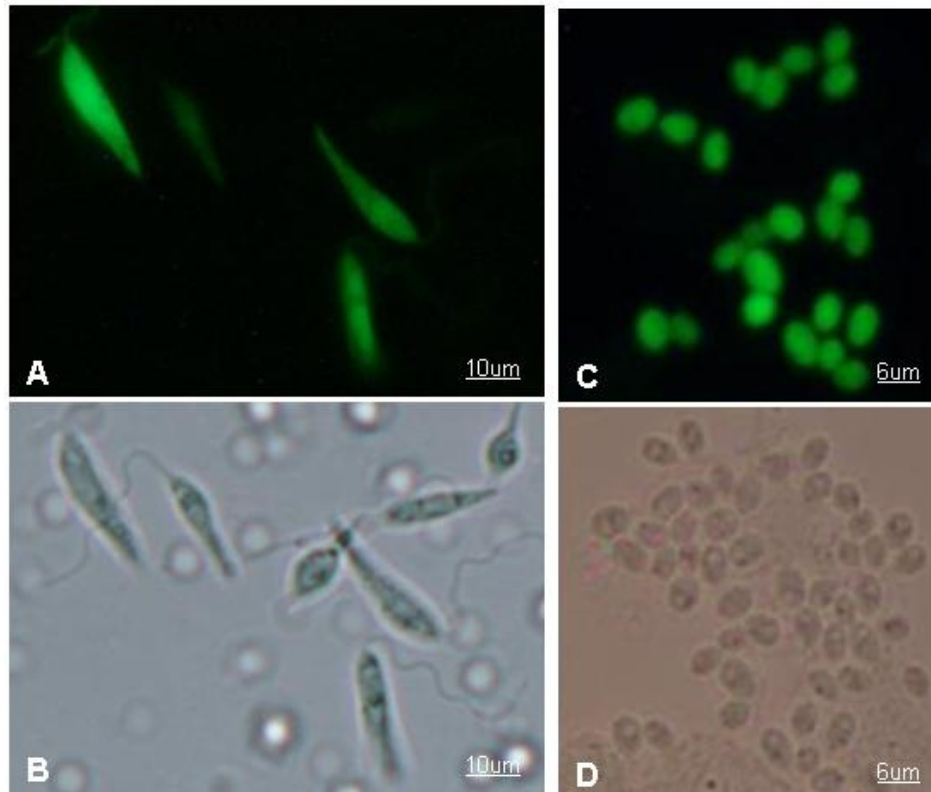


Figura 5: Visualização de *L. amazonensis*-GFP. Promastigotas e amastigotas *L. amazonensis*-GFP foram visualizados pelo microscópio acoplado a fluorescência e as imagens foram capturadas pelo software ACT-1. A- promastigota-GFP (fluorescência), B- promastigota-

GFP (contraste de fase); C- amastigota-GFP (fluorescência) D- amastigota-GFP (contraste de fase).

4.2.1 Verificação da diminuição da intensidade de fluorescência

Embora os parasitas estivessem fluorescentes, foi notável a perda da intensidade de fluorescência ao longo de vários repiques das culturas de promastigotas (Figuras 6 e 7). Por exemplo, após 32 dias em cultura, os promastigotas estão pouco fluorescentes, e após 41 e 56 dias, a fluorescência torna-se indetectável (Figura 6). Assim, devido a rápida diminuição da fluorescência dos parasitas-GFP, seu uso como substituto dos métodos de fixação e coloração é prejudicado. Por isso, neste trabalho, buscaram-se protocolos de seleção dos parasitos transfectados.

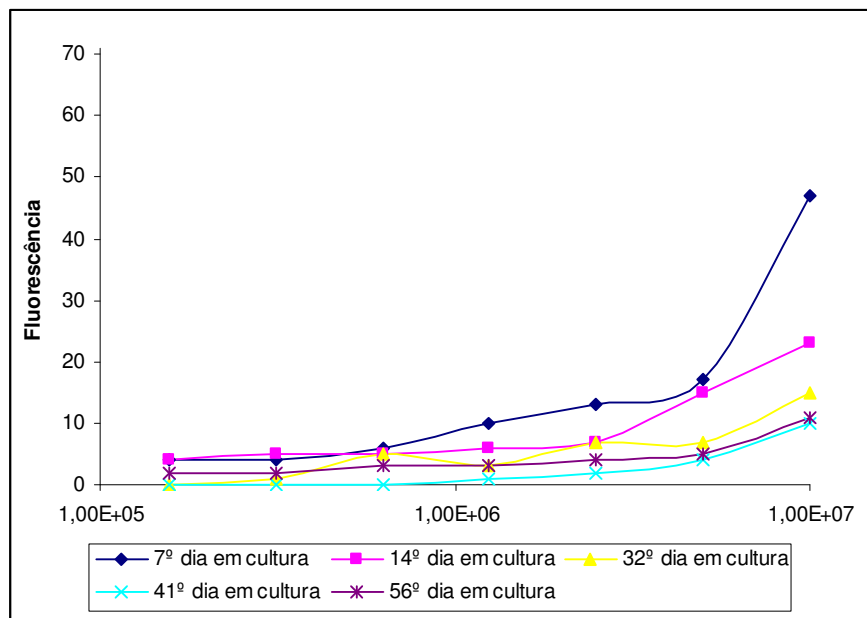


Figura 6: Intensidade de fluorescência ao longo de 56 dias de cultura. Promastigotas-GFP foram semeados em meio 199 em garrafas de 25cm² e as culturas de promastigotas foram mantida por 56 dias. Durante este período foi feita a diluição seriada dos parasitas (concentração inicial de 1×10^7) e a intensidade de fluorescência foi medida em leitor espectrofluorimétrico. (Obs: eixo X = nº de parasitas).

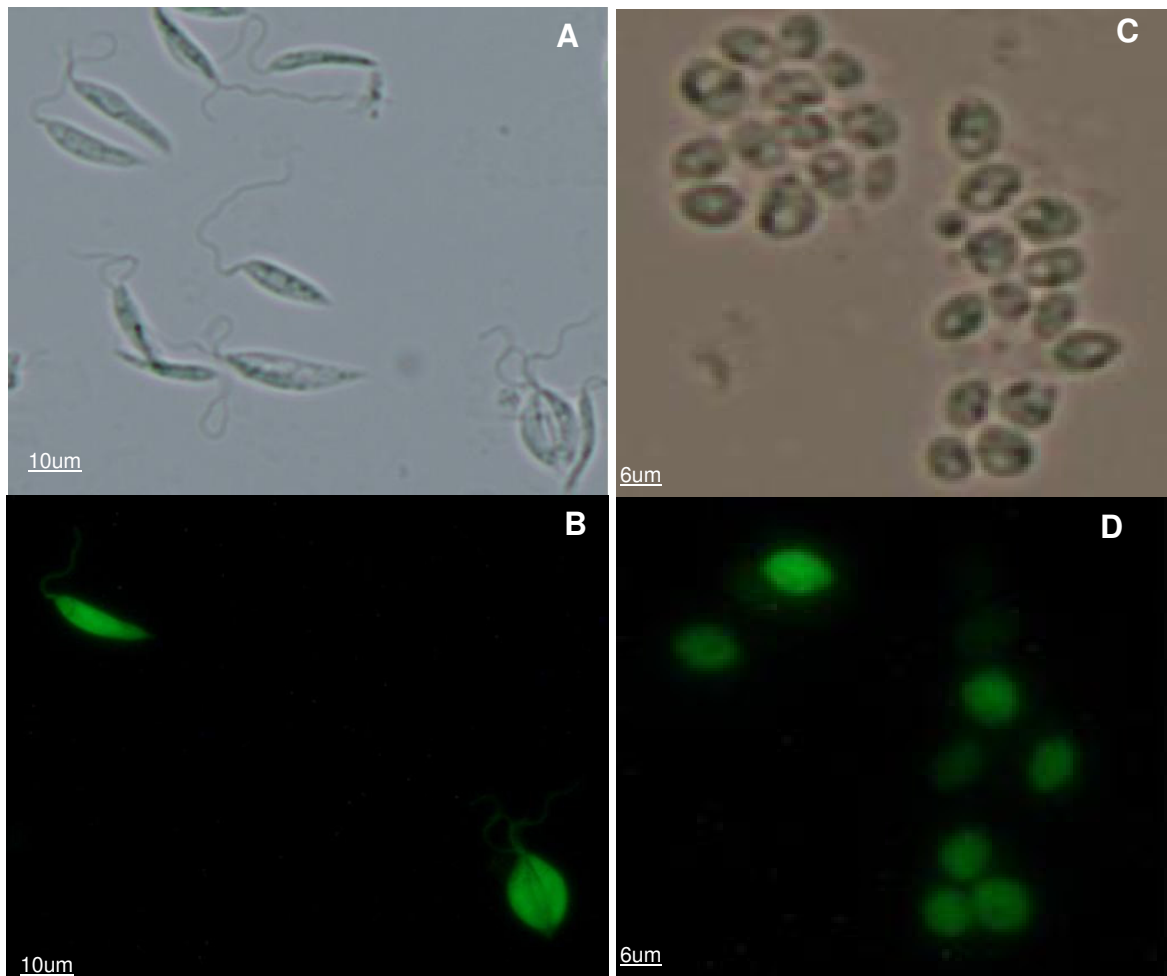


Figura 7: Visualização da perda da intensidade de fluorescência. Promastigotas e amastigotas *L. amazonensis*-GFP foram visualizados pelo microscópio acoplado a fluorescência e as imagens foram capturadas pelo software ACT-1. A- promastigota-GFP (contraste de fase). B- promastigota-GFP (fluorescência). C- amastigota-GFP (contraste de fase). D- amastigota-GFP (fluorescência).

Em relação aos amastigotas, a Figura 8 mostra a porcentagem de amastigotas fluorescentes, recuperados de lesão. Na análise pela citometria de fluxo, observa-se que em lesão de camundongos infectados com promastigotas fluorescentes (5×10^7), após 15 dias do inóculo, recupera-se 9,8% de amastigotas fluorescentes e, em lesões de camundongos com 1 mês de infecção recupera-se 5,6% de amastigotas fluorescentes. Já em lesões de camundongos infectados, com 2×10^7 , após 1 mês de

infecção, recupera-se 12,9% e lesões de camundongos infectados com 2×10^7 decorridos 6 meses de infecção, recupera-se 7,6% de amastigotas fluorescentes.

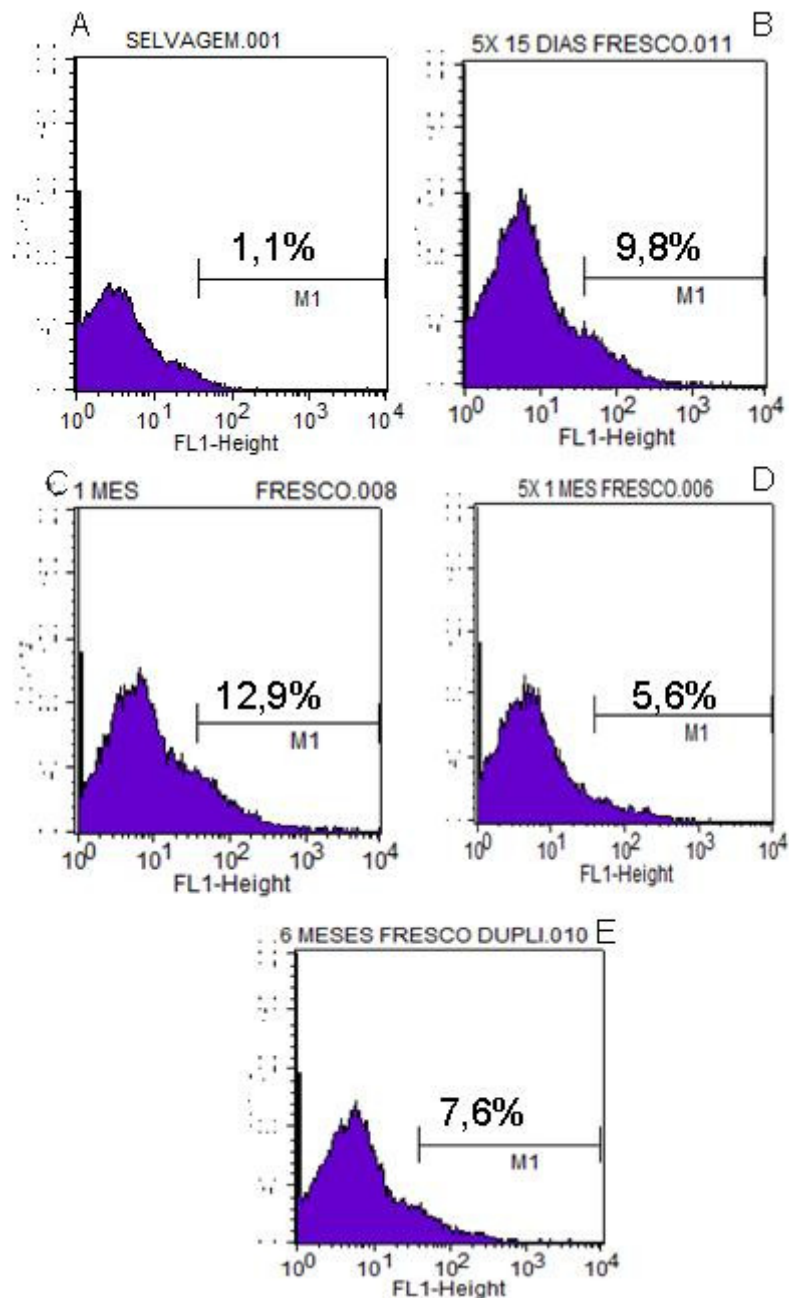


Figura 8: Fluorescência de amastigotas-GFP retirados de lesão. Camundongos Balb/c foram infectados com 5×10^7 ou 2×10^7 promastigotas-GFP. A intensidade de fluorescência dos amastigotas-GFP retirados da lesão foram avaliadas após 15 dias, 1 mês e 6 meses de infecção. A – amastigota tipo selvagem; B- amastigotas-GFP retirados de lesão de camundongos infectados com 5×10^7 parasitas, com 15 dias de infecção; C- amastigotas-GFP retirados de lesão de camundongos infectados com 2×10^7 parasitas, com 1 mês de infecção; D- amastigotas-GFP retirados de lesão de camundongos infectados com 5×10^7 parasitas, com 1

mês de infecção; E- amastigotas-GFP retirados de lesão de camundongos infectados com 2×10^7 parasitas, com 6 meses de infecção.

4.3 Ensaio *in vitro* e *in vivo* de *Leishmania amazonensis*-GFP

Após essas avaliações iniciais comprovou-se que houve uma perda da intensidade de fluorescência tanto de promastigota com o decorrer do cultivo como de amastigota com o decorrer da infecção.

4.3.1 Ensaio *in vitro* de seleção de promastigotas de *L. amazonensis*-GFP

O objetivo dos próximos experimentos foi investigar a eficiência da seleção *in vitro* dos parasitas transfectados.

