UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
E BIOAGENTES PATOGÊNICOS

ANA LUISA AUGUSTO BARBOSA

**Estabelecimento de um modelo de infecção em camundongos
para o estudo da Leishmaniose Visceral**

Ribeirão Preto

2020

ANA LUISA AUGUSTO BARBOSA

**Estabelecimento de um modelo de infecção em camundongos
para o estudo da Leishmaniose Visceral**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

BARBOSA, Ana Luisa Augusto

Estabelecimento de um modelo de infecção em camundongos para o estudo da Leishmaniose Visceral. Ribeirão Preto, 2020.

74 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Zamboni, Dario Simões.

Nome: BARBOSA, Ana Luisa Augusto

Título: Estabelecimento de um modelo de infecção em camundongos para o estudo da Leishmaniose Visceral

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/ 2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”.

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente a minha mãe Giselma por ser sempre a minha melhor amiga e a minha maior fonte de inspiração, por ter sido também a melhor professora durante toda a minha trajetória até então. Obrigada mãe por ter me ensinado o valor dos estudos e da educação, por sempre ter paciência e discernimento em todos esses anos. Você é, sem sombra de dúvidas, um exemplo. Eu nunca conseguirei retribuir tanto amor!

Agradeço ao meu pai Arnaldo e ao meu irmão Gabriel que, juntos à minha mãe, completam essa família que eu tenho tanto orgulho de chamar de minha. Uma base forte e companheira me fez ser capaz de conquistar todas essas etapas e estar aqui hoje. Obrigada pai por sempre ter foco e fazer da nossa casa um verdadeiro lar; obrigada irmão por ser o meu melhor amigo, sempre disponível e uma fonte de segurança e confiança.

Ao Prof. Dr. Dario Simões Zamboni por permitir que eu fizesse parte de sua equipe durante esses anos. Sou imensamente grata pela oportunidade, pela orientação e por tanto aprendizado e crescimento científico/profissional que pude obter durante esse período. Em tempos de tanta crise e com tanta desvalorização da ciência nacional, ter a oportunidade de trabalhar em um laboratório tão completo e que produz ciência de alta qualidade é realmente uma oportunidade para poucos.

Agradeço, com muito carinho, à Leticia de Almeida, por todo o suporte que me deu durante esse tempo de mestrado; desde o primeiro dia, com todas as orientações sobre o laboratório, escrita de projeto, infinitas correções, até o último experimento, em todos os planejamentos, infecções e análises. Obrigada Letícia por dividir tanto conhecimento comigo e por ter se tornado uma amiga tão valiosa para a minha vida. Nada disso teria êxito sem toda a sua ajuda.

Às colaboradoras, Profa. Ana Paula Cabral de Araujo Lima (UFRJ), por gentilmente ceder as cepas *Leishmania infantum* Pp75 e *Leishmania donovani* LV9, e a profa. Sílvia Reni Bortolin Uliana (USP), também pelo fornecimento da cepa *Leishmania infantum* NCL, essenciais na realização desse trabalho. Agradeço também ao Lucas Lorenzson e a toda equipe do Laboratório da Profa. Ângela Cruz, pela colaboração e auxílio na modificação das cepas.

A todos os colegas de laboratório Augusto, Keyla, Warrison, Letícia, Mariana, Adriene, Tamara, Renan e Robson por serem coletivos; uma verdadeira equipe, trabalhando sempre juntos, colaborando com todos os trabalhos e ideias, tanto na prática, como na teoria durante as reuniões. Também a equipe técnica que mantém o laboratório em pleno funcionamento, obrigada Maira, Victória, Débora e Bárbara.

Agradeço ao grupo dos lanchinhos Catarina, Luiza, Letícia, Tamara e Adriene. Vocês fizeram os meus dias em Ribeirão Preto mais doces e menos difíceis; foram a minha família durante esse período, obrigada por tanto acolhimento.

Aos meus familiares, que vieram para Ribeirão Preto comigo dentro do meu coração. A minha família é a minha maior referência de amor e afeto. Foi muito difícil ficar por aqui sem almoçar com vocês todos os domingos na casa da vovó ou da tia Josi. Eu não conheço outra família tão maravilhosa quanto a nossa, obrigada vovó por ter nos ensinado sempre a importância das nossas raízes. E todos os outros por me apoiarem e se esforçarem para aproveitar cada segundo quando eu voltava para casa.

Aos meus amigos de vida, Isabella, Gabriel e Yohanna por nunca me deixarem esquecer o quanto eu sou querida e amada e por, mais uma vez, me mostrarem que a distância é incapaz de destruir verdadeiras amizades. Vocês são inexplicáveis.

Ao Luã por tanto amor, carinho e companheirismo. Todos os esforços para reduzir a distância física que nos afastava foram cruciais para que eu fosse mais feliz todos os dias. Obrigada por acreditar tanto no meu potencial e por tentar me mostrar isso sempre!

Agradeço aos professores do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos por todo o conhecimento que puderam compartilhar nesse período. À secretária Gabriela por ser sempre prestativa e atenciosa. Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelos recursos fornecidos. E a FMRP/USP pela estrutura e pela oportunidade de me formar com tanta excelência em uma instituição com tamanho reconhecimento.