Para estes ensaios, as culturas de promastigotas-GFP foram testadas com algumas concentrações de geneticina (100µg/ml, 150µg/ml e 1mg/ml), antibiótico utilizado para a seleção da *Leishmania*-GFP que possuem o marcador de resistência. Os resultados da Figura 9 mostram que a fluorescência de promastigotas selecionados com 1mg/ml de geneticina foi maior que a fluorescência de promastigotas selecionados com 100µg/ml ou 150µg/ml de geneticina, por isso adotamos a concentração de 1mg/ml. A Figura 10 mostra a diminuição do número de promastigotas em relação ao tempo de tratamento com o antibiótico. Após 2h, 4h e 19h, cerca de 20%, 34% e 54% de promastigotas estavam mortos, respectivamente.

Empregando a citometria de fluxo (Figura 11) observa-se que 94,2% de promastigotas-GFP selecionados com 1mg/ml de geneticina são fluorescentes, após 5 dias da adição do antibiótico; quanto às culturas de promastigotas que foram mantidas sem seleção ao longo de 2, 3, 4 e 7 meses, estas apresentaram 80,7%, 42,8%, 27,5% e 17,9% de promastigotas fluorescentes, respectivamente. Estes dados mostram que

embora ocorra a perda de promastigotas fluorescentes ao longo dos meses de cultivo é possível estabelecer uma seleção eficaz, alcançando 80-90% de parasitas fluorescentes, selecionando-os periodicamente.

Quando foram avaliados promastigotas recém transformados de amastigotas de lesão e selecionados com 1mg/ml de geneticina (Tabela 1), observa-se que na primeira etapa de seleção, se obtêm 28,7% de promastigotas fluorescentes e na segunda etapa, 93,7% de promastigotas fluorescentes. Portanto, há a necessidade de pelo menos realizar-se 2 etapas de seleção *in vitro*. Entretanto para os promastigotas que permaneceram muito tempo em cultura (8 meses), obteve-se 17,1% de promastigotas fluorescentes sendo que em uma única etapa de seleção, pode-se atingir 78% de promastigotas fluorescentes (Tabela 1).

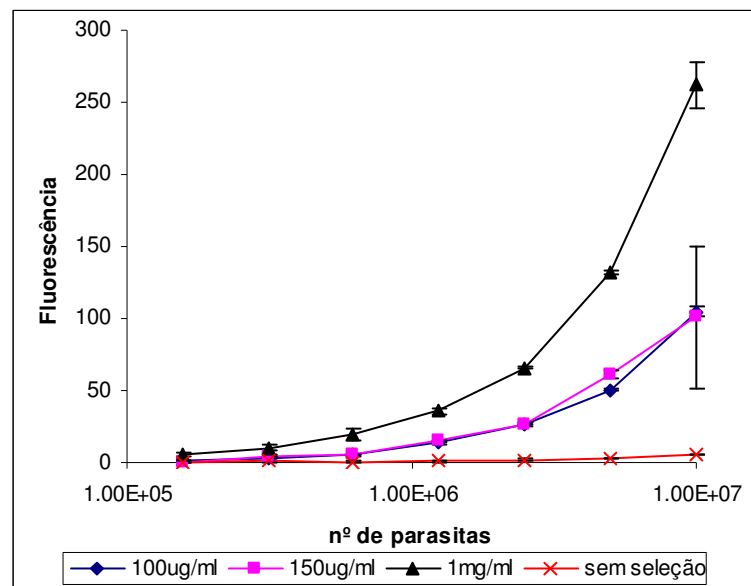


Figura 9: Fluorescência dos promastigotas selecionados e não selecionados: Promastigotas ($3,5 \times 10^7$ promastigotas/ml) foram selecionados com 100µg/ml, 150µg/ml e 1mg/ml de geneticina. A intensidade de fluorescência foi lida no espectrofluorímetro. Estatística: $p < 0.05$.

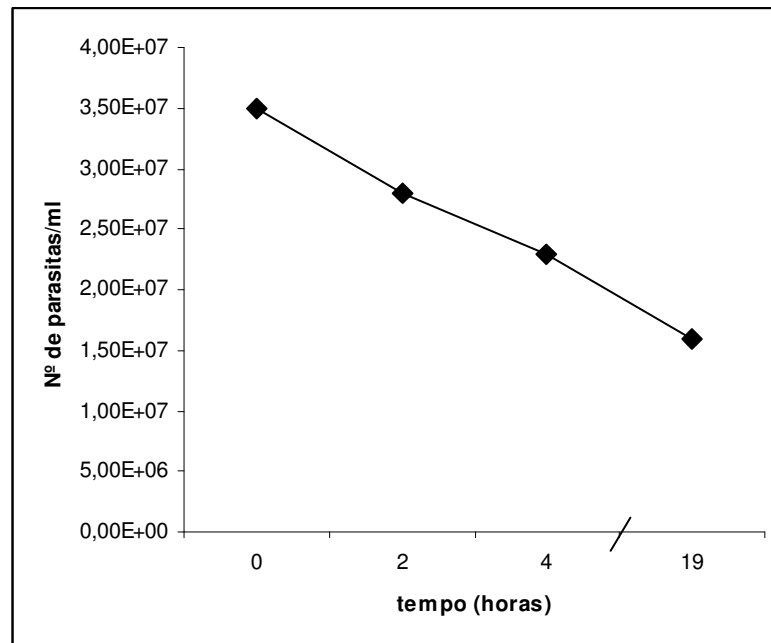


Figura 10: Número de promastigotas-GFP após seleção *in vitro*: Promastigotas-GFP ($3,5 \times 10^7$ /ml) foram cultivados em frascos de cultura com meio Earle 199 com 1mg/ml de geneticina. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer antes da adição de geneticina (tempo 0), após 2h, 4h e 19 horas da adição do antibiótico. Dados representativos de três experimentos.

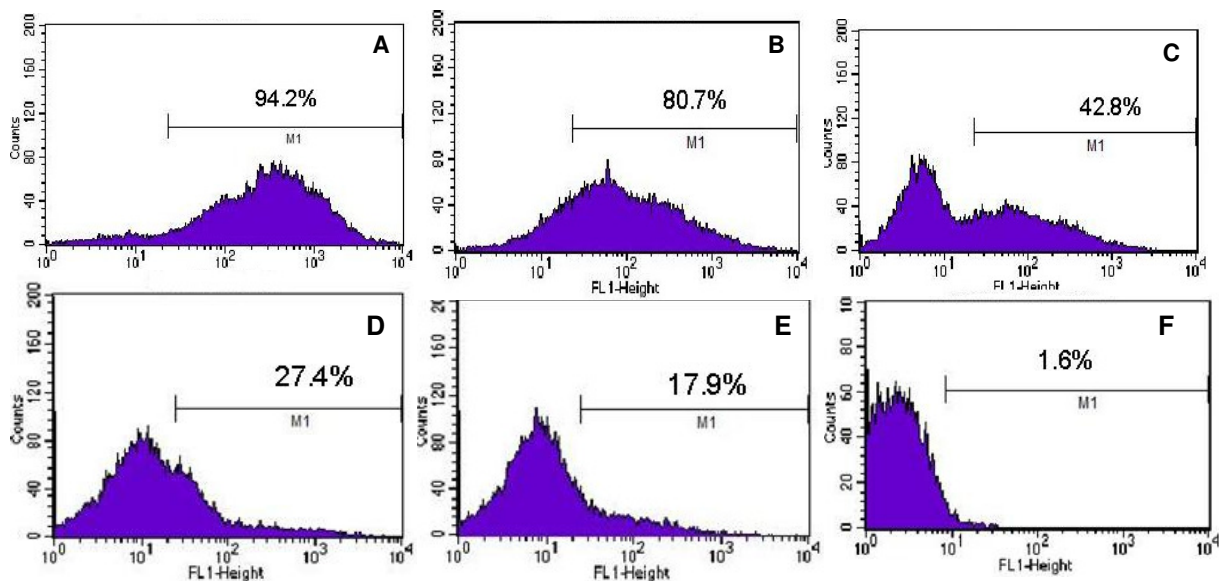


Figura 11: Análise de parasitas fluorescentes pela citometria de fluxo. Os promastigotas-GFP (5×10^5 pro/ml) foram selecionados *in vitro* com 1mg/ml de geneticina. Cerca de 10.000 parasitas foram fixados com formaldeído 1% e analisados no citômetro de fluxo. A: Promastigota-GFP selecionado (5 dias antes da leitura); B: Promastigota-GFP (2 meses sem seleção); C: Promastigota-GFP (3 meses sem seleção); D: Promastigota-GFP (4 meses sem seleção); E: Promastigota-GFP (7 meses sem seleção) e F: Promastigota "tipo selvagem".

Tabela 1: Porcentagem de promastigotas-GFP fluorescentes*.

Promastigotas	Porcentagem de parasitos fluorescentes
Pro “tipo selvagem”	0,43%
Pro 1ª etapa de seleção	28,77%
Pro 2ª etapa de seleção	93,79%
Pro “mãe” (8 meses sem seleção)	17,18%
Pro “mãe” selecionado	78,38%

*Análise de 10.000 promastigotas selecionados (1mg/ml de geneticina) pelo citometro de fluxo

4.3.2 Ensaio *in vitro* de seleção de amastigotas de *L. amazonensis*-GFP

As formas amastigotas de *L. amazonensis*-GFP não são utilizadas nos ensaios de infecção *in vitro*, embora infectem mais efetiva e rapidamente macrófagos, comparado aos promastigotas. Por estas razões buscamos métodos de seleção de amastigotas-GFP.

Os amastigotas-GFP foram selecionados *in vitro* com diferentes doses de geneticina. Os parasitas selecionados com 200µg/ml de geneticina atingiram uma intensidade de fluorescência menor que parasitas selecionados com 500µg/ml e 1mg/ml de geneticina (Figura 12). As porcentagens de amastigotas mortos foram de 34%, 42% e 62% para 200µg/m, 500µg/ml e 1mg/ml de geneticina respectivamente, após 19 horas do tratamento (Figura 13). A visualização dos parasitas no microscópio acoplado a fluorescência evidencia a semelhança nos resultados (Figura 14).

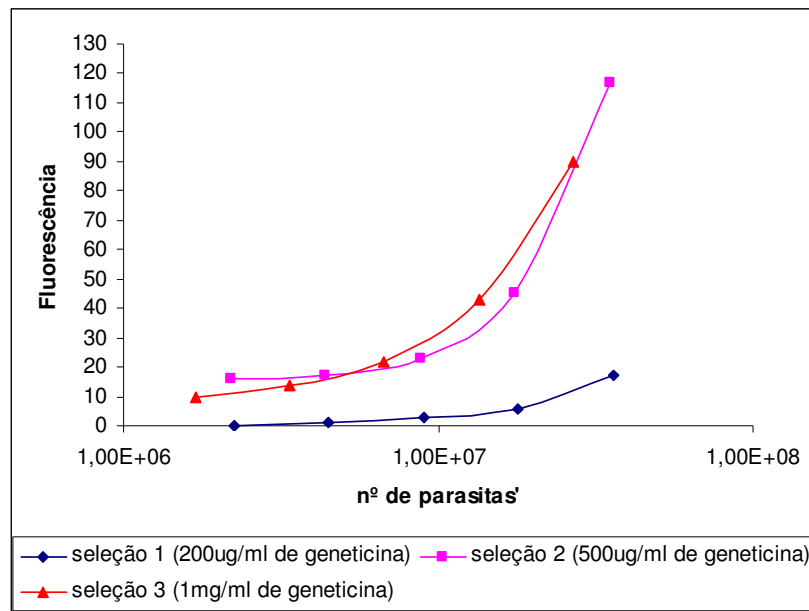


Figura 12: Fluorescência dos amastigotas-GFP selecionados *in vitro*. Amastigotas-GFP foram retirados da lesão de camundongos Balb/c infectados e foram contados e tratados em meio de cultura 199 com diferentes concentrações de geneticina (200µg/ml, 500µg/ml e 1mg/ml) a 26°C. Após 19 horas da adição de geneticina às culturas de amastigotas, os parasitas foram contados e a intensidade de fluorescência lida no espectrofluorímetro. Estatística: $p < 0.05$

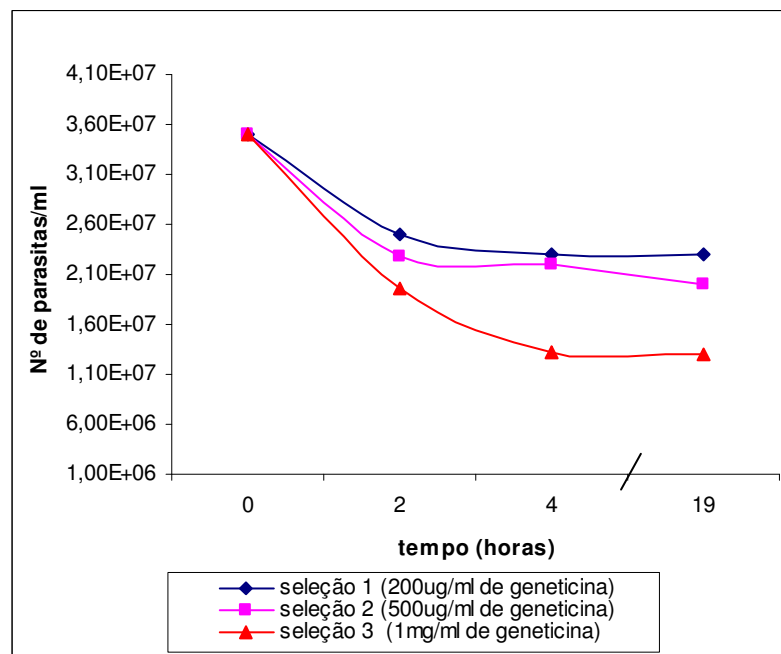


Figura 13: Número de amastigotas-GFP após seleção *in vitro*. Amastigotas-GFP ($3,5 \times 10^7$ parasitas/ml) em meio 199 cultivados com diferentes concentrações de geneticina (200µg/ml, 500µg/ml e 1mg/ml), foram contados nos tempos 0h, 2h, 4h e 19h após a adição do antibiótico. Estatística: Seleção 1 e 3 $p < 0.05$

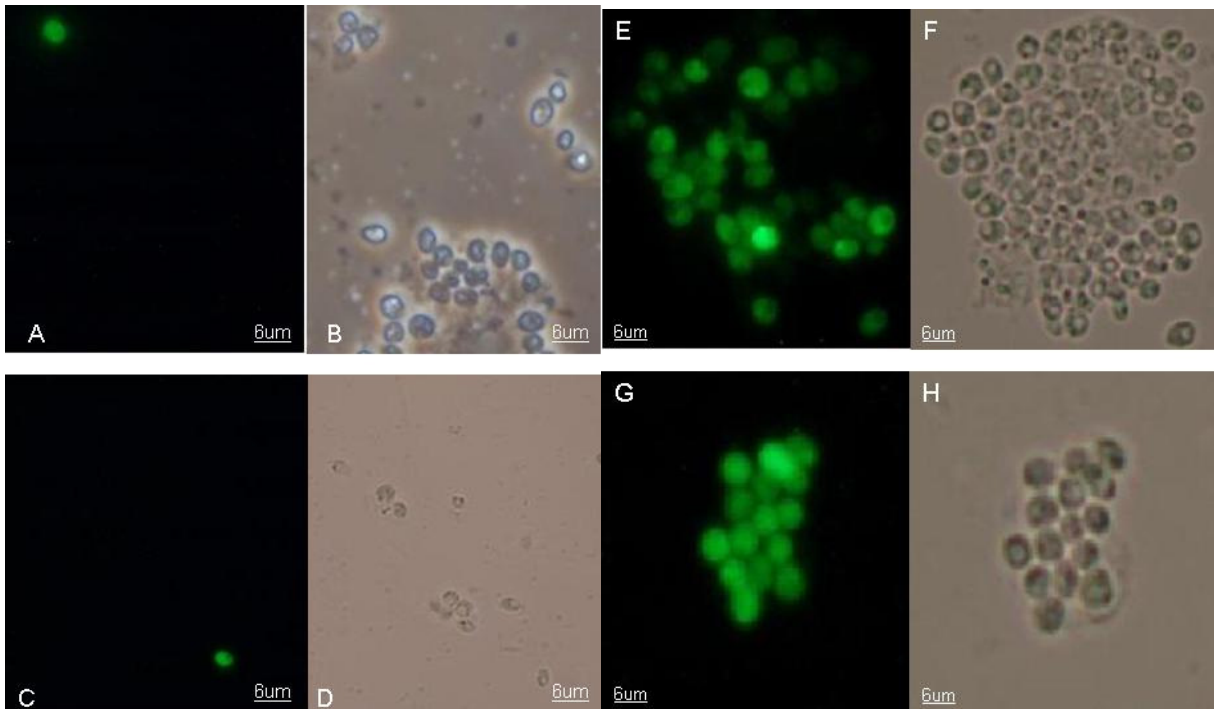


Figura 14: Visualização de amastigotas-GFP selecionados *in vitro*. A e B (amastigotas antes da seleção); C e D (após seleção 200µg/ml de geneticina); E e F (após seleção 500µg/ml de geneticina); G e H (após seleção 1mg/ml de geneticina). A, C, E e G (Fluorescência) e B, D, F e H (contraste de fase).