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nº do processo de bolsa 134266/2018-8. Os projetos do laboratório são também financiados pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

BARBOSA, Ana Luisa Augusto. **Estabelecimento de um modelo de infecção em camundongos para o estudo da Leishmaniose Visceral**. 2020. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O uso de animais modelo na pesquisa é de extrema relevância no progresso clínico atualmente. Dentre as diversas aplicações, identificar as vias celulares importantes durante determinadas infecções, avaliar a participação dessas vias na resistência ou na suscetibilidade a alguma doença e, principalmente, testar fármacos em etapas pré-clínicas utilizando animais com alta similaridade genética torna essa etapa ainda mais valiosa. Por esse motivo, o uso de camundongos hoje no estudo de doenças infecciosas é indispensável, mais ainda quando se trata de uma doença com alto índice de letalidade, poucos tratamentos disponíveis e que acomete um alto número de pessoas em regiões endêmicas, como a Leishmaniose Visceral (LV). Dessa forma, nesse trabalho buscamos estabelecer um modelo de infecção em camundongos, utilizando uma cepa de *Leishmania infantum*, capaz de causar a LV. Os camundongos C57BL/6 são amplamente utilizados na pesquisa, com genoma sequenciado e possuem diversas ferramentas de estudo devido à grande quantidade de mutações já realizadas em animais com esse *background* genético, no entanto esses animais são resistentes a manifestação da LV. Estabelecer um modelo funcional de infecção nesses camundongos para que os mesmos manifestem a LV em sua forma clínica é crucial para que os estudos sobre a doença e possíveis tratamentos avancem. Selecionamos uma cepa com alto potencial de infecção e identificamos a via de infecção capaz de infectar os órgãos alvo do animal de maneira mais próxima ao observado fisiologicamente, com o menor número de parasitos possível. As etapas de purificação desses parasitos antes de serem utilizados na infecção também tem um papel importante no estabelecimento da LV, assim como demonstrado aqui. Definimos então as condições ideais para infecção de animais C57BL/6 de maneira que essa infecção se estabeleça e seja funcional nas análises dos animais. Além disso, durante a validação do modelo, sugerimos que a ausência do NLRP3 durante a infecção por *L.infantum* pode favorecer o estabelecimento do parasito.

Palavras chave: *Leishmania*; leishmaniose viseral; modelo murino; infecção.

ABSTRACT

BARBOSA, Ana Luisa Augusto. **Development of an infection model in mice for the study of Visceral Leishmaniasis**. 2020. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The use of animal models in research is extremely relevant to clinical progress nowadays. Among the many applications, identifying the important cell pathways during certain infections, evaluating the participation of these pathways in resistance or susceptibility to some disease and, mainly, testing drugs in preclinical stages using animals with high genetic similarity makes this stage even more valuable. For this reason, the use of mice to study infectious diseases is essential today, especially when it's a disease with a high lethality rate, few treatments available and that affects a high number of people in endemic regions, such as Visceral Leishmaniasis (VL). Thus, in this work we seek to establish an infection model in mice, using a *Leishmania infantum* strain, capable of causing VL. C57BL/6 mice are widely used in research, with sequenced genomes and have several study tools due to the large number of mutations already carried out in animals with this genetic background, however these animals are resistant to the VL manifestation. Establishing a functional infection model in these mice so that they can manifest VL in its clinical form is crucial for studies on the disease and possible treatments to progress. We selected a strain with a high potential for infection and identified the pathway of infection capable of infecting the animal's target organs in a manner closer to that observed physiologically, with the least number of parasites possible. The steps to purify these parasites before they are used in the infection also play an important role in establishing VL, as demonstrated here. We then defined the ideal conditions for C57BL/6 animals infection so this infection is established and is functional in animal analysis. In addition, during model validation, we suggest that the absence of NLRP3 during *L. infantum* infection may favor the establishment of the parasite.

Keyworlds: *Leishmania*; visceral leishmaniasis; mice model; infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases do Parasito.....	17
Figura 2. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	19
Figura 3. Epidemiologia LV (OMS 2018).....	22
Figura 4. Epidemiologia no Brasil (SVS-MS, 2017).	23
Figura 5. Quantificação comparativa da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas <i>L. infantum</i> NCL, <i>L. infantum</i> Pp75 e <i>L. donovani</i> LV9.....	41
Figura 6. Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas <i>L. infantum</i> NCL, <i>L. infantum</i> Pp75 e <i>L. donovani</i> LV9 e padronização do uso do kit para luminômetro após três horas de infecção.	43
Figura 7. Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas <i>L. infantum</i> NCL, <i>L. infantum</i> Pp75 e <i>L. donovani</i> LV9 e padronização do uso do kit para luminômetro após vinte e quatro horas de infecção.....	44
Figura 8.: Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas <i>L. infantum</i> NCL, <i>L. infantum</i> Pp75 e <i>L. donovani</i> LV9 e padronização do uso do kit para luminômetro após quarenta e oito horas de infecção.	44
Figura 9. Comparativo da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas <i>L. infantum</i> NCL, <i>L. infantum</i> Pp75 e <i>L. donovani</i> LV9 em diferentes <i>timepoints</i> por luminescência.	45
Figura 10. Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com a cepa <i>L. infantum</i> NCL com diferentes fases do parasito em diferentes temperaturas.	47
Figura 11. Quantificação comparativa da carga parasitária em camundongos C57BL/6 infectados com as cepas <i>L. infantum</i> NCL, <i>L. infantum</i> Pp75 e <i>L. donovani</i> LV9 por via intraperitoneal e por via intradérmica na orelha.	50
Figura 12. Infecção de animais C57BL/6 com <i>L. infantum</i> NCL pela via intradérmica..	51
Figura 13. Comparativo das diferentes fases do parasito <i>L. infantum</i> NCL na infecção de animais C57BL/6.....	53
Figura 14. Quantificação da intensidade de luminescência por unidade de <i>L. infantum</i> NCL expressando o vetor luciferase constitutivamente.....	54
Figura 15. Comparativo da intensidade de luminescência emitida por unidade de <i>L. infantum</i> NCL expressando o vetor luciferase constitutivamente em diferentes condições experimentais..	55
Figura 16. Cinética de replicação de <i>L. infantum</i> NCL em animais C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal..	57
Figura 17. Construção da cepa <i>L. infantum</i> NCL expressando a proteína fluorescente TdTomato constitutivamente..	59

Figura 18. Cepa <i>L. infantum</i> NCL expressando o vetor fluorescente TdTomato constitutivamente infectando macrófagos derivados de medula óssea..	60
Figura 19. Geração de animais em <i>Littermate Control</i> de animais knockout para o gene do inflamassoma de NLRP3.....	62
Figura 20. Quantificação da carga parasitária em animais <i>Littermate Control</i> para o gene do inflamassoma de NLRP3 após 21 e 28 dias de infecção com <i>L. infantum</i> NCL.....	64
Figura 21. Análise do perfil de células infectadas por <i>L. infantum</i> NCL TdTomato em baços e fígados de camundongos C57BL/6 após 21 dias de infecção.....	65
Figura 22. Análise do perfil de células infectadas por <i>L. infantum</i> NCL TdTomato em baços e fígados de camundongos C57BL/6 após 28 dias de infecção.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

B.O.D.....	Demanda Bioquímica de Oxigênio (Biochemical Oxygen Demand)
BMDM.....	Bone Marrow Derived Macrophage
CEUA.....	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Gás carbônico
DPM.....	Desvio Padrão Médio
ELISA.....	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HIV.....	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hoechst.....	<i>bisBenzimide H 33342 trihydrochloride</i>
HTS.....	<i>High-throughput screening</i>
ID.....	Intradermico
IP.....	Intraperitoneal
IV.....	Intravenoso
kg.....	Quilograma
<i>L. (L.) infantum</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
<i>L. (L.) donovani</i>	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>
LCCM.....	Meio condicionado de células L929
LCD.....	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL.....	Leishmaniose Cutânea Localizada
LMC.....	Leishmaniose Mucocutânea
LV.....	Leishmaniose Visceral
LVC.....	Leishmaniose Visceral Canina
LT.....	Leishmaniose Tegumentar
mg.....	Miligrama
mm.....	Milímetros
mM.....	Milimolar
MOI.....	Proporção de parasito/célula para infecção (<i>Multiplicity of Infection</i>)
°C.....	<i>Celsius</i>
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
R10%.....	RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino
R20/30.....	RPMI-1640 com 20% de soro fetal bovino e 30% de meio condicionado de células L929
RIFI.....	Reações de Imunofluorescência Indireta
SFB.....	Soro Fetal Bovino
SUS.....	Sistema Único de Saúde
WT.....	<i>Wildtype</i>
µg.....	Micrograma
µL.....	Microlitro
µm.....	Micrômetro
U/mL.....	Unidades por mililitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. LEISHMANIA SPP	16
1.1.1. FORMAS DO PARASITO	17
1.1.2. CICLO DE VIDA	18
1.1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	19
1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL	21
1.2.1. EPIDEMIOLOGIA	22
1.2.2. RELEVÂNCIA CLÍNICA	23
1.2.3. MODELOS DE ESTUDOS	26
1.3. VIAS DE INFECÇÃO	27
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO GERAL	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. CULTIVO DE LEISHMANIAS SPP.	30
4.2. ANIMAIS	30
4.2.1. USO DE ANIMAIS C57BL/6 SELVAGENS	30
4.2.2. GERAÇÃO DE ANIMAIS NLRP3 KO EM <i>LITTERMATE CONTROL</i>	31
4.3. CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA	31
4.4. PURIFICAÇÃO DE CULTURAS DE LEISHMANIAS	32
4.4.1. CULTURA DE FASE ESTACIONÁRIA	32
4.4.2. CULTURA ENRIQUECIDA DE METACICLICAS	33
4.4.3. METACICLICAS PURIFICADAS	33
4.5. INFECÇÃO DE BMDMS	33
4.6. COLORAÇÃO DE PARASITOS PARA MICROSCOPIA	34
4.7. LEITURA DE LUMINESCÊNCIA	34
4.8. INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS	34
4.8.1. INFECÇÃO INTRAPERITONEAL	35

4.8.2.	INFECÇÃO INTRADERMICA.....	35
4.9.	QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA POR ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE	35
4.10.	CONSTRUÇÃO DA CEPA COM VETOR TDTOMATO	36
4.11.	ANÁLISE DO PERFIL DE CÉLULAS INFECTADAS	36
4.11.1.	MARCAÇÕES EXTRA CELULARES	36
4.11.2.	PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DE CITOMETRIA DE FLUXO	37
4.12.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1.	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE VIRULÊNCIA <i>IN VITRO</i>	39
5.1.1.	ENSAIO REPLICATIVO INTRACELULAR.....	39
5.1.2.	ENSAIO REPLICATIVO INTRACELULAR COM CEPAS LUMINESCENTES	41
5.1.3.	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INFECÇÃO DE BMDMS COM A CEPA NCL <i>IN VITRO</i>	45
5.2.	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO <i>IN VIVO</i>	47
5.2.1.	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM AS DIFERENTES CEPAS	48
5.2.2.	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM A CEPA <i>L. INFANTUM</i> PELA VIA INTRADÉRMICA.....	50
5.2.3.	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DAS DIFERENTES FORMAS DE PURIFICAÇÃO DO PARASITO	52
5.3.	AVALIAÇÃO DO USO <i>IN VIVO</i> DA CEPA <i>L. INFANTUM</i> NCL EXPRESSANDO LUCIFERASE.....	53
5.4.	AAVLIAÇÃO DA CINÉTICA <i>IN VIVO</i> DA CEPA <i>L. INFANTUM</i> DURANTE A INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6.....	56
5.5.	CONSTRUÇÃO DA CEPA <i>L. INFANTUM</i> COM O VETOR FLUORESCENTE TDTOMATO	58
5.6.	INFECÇÃO DOS ANIMAIS <i>Nlrp3^{-/-}</i> COM A CEPA <i>L. INFANTUM</i> NCL TDTOMATO	60
6.	CONCLUSÃO	67
7.	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. *LEISHMANIA SPP*

Diversas espécies de parasitos do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) são responsáveis pelo grupo de doenças chamado leishmaniose. As leishmanioses são classificadas como doenças tropicais negligenciadas, com alta morbidade e que podem ser letais em alguns casos (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017); consideradas antroponozoonoses, são transmitidas a humanos e outros mamíferos por vetores artrópodes flebotomíneos infectados (MURRAY *et al.*, 2005; ALVAR *et al.*, 2012).