Após a comparação entre os resultados, observamos que a concentração de 1mg/ml de geneticina para a seleção *in vitro* é a ideal, uma vez que houve aumento da intensidade de fluorescência (Figuras 12 e 14), e a porcentagem de parasitas mortos tratados nesta concentração foi maior (Figura 13). Estabelecida esta concentração para os próximos ensaios de seleção *in vitro*, utilizamos a citometria de fluxo, para estimativa da porcentagem de parasitas selecionados. A Figura 15 mostra os dados de citometria de fluxo e uma comparação entre a porcentagem de amastigotas fluorescentes de *L. amazonensis* não transfectados (“selvagem”) (1,3%), *L. amazonensis*-GFP não selecionada (7,4%) e *L. amazonensis*-GFP selecionada com 1mg/ml de geneticina, após 19h (20%).

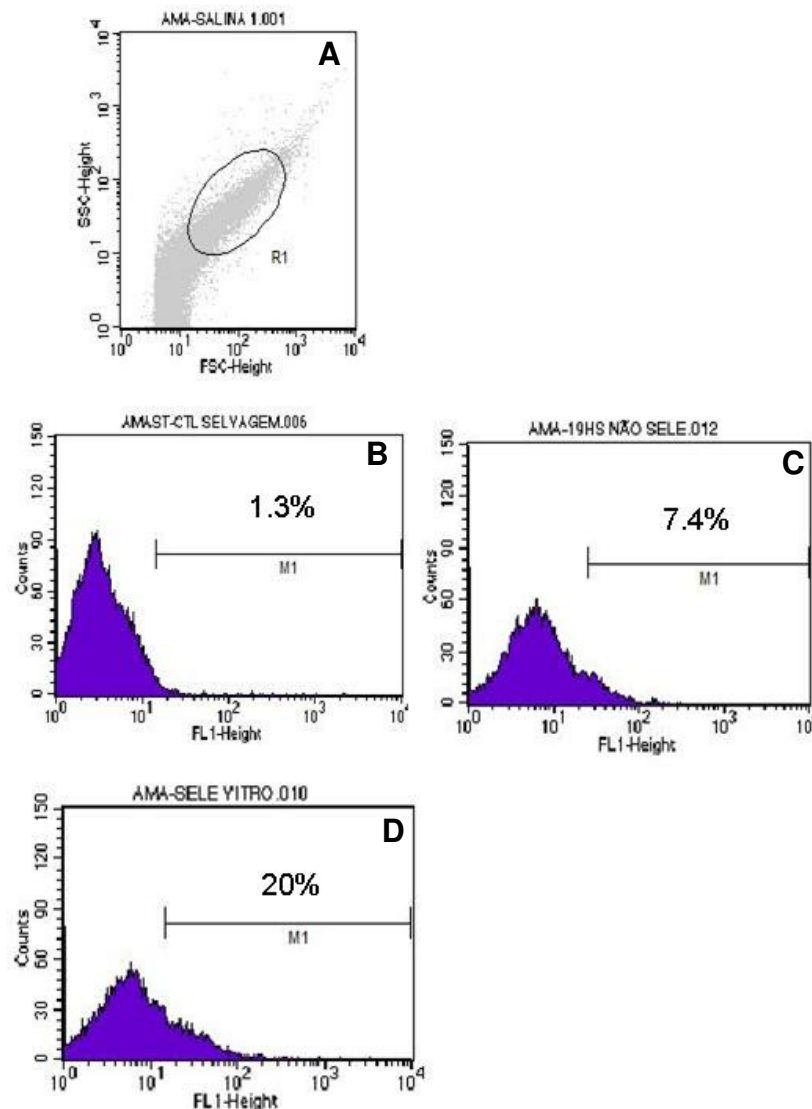


Figura 15: Análise de amastigotas fluorescentes pela citometria de fluxo. Os amastigotas-GFP (1×10^7 amastigotas/ml) foram selecionados *in vitro* com 1mg/ml de geneticina. Após 19h cerca de 10.000 parasitas foram analisados no citômetro de fluxo. A- “gated”= população total de amastigotas avaliados; B- amastigota “selvagem”; C- amastigota-GFP não selecionado e D- amastigota-GFP selecionado.

4.4. Ensaio *in vivo* de seleção de *L. amazonensis*-GFP

O objetivo dos próximos experimentos foi testar a possibilidade da seleção *in vivo* das formas amastigotas de *L. amazonensis*-GFP. Os seguintes protocolos foram testados:

Ensaio *in vivo* 1: camundongos com 150 dias de infecção, receberam 3 doses consecutivas de geneticina intralesão (40mg/kg). Após 43 dias da aplicação da geneticina, os camundongos foram eutanasiados e os amastigotas de lesão avaliados pelo espectrofluorímetro. Neste protocolo, observa-se durante o período de 164 até 193 dias de infecção que camundongos infectados tratados com geneticina mostram uma redução do tamanho da lesão cerca de 29% comparado ao controle (Figura 16 A). Porém, a carga parasitária não mostrou redução significativa (Figura 16 B). Observou-se um aumento da intensidade de fluorescência dos amastigotas, porém não significativo (Figura 16 C). Foi possível concluir que este protocolo de seleção *in vivo* de amastigotas não é satisfatório. O fato dos camundongos estarem com 150 dias de infecção pode ter dificultado a seleção dos amastigotas fluorescentes uma vez que estes tendem a perder a fluorescência com o longo tempo de infecção. Sendo assim, foram testados tempos mais curtos de infecção.

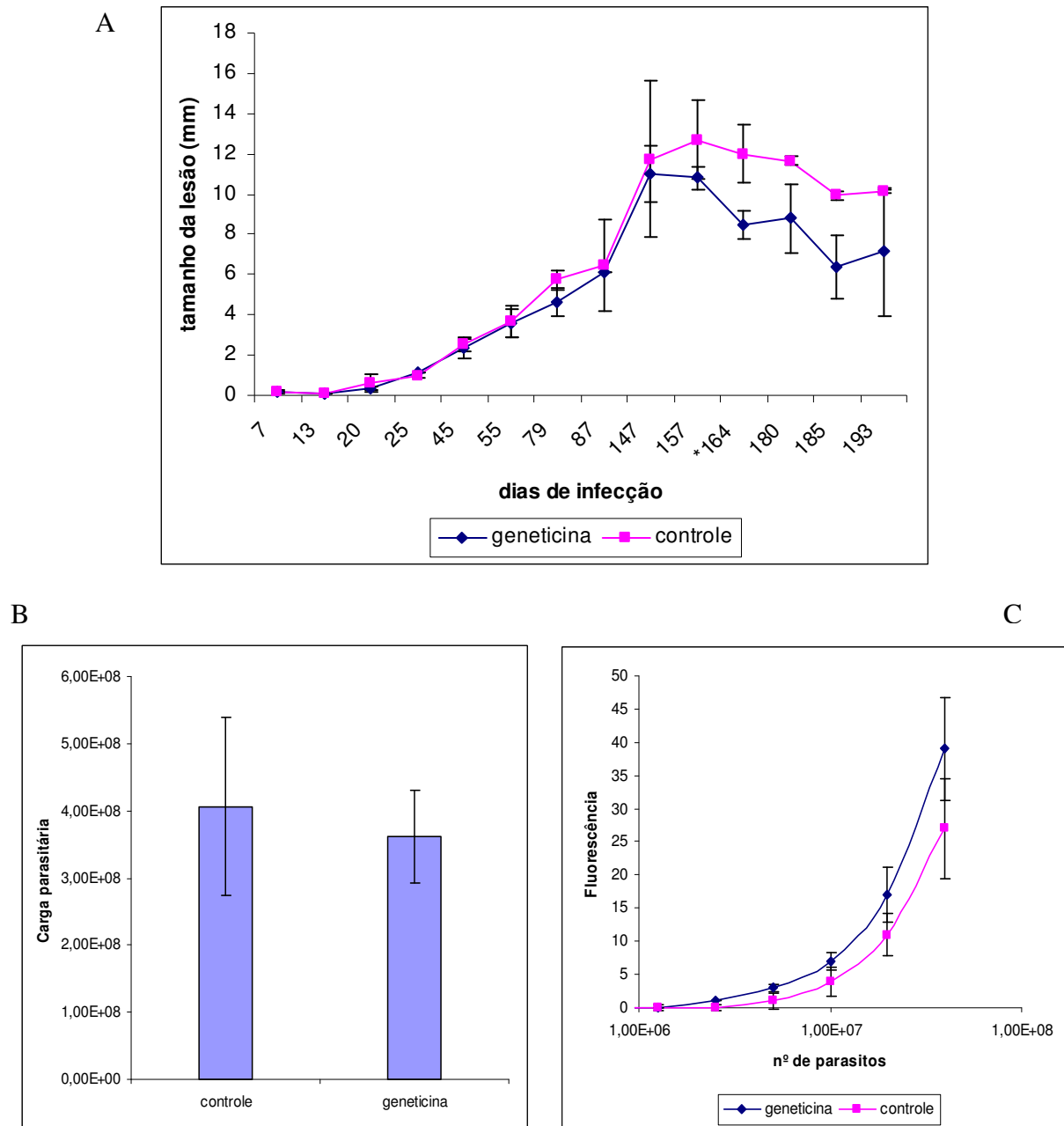


Figura 16: Ensaio *in vivo* 1. Camundongos Balb/c foram infectados no coxim plantar de uma das patas traseiras com 2×10^7 promastigotas-GFP. Após 150 dias de infecção os camundongos receberam 3 doses consecutivas de 40mg/kg de geneticina intralesão. O tamanho da lesão foi medido semanalmente (estatística: entre 164 e 193 dias de infecção, $p < 0.05$) (A). Carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis*-GFP (B). Fluorescência dos amastigotas selecionados *in vivo* com geneticina e retirados da lesão (C). (n=4 camundongos).

Ensaio *in vivo* 2: camundongos com 90 dias de infecção, receberam 3 doses consecutivas de geneticina intralesão (40mg/kg). Após 37 dias da aplicação da

geneticina os camundongos foram eutanasiados e os amastigotas da lesão, avaliados pelo espectrofluorímetro. Neste ensaio ocorreu uma redução do tamanho da lesão (cerca de 35% comparado ao controle, 127º dia) de camundongos infectados tratados com geneticina (Figura 17 A), indicando que ocorreu morte dos amastigotas não fluorescentes, evidenciado, pela redução da carga parasitária de animais tratados com geneticina, (cerca de 31% comparado ao controle) (Figura 17 B) e pelo aumento da intensidade de fluorescência (Figura 17 C). Esses resultados comprovam a possibilidade da seleção *in vivo* dos amastigotas transfectados.

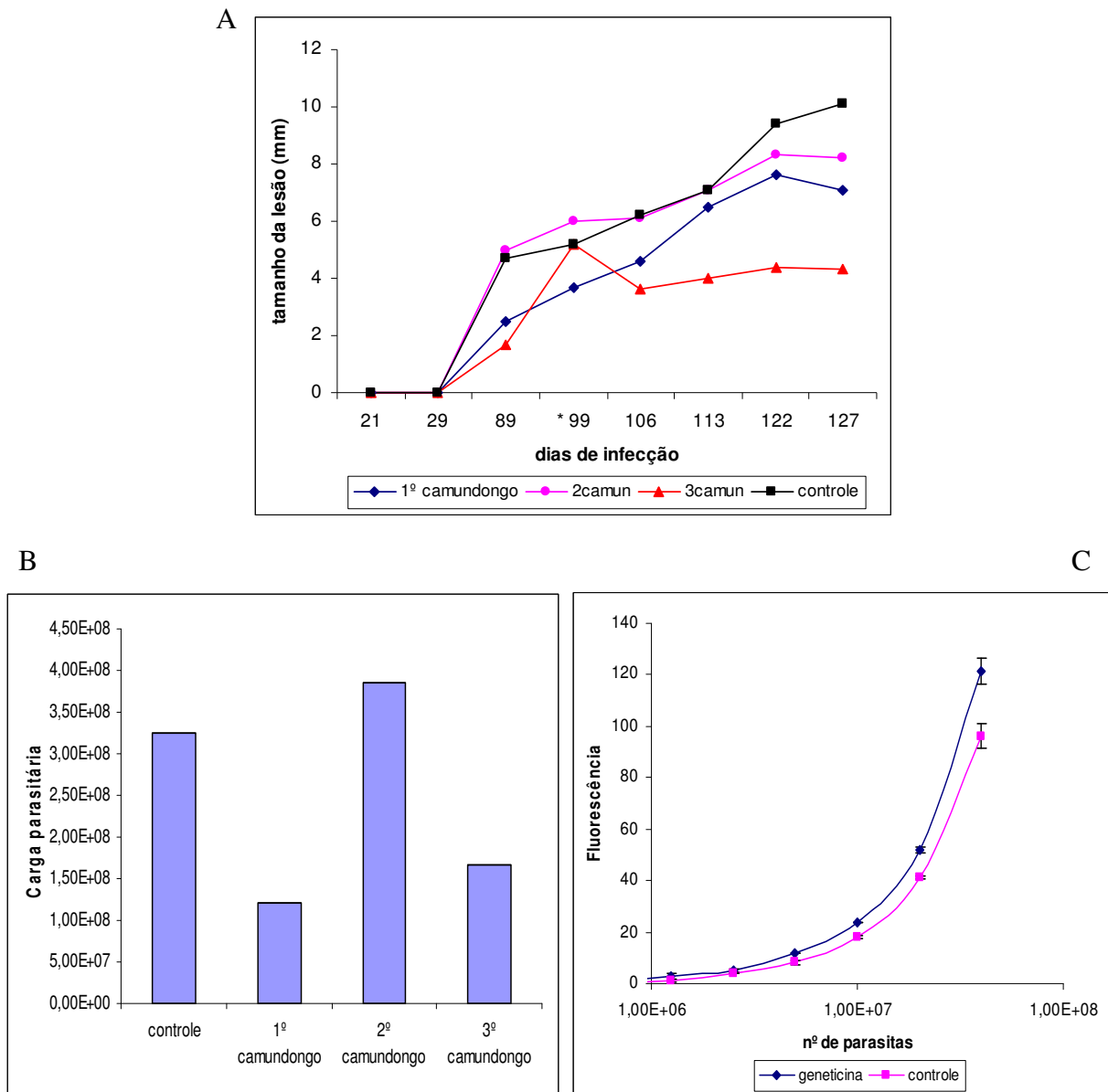


Figura 17: Ensaio *in vivo* 2: Camundongos Balb/c foram infectados no coxim plantar de uma das patas traseiras com 2×10^7 promastigotas-GFP. Após 90 dias de infecção os camundongos receberam 3 doses consecutivas de 40mg/kg de geneticina intralesão. O tamanho da lesão foi medido semanalmente (A). Carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis*-GFP (B). Fluorescência dos amastigotas selecionados *in vivo* com geneticina (C). (n=3 camundongos)

Ensaio *in vivo* 3: camundongos com 90 dias de infecção receberam 3 doses consecutivas de geneticina intralesão (40mg/kg). Após 37 dias da aplicação da

geneticina os camundongos foram eutanasiados e os amastigotas de lesão avaliados pelo citômetro fluxo.

Ensaio *in vivo* 4: camundongos receberam 6 doses de geneticina intralesão (40mg/kg); as 3 primeiras doses (consecutivas) foram aplicadas com 90 dias de infecção e as outras 3 (consecutivas) aplicadas com 105 dias de infecção. Após 127 dias de infecção os amastigotas de lesão foram avaliados pelo citômetro de fluxo.

Os dados do tamanho da lesão no ensaio 3 coincidiram com os dados da carga parasitária, pois os camundongos que receberam 3 doses de geneticina, mostraram um aumento no tamanho da lesão (cerca de 10% comparado ao controle) e um aumento da carga parasitária (cerca de 33%) quando comparado aos controles tratados com salina (Figura 18 A e B). Interessante é que apesar de não ter uma redução do tamanho da lesão e da carga parasitaria a análise de porcentagem de parasitos fluorescentes pela citometria de fluxo mostra que ocorreu a seleção dos parasitas (Figuras 18 C). No ensaio com camundongos que receberam 6 doses de geneticina, não observou-se diferenças no tamanho da lesão, nem da carga parasitária; mas a análise da porcentagem de parasitos fluorescentes pela citometria de fluxo, evidencia a seleção dos parasitas (Figuras 18 A, B e C).

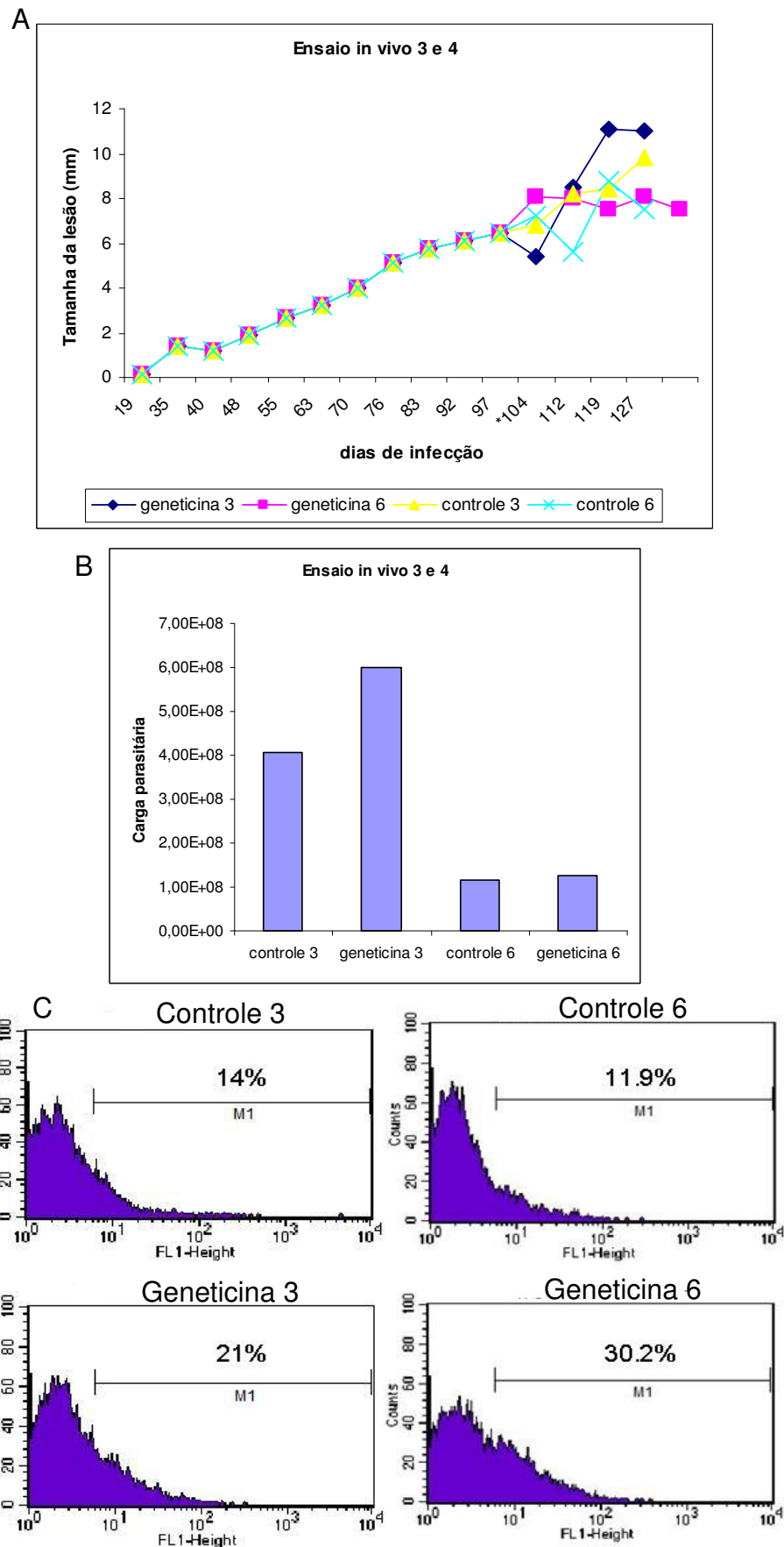


Figura 18: Ensaios *in vivo* 3 e 4: Camundongos Balb/c foram infectados no coxim plantar de

uma das patas traseiras com 2×10^7 promastigotas-GFP. Após 90 dias de infecção os camundongos receberam 3 doses de geneticina (ensaio *in vivo* 3) e 6 doses de geneticina (ensaio *in vivo* 4) de (40mg/kg) intralesão. O tamanho da lesão foi medido semanalmente (A). Carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis*-GFP (B). Análise de parasitas fluorescentes pela citometria de fluxo. Amastigotas de lesão de camundongos: Controle 3 doses e Geneticina 3 (ensaio 3); Controle 6 e Geneticina 6 (ensaio 4) (C). (n=2 camundongos/ensaio)

Ensaio *in vivo* 5: camundongos infectados receberam 5 doses de geneticina intralesão (40mg/kg), a 1ª dose foi aplicada com 30 dias de infecção e as demais doses aplicadas semanalmente até completar 2 meses de infecção. Após 59 dias de infecção os camundongos foram eutanasiados e os amastigotas de lesão avaliados pelo citômetro de fluxo.

Ensaio *in vivo* 6: camundongos infectados receberam 9 doses de geneticina intralesão (40mg/kg), as 3 primeiras doses (consecutivas) foram aplicadas com 30 dias de infecção; após intervalo de 12 dias foram aplicadas 3 doses e após intervalo de 12 dias as últimas 3 doses. Após 59 dias de infecção os camundongos foram eutanasiados e os amastigotas de lesão avaliados pelo citômetro de fluxo.

Nestes ensaios, observou-se um aumento do tamanho da lesão de camundongos tratados com geneticina comparado aos tratados com salina (Figura 19 A). Este aumento do tamanho da lesão pode ter ocorrido devido às repetidas aplicações do antibiótico intra-lesão, pois mesmo em baixas concentrações, pode tornar-se tóxico resultando em morte celular e aglomerado de restos celulares na lesão (Figura 19 A). Já a carga parasitária das lesões dos camundongos tratados com geneticina (5 e 9 doses) não mostrou diferença quando comparado a carga parasitária das lesões dos camundongos tratados com salina (Figura 19 B). No entanto, a análise da porcentagem de parasitas fluorescentes pela citometria de fluxo confirmou a seleção dos amastigotas

fluorescentes, 41,4% e 39,7% de amastigotas fluorescentes de lesão de camundongos tratados com 5 e 9 doses de geneticina, respectivamente (Figura 19 C).

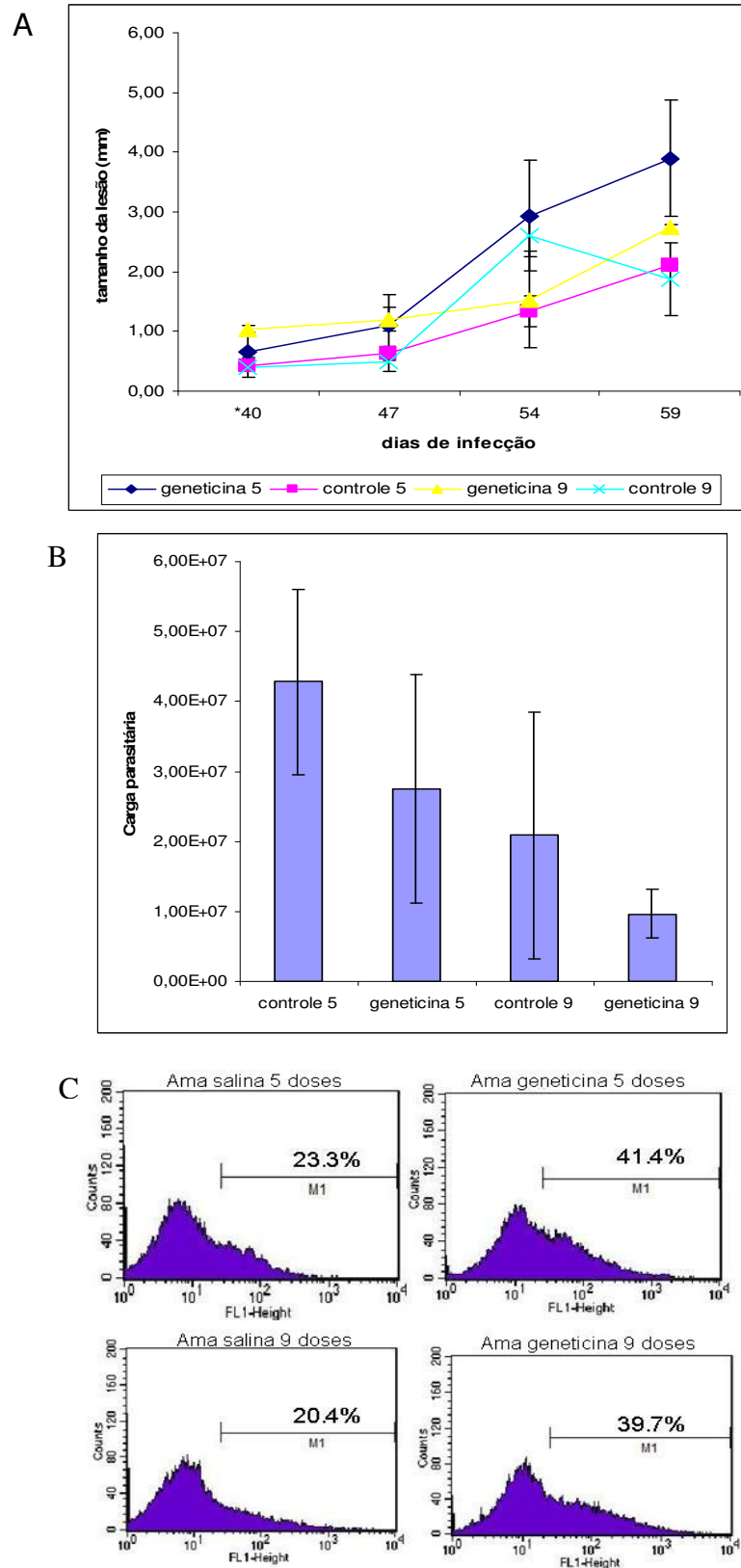


Figura 19: Ensaios *in vivo* 5 e 6. Camundongos Balb/c foram infectados no coxim plantar de uma das patas traseiras com 2×10^7 promastigotas-GFP. Após 30 dias de infecção os camundongos receberam 5 doses de geneticina (ensaio *in vivo* 5) ou 9 doses de geneticina

(ensaio *in vivo* 6) de 40mg/kg intralesão. O tamanho da lesão foi medido semanalmente (A). Carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis*-GFP (B). Análise de parasitas fluorescentes, pela citometria de fluxo (C). (n=6 camundongos/ensaio). Estatística: $p<0.05$

Ensaio *in vivo* 7: camundongos infectados receberam 7 doses de geneticina intralesão (40mg/kg), as duas primeiras doses foram aplicadas com 15 dias de infecção e as demais doses aplicadas quinzenalmente até completar 2 meses de infecção. Após 69 dias de infecção os camundongos foram eutanasiados e os amastigotas de lesão avaliados pelo citômetro de fluxo.

Neste ensaio não observou-se diferença significativa no tamanho das lesões de camundongos tratados com geneticina e de camundongos tratados com salina (Figura 20 A), mas a carga parasitária de camundongos tratados com geneticina foi menor (cerca de 80%) que a carga parasitária de camundongos tratados com salina, evidenciando a morte dos amastigotas não fluorescentes (Figura 20 B). A análise da de amastigotas fluorescentes pela citometria de fluxo confirmou a seleção, 34,5% de amastigotas fluorescentes retirados das lesões (Figura 20 C).