Os vetores flebotomíneos alcançam áreas domiciliares rurais e urbanas, influenciando na infecção da população. Cachorros domésticos são reservatórios da doença e podem ser chave na infecção de outros membros da família (LAURENTI *et al.*, 2013). Uma avaliação de regiões endêmicas leva a concluir que fatores socioeconômicos estão ligados diretamente ao risco de se contrair leishmaniose, o que também explica a dificuldade de tratamento, visto que são pacientes com poder aquisitivo mais baixo, muitas vezes, sem acesso a um bom sistema de saúde e que acabam desistindo do tratamento devido ao longo tempo de duração (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam cerca de um milhão de novos casos de leishmaniose anualmente. São cerca de 12 milhões pessoas infectadas hoje e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas onde a leishmaniose é considerada endêmica (OMS, 2016). A doença afeta cerca de 90 países, no entanto, em 2017, 94% do total de novos casos estavam concentrados em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (OMS, 2018).

1.1.1. FORMAS DO PARASITO

A *Leishmania spp* se apresenta de diferentes formas dependendo de onde se encontra. Essas variações estão diretamente ligadas à sua capacidade de divisão e infecção. A forma amastigota do parasito é observada em ambientes intracelulares obrigatoriamente (KAYE; SCOTT, 2011), dentro de vacúolos replicativos chamados fagolisossomos, é ovoide e aflagelada e se multiplica por fissão binária em células de mamíferos (LAWYER *et al.*, 1990). Fora da célula hospedeira, e presente apenas no inseto vetor, a *Leishmania* se apresenta como promastigota, sendo essa a forma flagelada que pode variar entre procíclica e metacíclica. A forma procíclica é proliferativa, pequena, volumosa, mais pesada e com flagelos mais curtos. A forma metacíclica é altamente infectiva, mais estreita, e com flagelos mais longos (Figura 1) (DE ASSIS *et al.*, 2012).

Figura 1. Fases do Parasito. Adaptado de DE ASSIS *et al.* 2012. Representação esquemática das fases da *Leishmania spp.* no inseto vetor (parte superior) e no hospedeiro mamífero (parte inferior).

1.1.2. CICLO DE VIDA

Como mostrado em 1.1.1, os parasitos do gênero *Leishmania* exibem caráter digenético, apresentando duas formas evolutivas durante seu ciclo de vida: amastigota e promastigota (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Além disso o ciclo de vida do parasito se apresenta parte em hospedeiros mamíferos e parte em hospedeiros invertebrados (vetores flebotomíneos). Esses vetores podem ser do gênero *Lutzomya* no “Novo Mundo” ou do gênero *Phlebotomus* no “Velho Mundo” (Ordem Diptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae) (BRUZA *et al.*, 2018; CHAPPUIS *et al.*, 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

As promastigotas metacíclicas presentes na proboscide das fêmeas do inseto vetor são regurgitadas na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo, juntamente com anticoagulantes, vasodilatadores, inibidores de plaquetas, imunomoduladores e anti-inflamatórios presentes na saliva do inseto. Células do sistema imune inato residentes e recrutadas são responsáveis pela fagocitose desses parasitos (ESCH; PETERSEN, 2013).

Já na célula hospedeira, o fagossomo contendo o parasito, se funde ao lisossomo, formando o fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo, rico em hidrolases e com pH de aproximadamente 5,0 (PELLISON, 2018). As promastigotas se diferenciam em amastigotas, que tem capacidade de evadir às respostas imunes hospedeiras e se replicam dentro do vacúolo até que ocorra a lise celular. Essas amastigotas liberadas são fagocitadas por novas células, aumentando o número de células infectadas no organismo (KAYE; SCOTT, 2011).

Durante um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo se alimenta dessas células parasitadas em animais reservatórios como roedores, marsupiais, cachorros ou mesmo humanos e, no intestino do inseto, as amastigotas ingeridas se diferenciam novamente em promastigotas procíclicas, que se dividem, migram e alcançam sua fase mais infectiva como promastigotas metacíclicas na proboscide do vetor, fechando assim o ciclo biológico (Figura 2) (BRUZA *et al.*, 2018).

Figura 2. Ciclo de vida da *Leishmania*. Adaptado de BRUZA *et. al.*, 2018. Representação do ciclo de vida do parasito em sua forma amastigota intracelular no hospedeiro mamífero (setas azuis) e em sua forma promastigota no inseto vetor (setas vermelhas).

1.1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As leishmanioses constituem um grupo de doenças com um espectro de manifestações clínicas, podendo se apresentar como Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) (PIGOTT *et al.*, 2014).

A LT está distribuída amplamente no planeta, é a forma clínica registrada com maior frequência, e somente no Brasil confirmaram-se mais de 35.000 casos entre 2008 e 2015. Esta é causada por diversas espécies do parasito e se caracteriza principalmente pelo surgimento de lesões no corpo, esse sintoma principal pode variar entre lesões nodulares ou ulcerativas, apresentando bordas elevadas com fundo granuloso. Essas variações de parasitos, apresentações das lesões e ainda resposta imune do hospedeiro dividem a LT em subgrupos: Leishmaniose cutânea localizada (LCL), Leishmaniose

cutânea disseminada (LCD) e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (MURRAY *et al.*, 2005; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Em casos de LCL aparecem lesões ulcerativas únicas, podendo ter cura espontânea (GOTO; LINDOSO, 2010). É a forma clínica de maior ocorrência e pode ser causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (REITHINGER *et al.*, 2007).

Já em casos de LCD as lesões são nodulares e surgem em diversas regiões do corpo oriundas da disseminação do parasito através de vias linfáticas, causada principalmente por *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica* e *L. amazonensis* (REITHINGER *et al.*, 2007). Apesar de não apresentar autocura espontânea, a LCD não oferece risco à vida aos pacientes, no entanto, o diagnóstico tardio, precário ou negligenciado leva ao aumento das lesões e a possibilidade de infecções bacterianas secundárias (GOTO; LINDOSO, 2010).

A LCM aparece nos meses seguintes ao primeiro episódio da lesão, tem aspecto metastático, de maneira que o parasito se dissemina da região inicial e alcança regiões de mucosa como nariz e boca, gerando úlceras altamente destrutivas (GOTO; LINDOSO, 2010). Produto de uma resposta imune exacerbada contra os parasitos, a LCM é causada na maior parte dos casos registrados por *L. braziliensis*, porém também há casos registrados de LCM com *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. major*, *L. tropica* e *L. amazonensis* (REITHINGER *et al.*, 2007).

A Leishmaniose Visceral (LV) é a manifestação sistêmica da doença e pode ser letal quando não tratada corretamente. Também conhecida como calazar, é causada no “Novo Mundo” pela *L. infantum* e no “Velho Mundo” pela *L. donovani* (REITHINGER *et al.*, 2007). Acomete principalmente órgãos linfoides, como linfonodos, baço e medula óssea, mas também alcança as células do fígado (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A relevância se dá principalmente pelos riscos da doença devido aos quadros de hepatoesplenomegalia, que serão discutidos a seguir.

1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL

Dentre as leishmanioses, a LV possui o maior índice de letalidade. Em casos não tratados, as mortes alcançam 98% em humanos. Outro fator de risco que vale ressaltar é que a doença, por ser uma antroponose, acomete também o cão doméstico (*Canis familiaris*), causando a Leishmaniose Visceral Canina (LVC). A LVC tem alta prevalência e, independente dos cães apresentarem ou não sintomas, são igualmente infecciosos para o vetor, sendo assim, considerada mais importante que a doença em humanos, do ponto de vista epidemiológico (CARNEIRO, 2016).

O cão é bastante relevante na manutenção do ciclo do parasito, sendo o principal reservatório da doença e, muitas vezes, estando ligado diretamente a ocorrência da infecção em humanos, precedendo os casos. A alta prevalência da LVC em áreas endêmicas para LV em humanos são fatores relevantes na escolha dos três tipos de ações determinadas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) no Brasil: diagnosticar e eliminar cães infectados assintomáticos ou sintomáticos, diagnóstico e tratamento precoce de indivíduos doentes e combate ao vetor em áreas onde há casos de LV em humanos (CARNEIRO, 2016).

Até recentemente, a LV era considerada uma doença de regiões rurais, porém, com a expansão urbana, a doença alcançou áreas peridomiciliares, chegando aos grandes centros urbanos. Outro fator relevante que levou a uma explosão de casos, principalmente na Europa, nos anos 90, foi o aumento da coinfeção de LV com HIV; o que também é um fator relacionado a reincidência da doença e a uma menor resposta ao tratamento (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Mulheres grávidas também são consideradas mais vulneráveis a doença, visto que alterações na resposta imune, como por exemplo mudanças para resposta Th2 relatadas durante a gravidez, levam a uma maior suscetibilidade (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Crianças em idade pré-escolar e indivíduos imunocomprometidos e desnutridos completam o grupo de maior risco.

1.2.1. EPIDEMIOLOGIA

A LV permanece endêmica em mais de 60 países (Figura 3), no entanto, a incidência global teve uma redução nos últimos anos. Os programas de comprometimento para eliminar a LV como um problema de saúde pública foram ferramentas essenciais nessa redução, principalmente em países onde os casos representavam altos percentuais nos números totais de casos mundiais, como Índia, Nepal e Bangladesh (BRUZA *et al.*, 2018). Alguns padrões epidemiológicos clínicos acabam por dificultar essa redução no número de casos, como por exemplo a coinfeção com o vírus HIV em 40% dos pacientes de LV na Etiópia.

Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL, 2006). O Brasil registra 90% dos casos de LV da América Latina, e entre 2003 e 2006 a doença apresentou uma média de 6,9% de letalidade (GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016).

Figura 3. Epidemiologia LV (OMS 2018). Mapa representativo dos países onde há casos de Leishmaniose. O número de casos em cada país é representado pela cor descrita na legenda.

A LV está distribuída em 22 unidades da federação brasileira e atinge as 5 regiões do país (figura 4A) (SVS-MS, 2017). Por muitos anos a LV era observada apenas em regiões rurais, mas a expansão da doença alcançou médios e grandes centros urbanos, com surtos já registrados no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL, 2006).

O número de casos anuais tem apresentado um aumento significativo nas últimas décadas (Figura 4B), mas acredita-se que, na realidade, o que tem acontecido é uma maior capacidade de se diagnosticar a doença de maneira correta, visto que anos atrás o diagnóstico era precário, além de ser facilmente confundido com outras doenças parasitárias.

Figura 4. Epidemiologia no Brasil (SVS-MS, 2017). Número de casos de Leishmaniose em cada estado brasileiro de acordo com as cores indicadas na legenda (A) e número de casos anuais registrados desde 1980 até 2017 (B).

1.2.2. RELEVÂNCIA CLÍNICA

O período de incubação da LV dura entre 2 e 6 meses e o aparecimento dos sintomas pode acontecer de maneira gradual, onde inicialmente surgem sintomas comuns em outras doenças, o que dificulta o diagnóstico, como por exemplo febre, fadiga e perda de apetite e peso. Posteriormente aparecem os sintomas mais graves e específicos como

aumento dos linfonodos (linfadenopatia), baço e fígado (quadros graves de hepatoesplenomegalia) (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Esse estado inflamatório que gera o aumento do baço é corroborado com a destruição periférica dos eritrócitos, levando ao aumento da fraqueza e da fadiga devido a anemia persistente. Em pacientes com LV, a resposta das células T aos antígenos juntamente com a produção de IL-10 estão diretamente associadas a incapacidade de controlar a doença (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Os tratamentos ainda têm uma eficiência alta e o controle de disseminação da doença é um desafio mundial. Os obstáculos começam já no diagnóstico, visto que os sintomas iniciais são negligenciados ou muitas vezes confundidos, impedindo a identificação precoce da doença. E, mesmo em casos onde se levanta a suspeita de LV, as técnicas de maior sensibilidade muitas vezes não estão disponíveis em regiões endêmicas, com menos recursos, visto que demandam equipamentos complexos e equipes com mais experiência (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012).