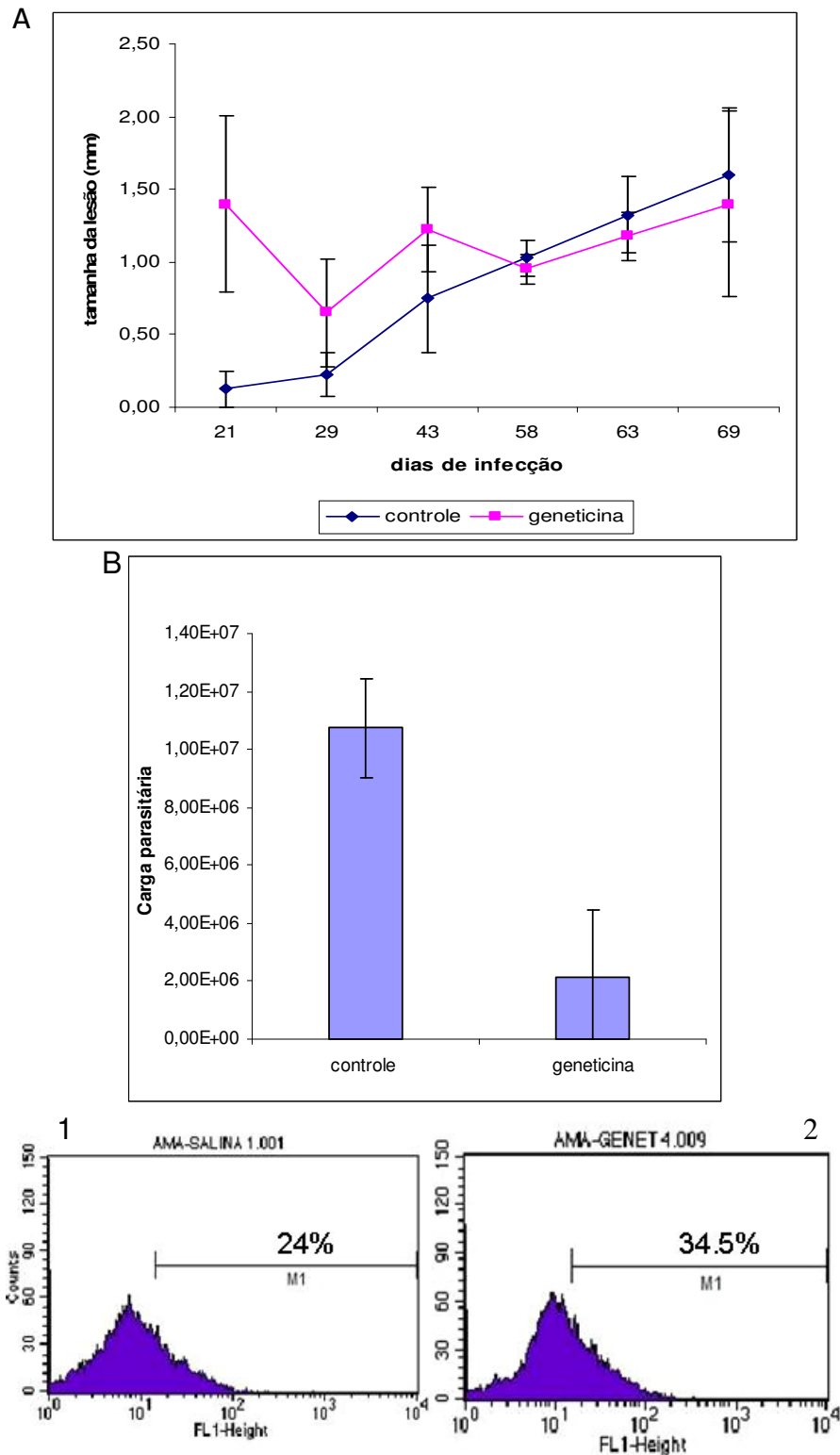


Figura 20: Ensaio *in vivo* 7. Camundongos Balb/c foram infectados no coxim plantar de uma das patas traseiras com 2×10^7 promastigotas-GFP. Após 15 dias de infecção os camundongos receberam 7 doses de geneticina (40mg/kg) intralésão. O tamanho da lesão foi medido semanalmente (A). Carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis*-GFP

(B). Análise de parasitos fluorescentes pela citometria de fluxo. (1- controle; 2- geneticina). (n=8 camundongos). Estatística: $p < 0.05$

4.5 Ensaios *in vitro* para avaliar a eficiência de *L. amazonensis*-GFP

4.5.1 Ensaio de toxicidade de promastigotas com miltefosina

O próximo passo foi testar a eficiência de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*-GFP no “screening” de fármacos anti-*Leishmania*. Para isso usou-se um fármaco já empregado na clínica e comprovadamente leishmanicida, a miltefosina. A comparação entre a intensidade de fluorescência de promastigotas-GFP tratados com diferentes concentrações de miltefosina mostrou o efeito dose dependente do fármaco (Figuras 21). Também houve uma diminuição no número de promastigotas, isto é, um efeito dose dependente de miltefosina, nesse ensaio (Figura 22). Estes resultados confirmam que a *L. amazonensis*-GFP pode ser utilizada para o “screening” de fármacos.

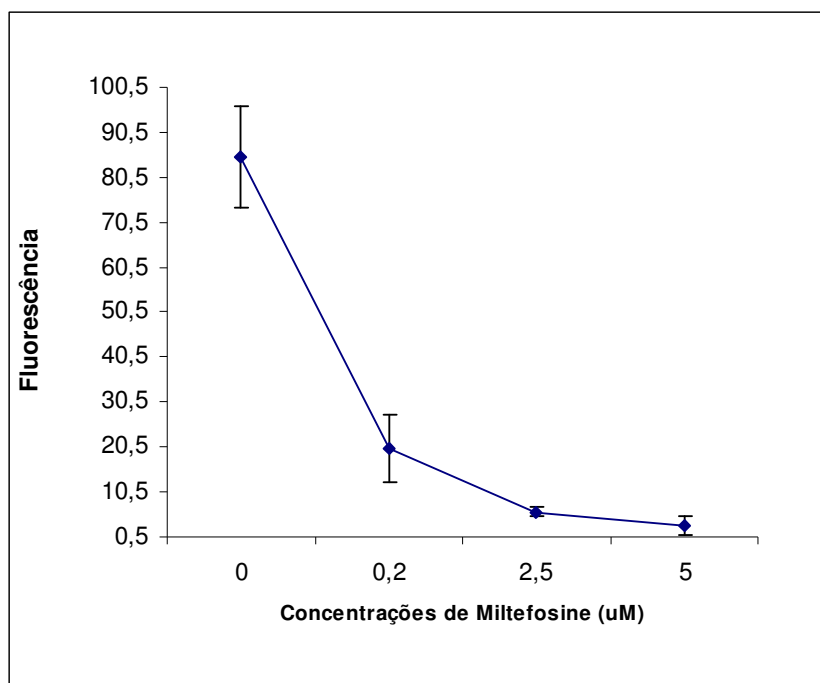


Figura 21: Intensidade de fluorescência dos promastigotas-GFP tratados com diferentes concentrações de miltefosina. Promastigotas foram plaqueados em microplacas negras

($0,5 \times 10^7$ parasitas/poço) com diferentes concentrações de miltefosina. Após 48 horas em estufa a 26°C foi feita a leitura no espectrofluorímetro.

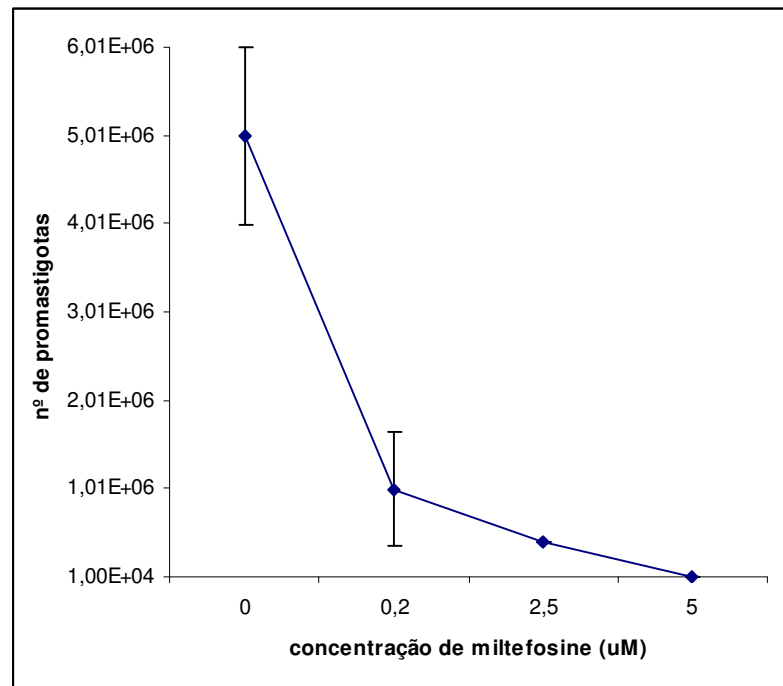


Figura 22: Contagem dos promastigotas-GFP tratados com diferentes concentrações de miltefosina. Promastigotas foram plaqueados em microplacas negras ($0,5 \times 10^7$ parasitas/poço) com diferentes concentrações de miltefosina. Após 48 horas em estufa a 26°C foi realizada a contagem dos parasitas.

4.5.2 Ensaios de infecção de macrófagos J774

Outro ensaio usado para avaliar a eficácia da *L. amazonensis*-GFP em ensaios *in vitro* foi o teste de infecção. Os dados da Figura 23 A, mostram que em culturas de macrófagos infectados com promastigotas (20:1 promastigotas/célula), obteve-se 48% de células infectadas e aproximadamente 3 amastigotas/célula. Quando avaliada a intensidade de fluorescência, observou-se alta intensidade de fluorescência de macrófagos infectados comparada a de macrófagos controle não infectados (Figura 23 B). A presença característica de vacúolos parasitóforos com amastigotas e a fluorescência dos amastigotas, são mostradas na Figura 23 C.

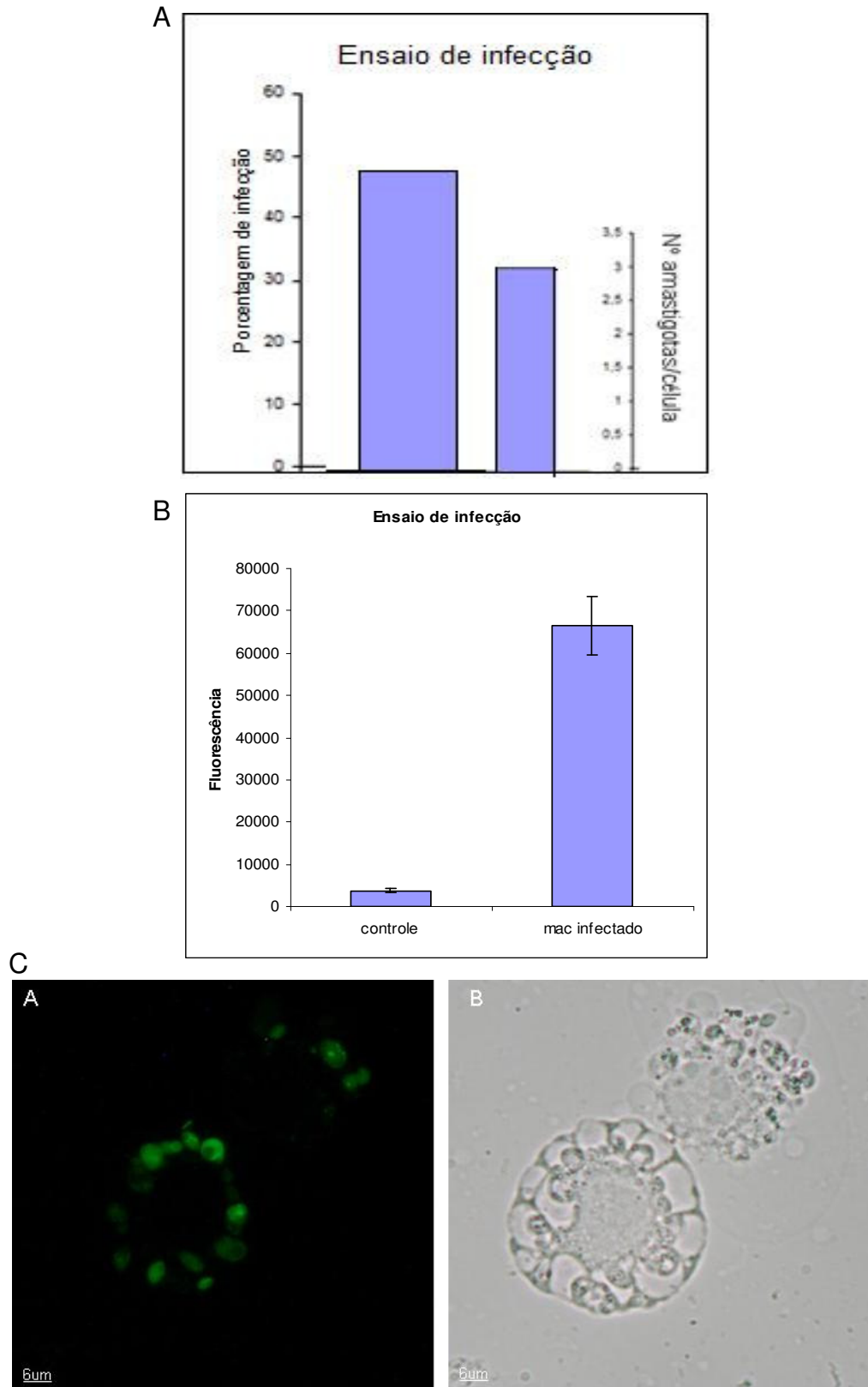


Figura 23: Ensaio de infecção com macrófagos J774. Macrófagos J774 (3×10^6 células/poço) foram infectados com promastigotas-GFP (20:1). A interação foi permitida durante 24h a 34°C.

Após este período as células foram lavadas para remoção dos parasitas livres e a cultura foi mantida por mais 24h a 34°C. Os resultados foram expressos em porcentagem de células infectadas e no número de amastigotas por célula (A). Fluorescência de macrófagos J774 infectados com promastigotas-GFP (B). Visualização dos amastigotas-GFP em cultura de macrófagos J774 infectados (C). Estatística: $p < 0.01$

Nas Figuras 24 A e B pode-se observar que, de fato, quando se avalia tanto a porcentagem de macrófagos infectados, amastigotas intracelulares (81% de macrófagos infectados e 4 amastigotas/célula) e a porcentagem de macrófagos fluorescentes (95%), conclui-se que promastigotas-GFP são infectivos e quando transformados em amastigotas conservam a fluorescência.

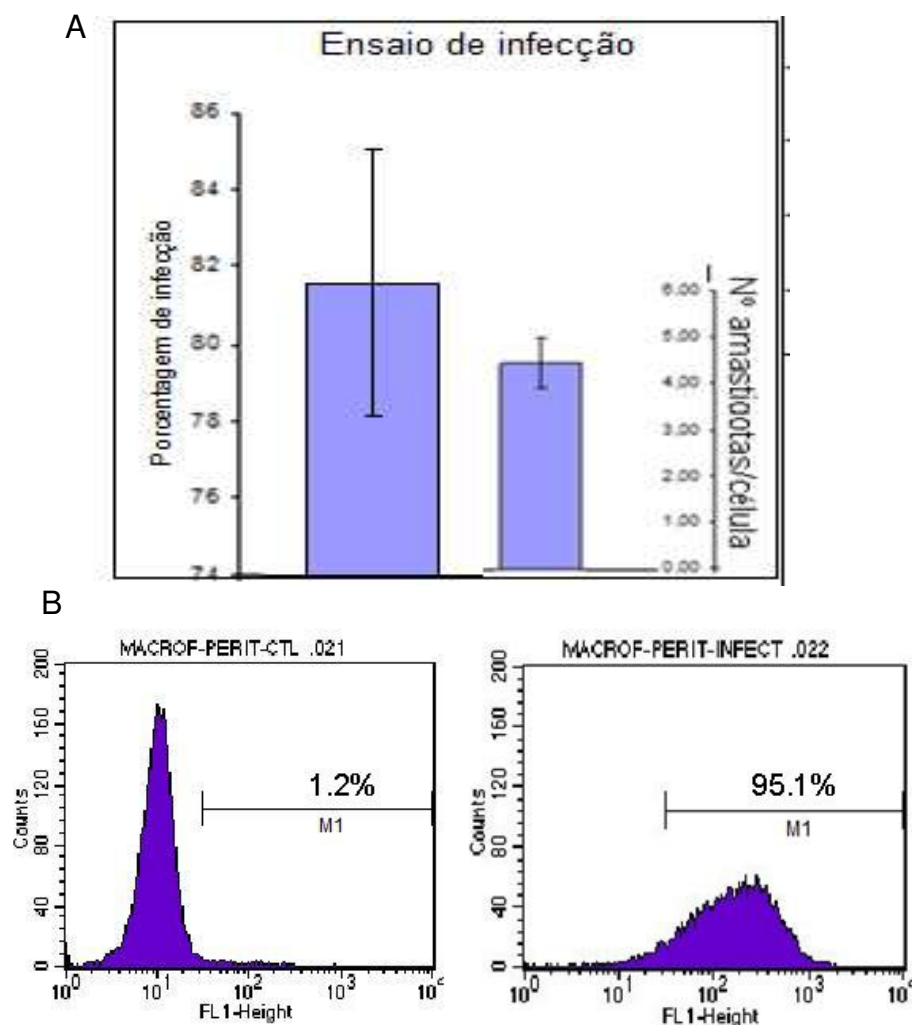


Figura 24: Ensaio de infecção com macrófago peritoneal. Macrófagos peritoneal murino (2×10^6 células/poço) foram infectados com promastigotas-GFP (10:1). Os resultados foram

expressos em porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por célula (A). Análise de macrófagos “fluorescentes” infectados com *L. amazonensis-GFP* (B).

4.5.3 Ensaios de infecção de macrófagos J774 com *L. amazonensis-GFP* e tratamento com glucantime.

O objetivo desse experimento foi testar a capacidade de infecção de *L. amazonensis-GFP* em cultura de macrófagos tratadas e não tratadas com glucantime (fármaco utilizado na clínica) e relacionar o número de células infectadas com a intensidade de fluorescência dos amastigotas presentes.

Os macrófagos foram infectados com promastigotas-GFP, mantidos a 34°C por 48h e tratados com glucantime (Figura 25). A porcentagem de células infectadas foi de 49% para macrófagos infectados não tratados e 49%, 31%, 28% e 26% para macrófagos infectados tratados com 50µg/ml, 500µg/ml, 2mg/ml e 4mg/ml de glucantime, respectivamente (figura 25 A). O número de amastigotas por macrófagos foi de 4,5, amastigotas/célula para culturas não tratadas, 4,2 amastigotas/célula para culturas tratadas com 50µg/ml de glucantime e 3,5 amastigotas/célula para culturas tratadas com 500µg/ml, 2mg/ml e 4mg/ml de glucantime (Figura 25 B). A intensidade de fluorescência observada na Figura 26 mostra o efeito dose dependente de glucantime em macrófagos infectados.

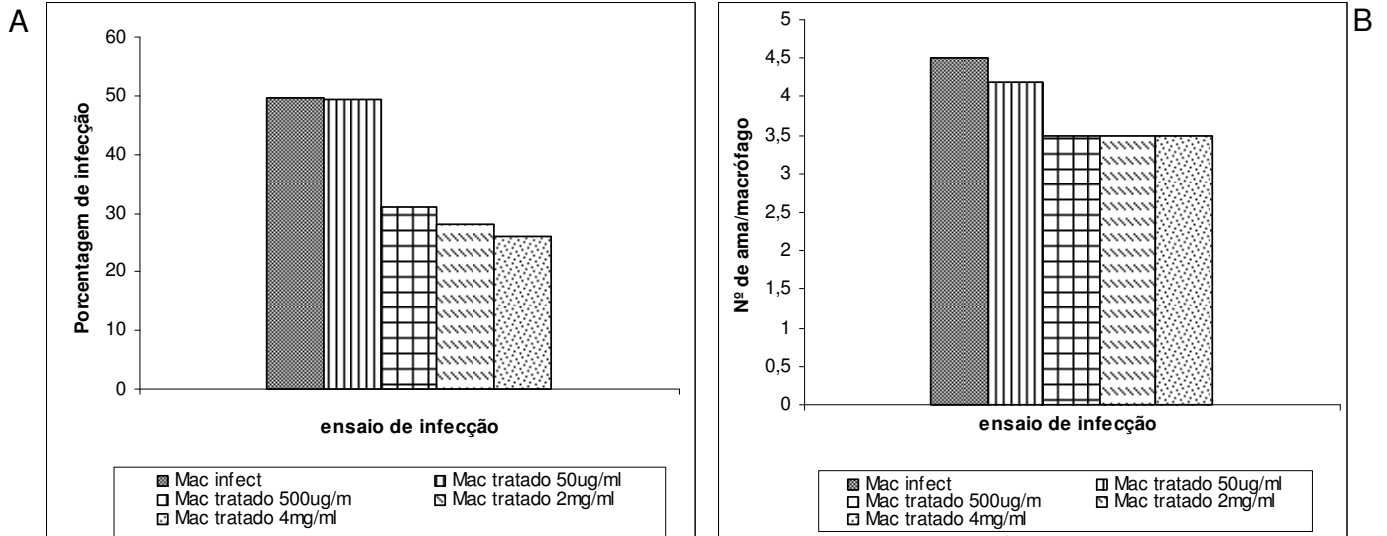


Figura 25: Avaliação da infecção de macrófagos tratados com glucantime. Macrófagos J774 (3×10^6 células) foram infectados com promastigotas *L. amazonensis*-GFP (20:1) e tratados com 50µg/ml, 500µg/ml, 2mg/ml e 4mg/ml de glucantime e mantidos por 24h na estufa a 34°C. Paralelamente ao ensaio de fluorescência (Figura 26) ocorreu a coloração das células com Giemsa. Os resultados foram expressos em porcentagem de células infectadas (A) e número de amastigotas por células (B).

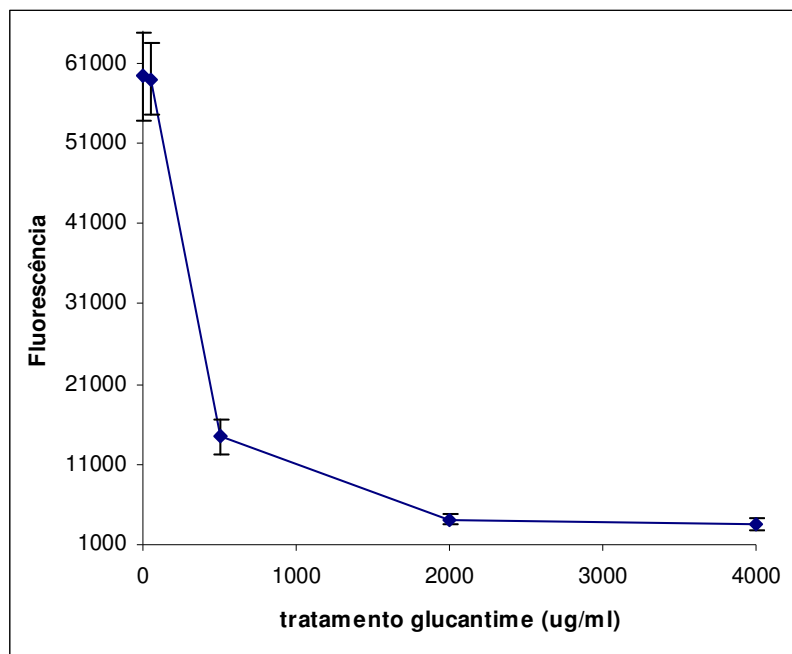


Figura 26: Fluorescência de macrófagos infectados com promastigotas-GFP e tratados com glucantime. Macrófagos J774 foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (20:1) e tratados com diferentes concentrações de glucantime (50µg/ml, 500µg/ml, 2mg/ml e 4mg/ml). As células foram mantidas por 24h na estufa a 34°C e foram transferidas para microplacas negras. A intensidade de fluorescência avaliada no espectrofluorímetro (485nm de excitação e 528nm de emissão). Os dados representam média de triplicata com desvio padrão.

Os resultados até aqui obtidos (Figuras 21–26) confirmam que a *L. amazonensis*-GFP pode facilitar os métodos de avaliação para o “screening” de fármacos em testes *in vitro* de infecção.

4.5.4 Ensaios de adesão de promastigotas-GFP em macrófagos peritoneais

O objetivo destes experimentos foi testar a capacidade dos promastigotas-GFP aderirem aos macrófagos peritoneais expostos em diferentes ambientes de cultura, normóxico (21% O₂) e hipóxico (6% e 1% O₂).

Observou-se que a porcentagem de macrófagos com parasitas aderidos em sua superfície em condição normóxia e hipóxia (6% O₂) não diferem, exceto para a condição hipóxia 1% O₂. Observamos 82% de macrófagos com promastigotas aderidos em condição normóxia e uma queda em células com parasitas aderidos de cerca de 20%, para condição de hipóxia 1% O₂ (Figura 27 A). O número de parasitas aderidos por célula foi de 6, 5, e 4,4 para as condições normóxia, hipóxia 6% O₂ e hipóxia 1% O₂ respectivamente (Figura 27 B). A intensidade de fluorescência de macrófagos aderidos com promastigotas nas condições normóxia e hipóxia 6% O₂ não foram diferentes, mas na condição de hipóxia 1% O₂ menos parasitas fluorescentes aderiram aos macrófagos (Figura 28). A Figura 29 mostra promastigotas fluorescentes aderidos a superfície dos macrófagos sem parasitas no interior das células.

De forma geral concluiu-se que desde que os promastigotas transfectados mantenham uma alta intensidade de fluorescência, é possível utilizá-los para substituir os métodos de fixação e coloração.

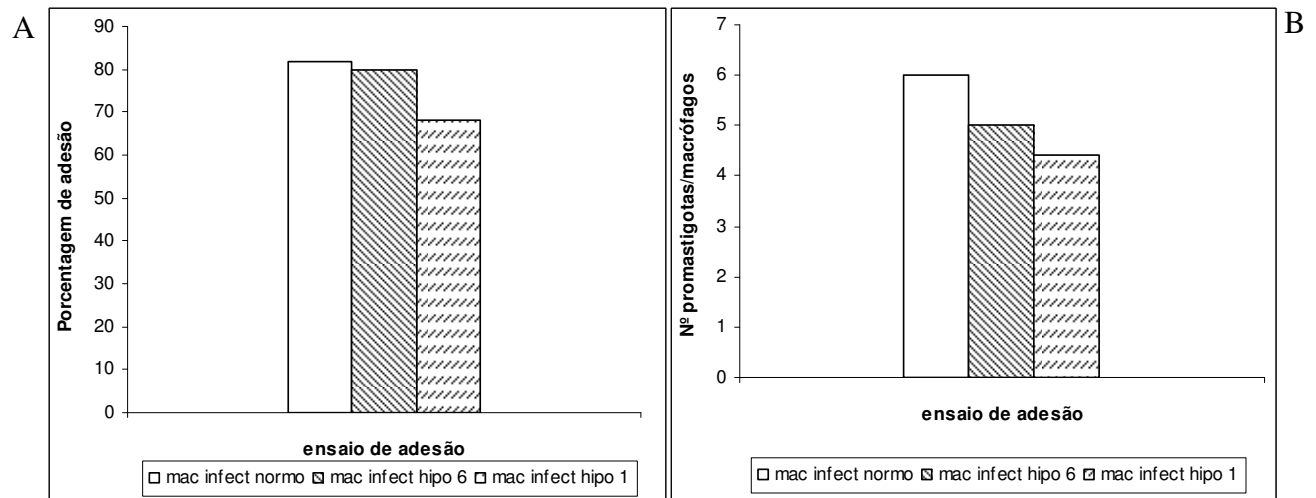


Figura 27: Ensaio de adesão de promastigotas-GFP em macrófagos peritoneais em condição normóxia e hipóxia. Macrófagos peritoneais murinos (3×10^6) foram plaqueados e mantidos em condições de hipóxia ou normóxia por 24 horas. Após este período foram adicionados os promastigotas-GFP. A interação foi permitida durante 45 minutos a 4°C. As células foram fixadas e coradas com Giemsa. A avaliação da adesão baseou-se na contagem de 200 células, em microscópio óptico. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com parasitas aderidos (A), e número de promastigotas aderidos por célula (B).

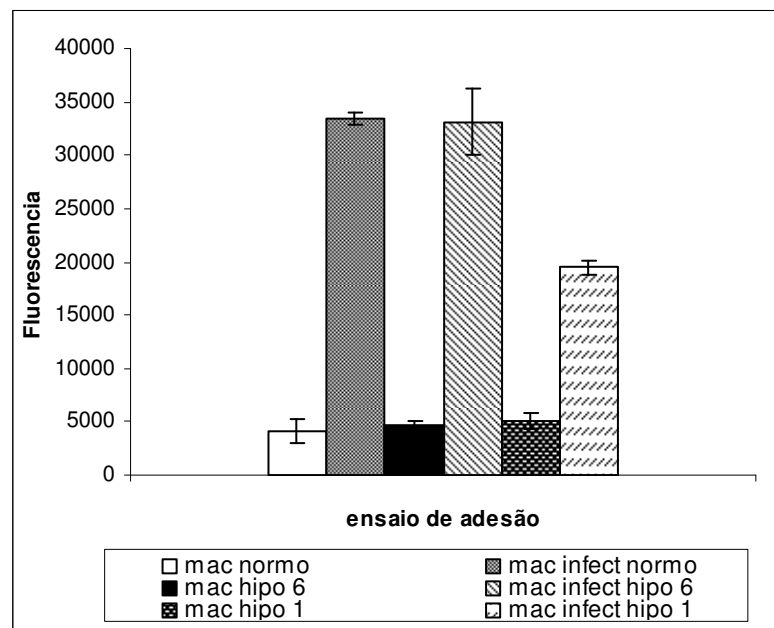


Figura 28: Fluorescência da cultura de macrófagos com promastigotas-GFP aderidos. As culturas de macrófagos foram gentilmente lavadas com salina para remoção dos parasitas não aderidos e 200µl de água destilada foi adicionado para coletar o sobrenadante das culturas. Os sobrenadantes foram transferidos para microplacas negras para a leitura da intensidade de fluorescência no espectrofluorímetro. Estatística: $p < 0.01$.