O diagnóstico padrão “ouro” ainda é o parasitológico direto. Apesar de ser uma técnica com metodologia simples de isolamento e cultivo *in vitro* desse parasito para detecção em microscópio, o procedimento de coleta demanda um profissional experiente e não é indicado que se realize fora de um hospital especializado, além de ser bastante invasivo e arriscado, visto que depende de aspirados de medula óssea, baço, linfonodo e/ou fígado (MURRAY *et al.*, 2005; SNIGH, 2006).

Pacientes com LV apresentam ainda uma resposta imune humoral antes da resposta de células T (BURNS *et al.*, 1993), favorecendo o diagnóstico sorológico em pacientes imunocompetentes. O Ministério da Saúde recomenda a utilização de ensaios imunoenzimáticos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) e de Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI), esse último disponível no Sistema Único de Saúde (SUS). No entanto, deve-se ter cuidado com reações cruzadas em casos de tuberculose, malária, doença de Chagas, hanseníase e outras leishmanioses (SUNDAR; RAI, 2002). Outro fator negativo é que em pacientes imunossuprimidos e assintomáticos o diagnóstico pode não ser eficiente, apresentando um falso negativo (GONTIJO; MELO, 2004; CARRILO; MORENO, 2009).

Os diagnósticos moleculares são mais recentes e ainda vem sendo aprimorados. Se destaca a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e todas as suas variações (PCR

multiplex, PCR tempo real, PCR quantitativo) (CUPOLILLO, 2005). As vantagens de se utilizar técnicas de biologia molecular são diversas, mas a sensibilidade do ensaio é a principal delas. Essas reações são capazes de detectar quantidades mínimas de DNA ou RNA alvo nas amostras clínicas (por ex.: sangue, soro e urina). O curto intervalo de tempo, a confiabilidade do resultado e a coleta de maneira menos invasiva são destaques da metodologia. As desvantagens aparecem quando mencionamos a necessidade de um termociclador, reagentes de alto custo e ainda a síntese de *primers* específicos para as diversas cepas, quando se faz necessário distinguir a espécie dos parasitos (DA SILVA *et al.*, 2003).

O número de casos de LV vem aumentando muito. Os motivos são diversos, como por exemplo, a falta de vacinas, o aumento do número de parasitos resistentes a quimioterapia utilizada, a dificuldade no controle dos vetores, entre outros. Os tratamentos também possuem fatores limitantes como toxicidade, dificuldade de administração, longa duração e preços proibitivos (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012).

Os resultados mais positivos se mostram com as combinações de medicamentos (ALVAR *et al.*, 2006; SUNDAR *et al.*, 2011). Os antimonias pentavalentes têm sido a alternativa mais recomendada para o tratamento das Leishmanioses, no entanto a hospitalização e o monitoramento do paciente são necessários devido ao alto índice de efeitos colaterais graves decorrente da medicação (MATOUSSI *et al.*, 2007; ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004).

Tentativas de formulações que melhorem o *delivery* dos antimoniais têm sido investigadas juntamente com o uso alternativo de um antifúngico sistêmico que também é um leishmanicida altamente ativo (desoxicolato de anfotericina B), como forma de burlar a resistência aos antimoniais (ROBERTS *et al.*, 2003). A descoberta da miltefosina é mais recente, sendo o primeiro antileishmanial com tratamento oral eficaz contra a LV (BHATTACHARYA *et al.*, 2004), no entanto é altamente teratogênico (SUNDAR, 2007).

Terapias combinadas são consideravelmente mais eficientes, principalmente no tratamento de infecções por LV resistentes, todavia, as dificuldades para adequar a administração em regiões pouco desenvolvidas, a toxicidade e a resistência dos parasitos acumulada com o tempo para as terapias existentes atualmente são indicativos de urgência para a descoberta de novos fármacos destinados a pacientes com LV (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012).

1.2.3. MODELOS DE ESTUDOS

Quando se trata de modelos animais para o estudo da Leishmaniose Cutânea por exemplo, os camundongos possuem padrões excelentes para avaliação da doença, das lesões e de possíveis tratamentos. Os camundongos com *background* genético C57BL/6 são ferramentas valiosas hoje em dia, devido às várias possibilidades para o estudo de diversas vias. Um exemplo é o estudo de Lima-Júnior e colaboradores, 2013, que mostra um comparativo das lesões dérmicas causadas por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 selvagem e camundongos C57BL/6 com genes deletados (Pycard, Caspase-1 e NLRP3).

O uso de modelos animais para o estudo da LV é outro fator crítico. A infecção de camundongos não reproduz tão fielmente os quadros clínicos observados em humanos. Os experimentos precisam ser feitos em camundongos jovens e, ainda assim, após poucas semanas, o animal é capaz de montar uma resposta imune celular possibilitando controlar a infecção (MELBY *et al.*, 2001).

Visto que, em seus hospedeiros os parasitos são controlados por células T do baço produtoras de INF-gama que, por sua vez, regula positivamente a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NO-sintase induzida), levando a geração de NO, resultando em um mecanismo efetor crítico no controle da replicação dos parasitos por macrófagos. O uso de hamsters como modelo animal de infecção para LV se mostrou mais vantajoso quando se trata da observação de características clínico-patológicas, já que apresentam um aumento da carga parasitária visceral, além de outros sintomas clínicos como hepatoesplenomegalia, caquexia e leva a morte (MELBY *et al.*, 2001).

Melby e colaboradores, 2001, mostram que o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) quando infectado por *L. donovani* apresenta uma replicação descontrolada do parasito, com uma forte resposta Th1 e ausência da RNAm da iNOS, contrário ao que se observa em camundongos infectados, que é a alta da atividade enzimática de iNOS. Sugerem que por esse motivo, os hamsters reproduzam melhor as características clínico-patológicas da LV humana.