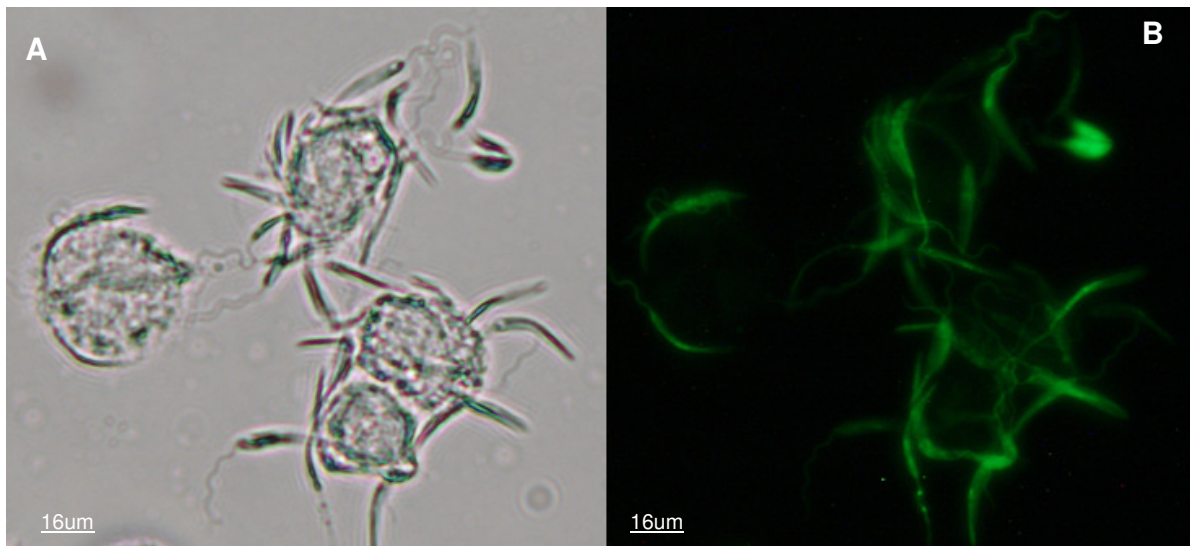


Figura 29: Visualização de macrófagos peritoneais aderidos com promastigotas-GFP. A cultura de macrófago com promastigotas-GFP aderidos foi visualizada pelo microscópio acoplado a fluorescência. A: contraste de fase, B: fluorescência.

5- DISCUSSÃO

O plasmídio vetor episomal pX que transporta um determinado gene, como o GFP, em *Leishmania*, tem sido de utilização limitada, pois a expressão dos genes é heterogênea nas populações de parasitas transfectados. E no hospedeiro o plasmídio é perdido na ausência de pressão seletiva para o marcador de resistência (MIBLITZ et al., 2000). Assim, apesar da importância e da possível vantagem de se utilizar parasitas transfectados com gene da GFP em vários ensaios, esse problema ocorre com frequência (MEHTA et al., 2008; MURPHY et al., 1993; CHAN et al., 2003). O objetivo desse trabalho foi a análise do potencial de seleção das formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*-GFP.

O primeiro passo, ao recebermos o parasita, foi comparar a curva de crescimento e infectividade de *L. amazonensis*-GFP e *L. amazonensis* não transfectada. Quando avaliados os dois parâmetros concluímos que *L. amazonensis*-GFP não difere do parasita selvagem; indicando seu potencial para investigação da sensibilidade a fármacos e estudos da interação patógeno hospedeiro, como já observado por Okuno et al. (2003). A estabilidade da fluorescência do parasita reportada por Rossi-Bergmann et al. (1999), foi confirmada em promastigotas-GFP e amastigotas-GFP, por espectrofluorímetro.

Vale salientar também que nossos dados mostraram que a *L. amazonensis*-GFP pode ser usada tanto em fluorimetria e microscopia como em citometria de fluxo (Figuras 23 e 24). Com a diferença que o espectrofluorímetro fornece uma média da fluorescência da amostra, enquanto que a citometria de fluxo fornece a intensidade de fluorescência de cada célula da amostra (CHALFIE & KAIN, 2006). É interessante, que em uma revisão feita por Sereno et al (2007), os autores discutem que *Leishmania* spp. transfectadas com GFP, geralmente, não expressam níveis suficientes de fluorescência

para medição em espectrofluorímetros, requerendo assim a utilização do citômetro de fluxo para a análise. Entretanto, muitos pesquisadores fazem uso de parasitas transfectados, por exemplo, *Trypanosoma cruzi* é utilizado tanto a forma tripromastigota como a forma intracelular amastigota para o “screening” de fármacos utilizando o espectrofluorímetro (LEPESHEVA et al., 2010).

Quando iniciamos a análise do potencial de seleção de *L. amazonensis*-GFP, de fato, observou-se em experimentos relacionados ao curso da intensidade de fluorescência de promastigotas-GFP, que ao longo de 56 dias de cultura, sem seleção, ocorreu perda da intensidade de fluorescência (Figura 6). E notou-se, também, perda da intensidade de fluorescência nas formas amastigotas-GFP, retiradas de lesão de camundongos (Figuras 7 e 8). Por isso, primeiramente, buscamos métodos de seleção dos promastigotas. Testamos algumas concentrações de geneticina e, 1mg/ml adicionada às culturas de promastigotas (5×10^5 parasitos/ml) resultou em 90% de promastigotas fluorescentes (Figura 11A) e alta intensidade da fluorescência (figura 9). Seleção e resultados parecidos usando *L. major* selecionadas com geneticina, foram reportados por Ha et al (1996). Em nosso trabalho, com promastigotas recém transformados de amastigotas de lesão de camundongos infectados, e duas etapas de seleção, também se obtém 90% de promastigotas fluorescentes (Tabela 1). Chan et al. (2003) utilizando *L. amazonensis* expressando GFP multimérico (cuja fluorescência é mais intensa que o GFP monomérico) observaram que amastigotas derivados de lesão exibem baixa intensidade de fluorescência, mas quando estes são transformados em promastigotas e selecionados com tunicamicina recuperam a alta intensidade de fluorescência. Nós também pudemos observar a recuperação da intensidade de fluorescência em promastigotas selecionados (Tabela 1). Estes resultados indicam que

de fato o plasmídio contendo o gene GFP é mantido em promastigotas e amastigotas por vários meses sem pressão seletiva, embora a intensidade de fluorescência caia mas possa ser recuperada por métodos de seleção (KAPLER; COBURN; BEVERLEY, 1990).

Embora a seleção *in vitro* das formas promastigotas transfectadas tenha sido realizada com sucesso (figuras 9, 10 e 11), atingindo 90% de parasitas fluorescentes, é desejável e mais informativo que estudos envolvendo amastigotas sejam realizados pois é a forma do parasita presente no hospedeiro vertebrado e alvo do sistema imune e de fármacos.

Nossos dados evidenciam aumento da intensidade de fluorescência dos amastigotas selecionados *in vitro*, (Figuras 12 a 14), com diminuição do número de amastigotas após o tratamento com geneticina (1mg/ml), isto é 62% de morte dos parasitas não fluorescentes. Os dados de citometria de fluxo (Figura 15) mostram, também, que a seleção *in vitro* dos amastigotas resultou em mais que o dobro de parasitas fluorescentes quando comparados a populações de amastigotas não selecionados. Nossa conclusão é de que é possível selecionar *in vitro* amastigotas-GFP, embora esta forma do parasita seja menos sensível ao antibiótico que os promastigotas.

Estudo utilizando *Trypanosoma brucei* transfectados com o gene resistente a geneticina, demonstrou que é possível selecionar esses transfectados resistentes *in vivo*, pela inoculação intraperitoneal do antibiótico com doses entre 40 mg/kg e 80 mg/kg do peso corporal de camundongos. A dose de 40mg/kg foi suficiente para matar todos os transfectados não resistentes ao antibiótico e a dose de 80mg/kg ocasionou a morte dos camundongos devido a toxicidade do fármaco (MURPHY et al., 1993). As

razões para os níveis elevados de sensibilidade dos tripanossomas a geneticina, em comparação a outros eucariotos não são claras (MURPHY et al., 1993). Apesar de esses ensaios terem sido bem sucedidos em *T. brucei*, não há até o presente, nenhum relato da seleção *in vivo* de *Leishmania*. Por isso para ampliar a utilização da seleção de *L. amazonensis* transfectadas, testamos protocolos de seleção *in vivo* dos amastigotas-GFP resistentes a geneticina.

Em camundongos infectados com promastigotas 90% fluorescentes, recupera-se em torno de 10% de amastigotas fluorescentes da lesão (Figura 8). Independente da concentração em que se infectam os camundongos (2×10^7 - 5×10^7 promastigotas) e do tempo de infecção (15 dias, 1-6 meses), a porcentagem de amastigotas fluorescentes retirados da lesão é baixa. Nós sugerimos que a perda de parasitas fluorescentes nas lesões está associada à morte dos promastigotas quando são injetados na pata dos camundongos, bem como com o posterior aumento do número de parasitas intracelulares no início do desenvolvimento da lesão. Um aumento da carga parasitária em lesões de camundongos com 15 dias ou 30 dias de infecção, mesmo após a diminuição da porcentagem de parasitas fluorescentes também são observações que reforçam nossa hipótese. Estudo feito por Mehta et al. (2008), compararam com sistema de imagem em tempo real a intensidade de fluorescência com a carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis* expressando EGFP. Os pesquisadores relataram uma relação do aumento da intensidade de fluorescência na imagem das lesões, entre 0 e 35 dias de infecção, com o aumento da carga parasitária.

Lang et al. (2005), avaliaram que dos 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*, injetados na orelha de camundongos, apenas 2% de amastigotas viáveis foram detectados um dia após a inoculação. O número de amastigotas aumentou lentamente

durante a primeira semana após a inoculação e substancialmente, atingindo 10^6 , após 14 dias. Neste mesmo trabalho, amastigotas de *L. amazonensis* transfectados com o gene da luciferase, recuperados de cultura de macrófagos da medula óssea, expressaram dez vezes mais a luciferase que parasitas recuperados de lesão de camundongos. Os amastigotas provenientes das culturas de macrófagos quando diferenciados em promastigotas expressaram trinta vezes mais a atividade da luciferase. Baseados em nossos dados e naqueles de Lang et al (2005) podemos concluir que a morte de promastigotas assim que injetados e o subsequente aumento no número de amastigotas, favorecem a perda de parasitas fluorescentes. Nós também observamos que amastigotas recuperados de lesão são menos fluorescentes que amastigotas de cultura *in vitro* de macrófagos infectados (Figura 7 e 23).

Uma observação interessante relaciona-se a redução do tamanho das lesões em animais tratados com geneticina em fases adiantadas da infecção com *L. amazonensis*-GFP (127 e 193 dias) (Figuras 16 e 17) . Nossa hipótese é de que essa redução da lesão está relacionada ao efeito do antibiótico nas infecções secundárias, pois em longos períodos de infecção as lesões na pata dos camundongos apresentam bactérias (GIORGIO *et al.*, 1998). De fato, em camundongos com menos tempo de infecção, (59 e 69 dias) (Figuras 19 e 20), que não apresentavam infecções secundárias, não ocorreu redução do tamanho da lesão após o tratamento com geneticina, e em alguns casos observou-se um aumento do tamanho das lesões e diminuição e/ou aumento da carga parasitária. Isto pode ter ocorrido porque o antibiótico não teria efeito em infecções secundárias, pois nessas fases da infecção não há bactérias nas lesões, e também porque há destruição de células íntegras do tecido do hospedeiro e possível resposta inflamatória. A redução da carga parasitária deve estar relacionada com a morte dos

amastigotas não fluorescentes e seu aumento com a multiplicação dos amastigotas fluorescentes (Figuras 17 C a 20 C).

Nos ensaios *in vitro* o máximo de 12 % de amastigotas-GFP foram obtidos, nos ensaios *in vivo* o máximo foi de 15% de amastigotas-GFP enquanto nos ensaios com promastigotas 90% de parasitas foram selecionados. Assim, os resultados dos ensaios de seleção sugerem que a sensibilidade dos amastigotas-GFP a geneticina não é tão elevada quanto a dos promastigotas-GFP. A forma promastigota mostra-se mais propícia para os ensaios de seleção, entretanto amastigotas precisam ser mais investigados em relação a sua susceptibilidade a geneticina.

Os parasitas transfectados são utilizados para substituir os métodos clássicos de fixação e coloração em ensaios para analisar fármacos e processos de interação patógeno-hospedeiro. Na avaliação da toxicidade de miltefosina, fármaco leishmanicida, em promastigotas-GFP, observa-se o efeito dose dependente, tanto em ensaio que mede a intensidade de fluorescência como em ensaio de contagem do número de promastigotas (Figuras 21 e 22). Santa-Rita et al. (2004) também observaram a redução do número de promastigotas de *L. amazonensis*, não transfectados, tratados com diferentes concentrações de miltefosina, e o efeito dose dependente.

Para avaliar o uso dos parasitas transfectados em ensaios de infecção, primeiramente observamos que promastigotas-GFP penetraram em macrófagos peritoneais e J774 e a intensidade de fluorescência das formas amastigotas intracelulares foi detectável nas culturas (Figuras 23 e 24). Nos ensaios de infecção de macrófagos infectados e tratados com glucantime (Figuras 25 e 26) observou-se diminuição da porcentagem de macrófagos infectados, paralelamente a uma diminuição da intensidade de fluorescência das culturas. O efeito dose dependente do fármaco foi

observado tanto nos resultados de contagem de parasitas intracelulares como de detecção de intensidade de fluorescência. Ayres et al. (2008) também observaram redução no índice de infecção de macrófagos infectados com *L. amazonensis* “selvagem” tratados com diferentes concentrações de glucantime.

Assim como comprovamos a eficiência de *L. amazonensis*-GFP para o possível “screening” de fármacos, avaliada por espectrofluorimetria (Figuras 21 e 26), outros pesquisadores também usaram *L. amazonensis*-GFP para testar novos compostos. Por exemplo, as chalconas, compostos da família dos flavonóides presentes em várias plantas, tem atividade leishmanicida em culturas de promastigotas e macrófagos infectados (BOECK et al., 2005). Podemos então concluir que a utilização de espectrofluorimetria e citometria de fluxo com *L. amazonensis*-GFP para o “screening” de fármacos, é um método eficiente e prático, pois a intensidade de fluorescência é detectável nesses ensaios e substitui os métodos de fixação e coloração.