No entanto, os estudos em hamsters são limitados pela falta de reagentes imunológicos disponíveis, além da dificuldade de se encontrar ferramentas genéticas abrangentes, como em camundongos. Assim, estabelecer um modelo de infecção mais eficientes em murinos é essencial para o estudo da doença.

Além da problemática acerca do modelo animal para LV, há ainda uma variedade de protocolos e metodologias distintas, encontradas na literatura, para a execução de protocolos de infecção dos animais (MELBY *et al.*, 2001). Essa diversidade de protocolos existentes para a infecção de camundongos com cepas capazes de causar LV, gera um conflito na validação de informações. As metodologias variam desde a fase em que a cepa é utilizada até a quantidade do inóculo de parasitos feito no animal, como por exemplo 3×10^7 amastigotas (NICO *et al.*, 2018), 10^7 promastigotas procíclicas (CRAFT *et al.*, 2014), 2×10^6 metacíclicas (ROMANO *et al.*, 2015). Soma-se ainda variações quanto a via de inoculação do parasito, que aparece algumas vezes como intravenosa (IV), outras intradérmica (ID), além da intraperitoneal (IP) (ROMANO *et al.*, 2015; CAJUEIRO *et al.*, 2017).

1.3. VIAS DE INFECÇÃO

Quando se fala em Leishmanioses, é evidente que o modelo ideal para estudo onde se faz necessária a infecção é com o uso do inseto vetor, principalmente por todas as variáveis existentes durante o repasto sanguíneo, como a saliva do flebotômico e todos os imunoreguladores presentes. Todavia os riscos de se manter os insetos infectados são altíssimos e podem atingir desde o experimentador, até mesmo a comunidade local em casos de evasão do inseto.

Por esse motivo, outras condições experimentais são utilizadas em laboratório e a inoculação por vias de administração é bastante comum atualmente. Alguns grupos de pesquisa tentam simular os componentes existentes durante o repasto sanguíneo, além do parasito (ROGERS *et al.*, 2010), a fim de reduzir as dificuldades geradas pelo não uso do inseto. Outros grupos apostam que a purificação dos parasitos, selecionando apenas promastigotas metacíclicas altamente infectivas são suficientes para potencializar a infecção experimental (LIRA *et al.*, 1998).

A escolha da via de inoculação é bastante relevante visto que apesar da via intravenosa ser altamente infectiva, apresentando cargas parasitárias mais altas e mais duradouras, a fuga ao que acontece fisiologicamente é ainda maior, quando se avalia que não é natural a presença de promastigotas circulantes no sangue. Dessa forma, a escolha de outras vias de infecção, como por exemplo intradérmica e intraperitoneal se afastam menos da real situação fisiológica da doença.

2. JUSTIFICATIVA

Ainda há na literatura uma grande discussão sobre como investigar a LV de maneira padronizada e reprodutível. Ao passo que as infecções para avaliação da Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea estão bem estabelecidas e padronizadas, as infecções para avaliar a LV seguem com variações que podem gerar divergência de dados, dificultando o progresso e se distanciando da possibilidade de encontrar modelo ideal para estudos de novos tratamentos, por exemplo.

A maioria dos estudos *in vivo* são realizados em hamsters, o que reduz drasticamente as ferramentas favoráveis existentes hoje com o uso de camundongos. No entanto, as infecções em camundongos não se estabelecem da mesma maneira, os camundongos com *background* genético C57BL/6, por exemplo, apresentam autocura na maior parte das vezes. Dessa maneira, selecionar uma cepa com maior potencial de infecção e definir um modelo onde a LV é capaz de se estabelecer nesse animal é extremamente importante para possibilitar estudos acerca dos mecanismos de patogênese e resposta do hospedeiro durante a LV.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um modelo de infecção *in vivo* em camundongos em fundo genético C57BL/6 para o estudo da Leishmaniose Visceral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Comparar diferentes isolados clínicos de cepas capazes de causar Leishmaniose Visceral para identificar a melhor cepa para infecção em macrófagos.

II. Validar a cepa com maior potencial infectivo para estabelecer um modelo de infecção visceral *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6.

III. Gerar parasitos repórter (da cepa selecionada em II) para que possam ser utilizados para quantificação da infecção de macrófagos e *in vivo*.

IV. Comprovar a funcionalidade do modelo de infecção visceral utilizando animais geneticamente modificados que apresentam diferentes susceptibilidades à infecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CULTIVO DE LEISHMANIAS SPP.

Durante a execução desse trabalho foram utilizadas três diferentes linhagens de *Leishmanias*: cepa NCL (MHOM/BR/1972/LD, *Leishmania infantum* proveniente do ICB-USP), cepa Pp75 (MHOM/BR/1974/PP75, *Leishmania infantum* proveniente do IOC-Fiocruz/RJ) e cepa LV9 (MHOM/IN/80/DD8, *Leishmania donovani* proveniente do IOC-Fiocruz/RJ). As linhagens celulares de *Leishmania spp* foram cultivadas em meio Schneider ou Meio 199 (Gibco), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Sigma), e 0,025% de bioppterina (Sigma). Os parasitos foram rotineiramente cultivados em garrafas de cultura estéreis (Corning) e contados diariamente para que fosse identificado o tempo necessário para alcançarem sua fase estacionária, bem como para comparar em que tipo de meio esses parasitos se replicavam melhor. Além disso, os parasitos eram sempre utilizados com no máximo 6 passagens de cultivo (repiques), reduzindo assim a perda de virulência causada pelo alto número de passagens. Ao atingir esse número máximo de repiques, uma nova alíquota era descongelada, proveniente de um mesmo estoque que, por sua vez, veio de um animal infectado para a manutenção da virulência.