Essencial para a patogênese da leishmaniose é a capacidade da *Leishmania* spp. aderir a superfície dos fagócitos mononucleares, infectar e replicar dentro da célula hospedeira (WYLER & SUZUKI, 1983). O processo de adesão parasita-célula é em grande parte dependente da atividade do parasita. Wyler (1982) observou que o pré-tratamento de amastigotas de *L. tropica* com citocalasina B (metabólito de fungos que interfere na função dos microfilamentos) inibiu a capacidade de adesão dos parasitas à célula; sugerindo que os parasitas participam ativamente do processo de adesão. Apesar de poucos estudos sobre adesão terem sido realizados com a forma amastigota de *Leishmania*, vários receptores dos fagócitos mononucleares devem estar envolvidos na adesão. Alguns trabalhos têm buscado compreender a interação da adesão dos amastigotas aos macrófagos e às células dendríticas e sugerem a participação de

proteoglicanos/heparina, componentes e receptores do complemento e anticorpos/FcR (receptor para domínio Fc de imunoglobulinas) (BOSETTO & GIORGIO, 2007; LOVE et al, 1993, WYLER & SUZUKI, 1983)

Em nosso trabalho, além de avaliarmos a capacidade de aderência dos promastigotas-GFP aos macrófagos, também analisamos a eficiência desta aderência em diferentes microambientes celulares. Os efeitos da hipóxia durante a infecção *in vitro* de macrófagos com *L. amazonensis* foram avaliados pelo nosso grupo de pesquisa (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004, 2007) e demonstrou-se que macrófagos em microambiente hipóxico (6% O₂), quando comparados às culturas normóxicas, reduzem a carga parasitária em aproximadamente 50% (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004, 2007). Assim, questionamos se durante o momento de adesão dos promastigotas em macrófagos, o microambiente hipóxico interfere neste processo. Na análise dos resultados verificamos que não houve diferença nas porcentagens de macrófagos com promastigotas aderidos cultivados em hipóxia 6% O₂ e normóxia, mas na condição hipóxia mais severa (1% O₂) menos promastigotas aderiram as células (Figura 27). A intensidade de fluorescência das culturas de macrófagos em hipóxia 6% O₂ e normóxia são semelhantes, enquanto em hipóxia 1% O₂ detectou-se diminuição da intensidade de fluorescência (figura 28). Nossa conclusão é de que a exposição dos macrófagos a condição de hipóxia branda, 6% O₂, não interferiu na adesão de promastigotas, mas que a exposição das células a hipóxia severa (1% O₂) altera o processo de adesão. Nessa condição é possível ter ocorrido mudança no metabolismo dos macrófagos, por exemplo, em relação a produção de ATP. De fato, Leeper-Woodford e Mills (1992) observaram que em macrófagos alveolares pré-expostos a hipóxia 1% O₂, somente 2% de hemácias foram fagocitadas e

que ocorreu uma redução em 55% nos níveis de ATP. Em trabalho recente do grupo observou-se uma diminuição da produção de ATP em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (selvagem) mantidos em hipóxia severa (DEGROSSOLI 2009). Assim, podemos sugerir que, com o metabolismo energético alterado, macrófagos produzem menos proteínas, carboidratos e lipídios, refletindo na quantidade e distribuição das moléculas e receptores da membrana plasmática.

Os resultados do nosso trabalho com os parasitas *L. amazonensis*-GFP apontam e abrem perspectivas para o desenvolvimento de novos protocolos e ensaios para a seleção eficiente de *Leishmania*-GFP e possibilitaram a discussão do fenômeno de seleção de parasitas intracelulares e sua interação com a célula hospedeira.

6- CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- A manutenção da fluorescência das formas promastigotas-GFP, tornam a *L. amazonensis*-GFP totalmente viável para o “screening” de fármacos, uma vez que supera a necessidade dos métodos de fixação e coloração de culturas de células.
- As formas amastigotas-GFP parecem ser menos sensíveis a geneticina que as formas promastigotas-GFP e embora a seleção *in vivo* tenha ocorrido o resultado desta seleção aconteceu em níveis baixos. Sendo assim as formas promastigotas-GFP são melhores sucedidas no processo de seleção.
- *L. amazonensis*-GFP pode ser convenientemente usada em ensaios com promastigotas e infecção em macrófagos avaliando, por exemplo, fármacos leishmanicidas como miltefosina e glucantime, entretanto é preciso que esta mantenha-se o suficientemente fluorescente para a realização destes ensaios.
- A exposição de macrófagos a hipóxia severa (1% O₂) pode afetar a adesão dos parasitas.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMÓRA, S. S. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; FEIJÓ, F. M. C.; ALVES, N. D.; MACIEL, M. V. Control of *Phlebotomine* (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. **Neotrop. Entomol.** v. 38, n. 3, p.303-310, 2009.

ARRAIS-SILVA, W. W.; PAFFARO, JR. V. A.; YAMADA, A. T.; GIORGIO, S. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Exp. Mol. Pathology**, v. 78, n.1, p.49-54, 2005.

AYRES, D. C; PINTO, L. A.; GIORGIO, S. Efficacy of pentavalent antimony, amphotericin B, and miltefosine in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages under normoxic and hypoxic conditions. **J. Parasitol.**, v. 94, n. 6, p.1415-1417, 2008.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BOSETTO, M. C.; GIORGIO, S. *Leishmania amazonensis*: multiple receptor-ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells. **Exp. Parasitol.**, v. 116, p.306-310, 2007.

BLACKWELL, J. M.; EZEKOWITZ, R. A. B.; ROBERTS, M. B.; CHANNON, J. Y.; SIM, R. B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J. Exp. Med.**, v. 162, p.324-331, 1985.

BLUM A, J.; HATZ, C. F. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. **J. Travel Med.** 2009. v. 16, n. 2, p.123-131, 2009.

BOECK, P.; BANDEIRA FALCÃO, C. A.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, n.5, p.1538-45, 2006.

BROWN, J. M. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. **Cancer Biol. Therapy.**, v.1, p.453-458, 2002.

BUENO, R. **Estudo do gene NRAMP1 canino em macrófagos infectados com *Leishmania Leishmania chagasi***. 2006. 88 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BUTCHER, B. A., SKLAR, L. A., SEAMER, L. C., GLEW, R. H. Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages a fluorescence flow cytometric analysis. **The J. of immunol.**, v.148, n.9, p.2879- 2886, 1992.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science.**, v. 263, p.802-805, 1994.

CHALFIE, M.; KAIN, S. R.. **Green fluorescent protein: Properties, applications, and protocols**. 2. ed. New Jersey: Wiley, 2006. 47 v

CHAN, M. M. Y.; BULINSKI, J. C.; CHANG, K. P.; FONG, D. Microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. **Parasitol. Res.**, v. 89, p.266- 271, 2003.

CHIARINI, E.; PENNA, T. C. V. Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 39, n. 4, p.457-466, 2003.

COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; PICOLLI, C.; GIORGIO, S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. **J. Parasitol.**, v. 90, p.510-515, 2004.

COLLINS, L. A.; TORRERO, M. N.; FRANZBLAU, S. G. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 2, p.344-347, 1998.

CRAGGS, T. D. Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p.2865-2865, 2009.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38, n. 6, p.1041-7, 1996.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p.399-410, 2006.

CROWTHER, M., BROWN, N. J., BISHOP, E.T., LEWIS, C. E. Microenvirontal influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. **J. Leukoc. Biol.** v. 70, p.478-490, 2001.

CUBITT, A. B.; HEIN, R.; ADAMS, S. R.; BOYD, A. E.; GROSS, L. A.; TSIEN, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Techniques.**,v. 20, p.448-455, 1995.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, p.132-141, 2002.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Ther.**, v. 22, p.491-502, 2009.

DEGROSSOLI, Adriana. **Estudos de alterações funcionais de macrófagos submetidos a hipóxia no modelo *in vitro* da leishmaniose.** 2009. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Unicamp, Campinas, 2009.

DEGROSOLLI. A.; COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; GIORGIO, S. Hypoxia modulates the expression of 70kDa heat shock protein and reduces *Leishmania* infection in macrophages. **J. Biomed. Sci.**, v. 11, n.6, p.847-54, 2004.

DEGROSSOLI, A.; BOSETTO M.; LIMA C. B. A.; GIORGIO S. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. **Immunol. Lett.**, v. 114, n. 2, p.119-25, 2007.

DEGROSSOLI, A.; GIORGIO, S. Functional alterations in macrophages after hypoxia selection. **Exp. Biol. Med.**, v. 232, n. 1, p.88-95, 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p.305-318, 2004.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **J. Bras. Med.** v. 2, p. 79, 1903.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. **Imaj.**, v. 11, n. 1, p.623-628, 2009.

GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIROPOULOS, H.; VON ZUBEN, F. J.; YAMADA, A.; AUGUSTO, O. *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v.v66, p.807-814, 1998.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p.71-80, 2003.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. A. **The cochrane collaboration:** Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Barcelona: Wiley & Sons, 2008. (2).

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol.**, v. 6, p.230-250, 1993.

HA, S. D.; SCHWAZ, J. K.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 77, p. 57-64, 1996.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.**, v. 44, p.1-39, 1999.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p.229-243, 2001.

HELFMAN, T.; FALANGA, V. Gene expression in low oxygen tension. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, p.37-41, 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet.**, v. 354, n. 1, p.1191-1199, 1999.

HESPANHOL, R. C.; SOEIRO, M. N. C.; MEUSER, M. B.; MEIRELLES, M. N. S. L.; CÔRTE-REAL, S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 53, n. 1, p.35-44, 2005.

IVANOVIC, Z. Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm. **J. Cell. Physiol.**, v. 219, p.271-275, 2009.

KAMAU, S. W.; GRIMM, F.; HEHL, A. B. Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of antileishmanial compounds in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 12, p.3654-3656, 2001.

KAPLER, G. M.; COBURN, C M.; BEVERLEY, S. M.. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, n. 3, p.1084-1094, 1990.

KIMA, P. E.; CONSTANT, S. L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, K. S.; HABERMAN, A. M.; SHLOMCHIK, M. J.; McMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1063–1067, 2000.

KOH, M. Y.; SPIVAK-KROIZMAN, T. R.; POWIS, G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. **Trends Biochem. Sci.**, v. 33, n. 11, p. 526-534, 2008.

LANG, T.; GOYARD, S.; LEBASTARD, M.; MILON, G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboured macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 3, p.383-392, 2005.

LEEPER-WOODFORD, S. K.; MILLS, J. W. Phagocytosis and ATP levels in alveolar macrophages during acute hypoxia. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 6, p.326-334, 1992.

LEPESHEVA, G. I.; HARGROVE, T. Y.; ANDERSON, S.; KLESHCHENKO, Y.; FUTAK, V.; WAWRZAK, Z.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 26, p.1-17, 2010.

LEWIS, J. S.; LEE, J. A.; UNDERWOOD, J. C. E.; HARRIS, A. L.; LEWIS, C. E. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p.889-900, 1999.

LIU, H. S.; JAN, M. S.; CHOU, C. K.; CHEN, P. H.; KE, N. J. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 260, n. 3, p.712-717, 1999.

LOVE, D. C.; ESKO, J. D.; MOSSER, D. M. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 3, p.759-766, 1993.

MEHTA, S. R.; HUANG, R.; YANG, M.; ZHANG, X. Q.; KOLLI, B.; CHANG, K. P.; HOFFMAN, R. M.; GOTO, Y.; BADARO, R, SCHOOLEY, R. T. Real-time in vivo green fluorescent protein imaging of a murine leishmaniasis model as a new tool for *Leishmania* vaccine and drug discovery. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 12, p.1764-1770, 2008.

MIBLITZ, A.; MOTTRAM, J. C.; OVERATH, P.; AEBISCHER, T. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 10, p.251–61, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em 27 abril 2010.

MISHRA J.; SAXENA A.; SINGH S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n. 10, p.1153-69, 2007.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; LEWIS, C. E. Hypoxia or *in situ* normoxia: the stem cell paradigm. **J. Immunol.**, v. 175, p.6257-6263, 2005.

MURPHY, N. B.; MUTHIANI, A. M.; PEREGRINE, A. S. Use of an *in vivo* system to determine the G418 resistance phenotype of bloodstream-form *Trypanosoma brucei brucei* transfectants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, n. 5, p.1167-1170, 1993.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet.**, v. 366, p.1561-1577, 2005.

OKUNO, T.; GOTO, Y.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H.; MATSUMOTO, Y. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the betagalactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. **Exp. Anim.**, v. 52, p.109–18, 2003.

PINHEIRO, R. O.; PINTO, E. F.; LOPES, J. R.; GUEDES, H. L.; FENTANES, R. F.; ROSSI-BERGMANN, B. TGF-betaassociated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. **Microbes Infect.**, v. 7, n. 13, p.1317-23, 2005.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The lancet.**, v. 7, p.581-592, 2007.

REMENSNYDER, J. P.; MAJNO, G. Oxygen gradients in healing wounds. **Am. J. Pathol.**, v. 52, n. 2, p.301-323, 1968.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America: A systematic review. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 1, p.584-584, 2010.

ROSSI-BERGMANN, B.; LENGLET, A.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; COSTA-PINTO, D.; TRAUB-CZEKO, Y. M. Use of fluorescent *Leishmania* for faster quantitation of parasite growth *in vitro* and *in vivo*. **Mem. I. Oswaldo Cruz.**, v. 94. n. 2, p.74, 1999.

SAKTHIANANDESWAREN A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends In Parasitology.**, v. 25, n. 8, p.383-391, 2009.

SAMPAIO, W. M.; MOURA, E. P.; ARRUDA, F. C. S.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; FERNANDES, A. P. S. M.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. *In vitro* binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Bmc Vet. Res.**, v. 11, n. 3, p.1-9, 2007.

SANTA-RITA, R M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, Campinas, v. 54, n. , p.704-710, 2004.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends. Mol. Med.**, v. 7, n. 8, p. 345-350, 2009.

SERENO D.; SILVA A. C.; MATHIEU-DAUDE F.; OUAISSI A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitol. Int**, v. 56, p.3–7, 2007.

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

SINGH, N.; DUBE, A. Short report: fluorescent *Leishmania*: application to anti-Leishmanial drug testing. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n.4, p.400-402, 2004.

SOUZA, R. O. M. A.; PEREIRA, V. L. P.; MUZITANO, M. F.; FALCÃO, C. A. B.; ROSSI-BERGMANN, B.; FILHO, E. B. A.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2 methylene- 3-(4-bromophenyl) propanenitrile and analogous compounds. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, p.99-102, 2007.

SPIEGEL, M. R. **Estatística**. São Paulo: Mcgraw-hill do Brasil, 1974.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Ammu. Rev. Biochem.**, v. 67, p.509-544, 1998.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p.433-450, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <<http://www.who.int/leishmaniasis/>>
Acesso em: 26 abril 2010.

WYLER, D. J. *In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis, evidence for an active role of the parasite in attachment. **J. Clin. Invest.**, v. 70, p. 82-88, 1982.

WYLER, D. J.; SUZUKI, K. *In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: effect of enzyme treatments on attachment. **Infect. Immun.**, v. 42, n. 1, p. 356-361, 1983.

WYLER, D. J.; SYPEK, J. P.; A MCDONALD, J. *In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. **Infect. Immun.**, v. 49, n. 2, p.305-311, 1985.

YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILLIPS, G. N.. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nat. Biotechnol.**, v. 14, p.1246-1251, 1996.

YUN, J. K.; McCORMICK, T. S.; VILLABONA, C.; JUDWARE, R. R.; ESPINOSA, M. B.; LAPETINA, E. G. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p.13903-13908, 1997.

ZENIAN, A.; ROWLEST, P.; GINGELL, D. Scanning electron-microscopic study of the uptake of *Leishmania* parasites by macrophages. **J. Cell Sci.**, v. 39, p.187-199, 1979.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada A padronização de ensaios utilizando a *Leishmania amazonensis* expressando a Green Fluorescent Protein:

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

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp, sob Protocolo(s) nº 1878-1 e 2196-1.

* Caso a Comissão seja externa à 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.

Sidney de Santa Costa
Aluno:

Helene L. L.
Orientador: SELMA GIORGIO

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome:

Função:

PM

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