4.2. ANIMAIS

4.2.1. USO DE ANIMAIS C57BL/6 SELVAGENS

O uso de todos os animais durante esse trabalho esteve em concordância com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - registro nº 019/2019). Os animais C57BL/6 selvagens foram provenientes do Biotério Central da FMRP-USP, tinham entre 5 e 9 semanas de idade e eram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos no Prédio Central da FMRP-USP. Esses animais eram mantidos em microisoladores, com ciclo claro-escuro a cada 12 horas, temperatura mantida entre 22 e 25°C e recebiam água e ração *ad libitum*.

4.2.2. GERAÇÃO DE ANIMAIS NLRP3 KO EM *LITTERMATE* CONTROL

Animais C57BL/6 com o gene do inflamassoma de NLRP3 deletado (NLRP3^{-/-}) provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CCCE/FMRP) e animais C57BL/6 *WT* (*wildtype*) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto foram transferidos para o Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em concordância com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - registro nº 019/2019). Esses animais foram acasalados para que a primeira ninhada toda fosse heterozigota (NLRP3^{+/-}). Após 21 dias esses animais foram desmamados e separados, e após 8 semanas do nascimento foram montados novos casais NLRP3^{+/-} x NLRP3^{+/-}. Na segunda ninhada todos os animais foram *screenados* e os 3 genótipos foram encontrados entre os filhotes (NLRP3^{+/-}, NLRP3^{-/-} e NLRP3^{+/+}). Animais da mesma ninhada foram direcionados para os experimentos, evitando viés experimental de genótipos diferentes provenientes de biotérios distintos. Todos os animais eram mantidos em microisoladores, com ciclo claro-escuro a cada 12 horas, temperatura mantida entre 22 e 25°C e recebiam água e ração *ad libitum*.

4.3. CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Animais C57BL/6 selvagens foram eutanasiados e tiveram seus fêmures e tíbias cuidadosamente removidos. Os ossos extraídos desses animais foram lavados com álcool 70% e posteriormente banhados em PBS (Tampão Fosfato-Salino, do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*) estéril (Gibco); as extremidades desses ossos foram seccionadas e sua medula interior foi retirada com auxílio de uma seringa com agulha, lavando o osso com meio RPMI 1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco). As células recém colhidas foram diluídas em meio R20/30, o qual consiste em meio RPMI 1640 enriquecido com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina e 30% de sobrenadante de células de linhagem L929, que liberam fatores capazes de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos, na proporção de 30 mL para cada fêmur e 20 mL para cada tíbia. Foram adicionados 10 mL da mistura homogênea (R20/30 e medula)

em placas de Petri não tratadas (100 mm x 20mm) (Corning) e, em seguida, encubadas em uma estufa a 37°C injetada com 5% de CO₂. As células receberam mais 10 mL de R20/30 após 4 dias, completando sua diferenciação no 7º dia com os macrófagos aderidos ao fundo da placa.

No 7º dia os macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs, do inglês, *bone marrow-derived macrophages*) eram soltos utilizando protocolo de choque térmico, de maneira que, cada placa tinha seus sobrenadante cuidadosamente aspirado e então adicionava-se 5 mL de PBS estéril (Gibco) pré-aquecido (37°) para lavar e remover apenas as células não aderidas. Então, apenas com os macrófagos aderidos à placa, adicionou-se 10 mL de PBS estéril gelado; as placas foram levadas à geladeira por 10 minutos, em seguida mantidas em temperatura ambiente por mais 5 minutos. As células foram soltas por lavagens com auxílio de um pipetador, em seguida o volume total foi centrifugado a 200 x g por 5 minutos. O *pellet* de macrófagos foi ressuspensionado em meio R10 (meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de L-glutamina) e contados em uma câmara de Neubauer para serem utilizados.

4.4. PURIFICAÇÃO DE CULTURAS DE LEISHMANIAS

As *Leishmanias spp* foram cultivadas em garrafa estéril encubadas a 25°C em estufas do tipo BOD (demanda biológica de oxigênio). Após alguns dias, ao entrar em fase estacionária a cultura de parasitos foi submetida à diferentes protocolos de centrifugação para que fossem purificadas e utilizadas em infecções posteriores.

4.4.1. CULTURA DE FASE ESTACIONÁRIA

A cultura estacionada foi centrifugada a 130 x g por 3 minutos para que as *Leishmanias* em processo de divisão, que se aglomeram em rosetas, fossem precipitadas. O sobrenadante foi então centrifugado a 3200 x g por 10 minutos, concentrando no *pellet* toda a cultura restante, ou seja, promastigotas procíclicas e metacíclicas.

4.4.2. CULTURA ENRIQUECIDA DE METACICLICAS

Diferente da Cultura de Fase Estacionária que separam apenas rosetas do restante dos parasitos, a Cultura Enriquecida de Metacíclicas (MEC) possui uma centrifugação intermediária para reduzir a concentração de promastigotas procíclicas no produto final. Assim foi feita a primeira centrifugação de 130 x g por 3 minutos, uma segunda centrifugação de 1250 x g por 5 minutos que precipitou parte das promastigotas procíclicas e, por fim, a centrifugação final do sobrenadante da etapa anterior à 3200 x g por 10 minutos que gerou um concentrado de promastigotas metacíclicas já que, por serem mais leves, ficam em suspensão durante a segunda centrifugação.

4.4.3. METACICLICAS PURIFICADAS

O protocolo para obtenção de MEC reduz a concentração de promastigotas procíclicas, porém, um maior nível de purificação dessas metacíclicas é alcançado com um protocolo de purificação que utiliza um gradiente de Ficoll. Assim, utilizou-se um falcon de 15 mL, separado em 3 fases: 2 mL de Ficoll 40%, 2 mL de Ficoll 10% e, por último, 2 mL da cultura total em uma concentração de 10^9 parasitos. Esse falcon foi então centrifugado a 360 x g por 15 minutos, gerando uma nuvem intermediária que contém os parasitos purificados. Essa nuvem foi colhida com o auxílio de uma pipeta, lavada com PBS estéril para a remoção do Ficoll residual e os parasitos foram contados em uma câmara de Neubauer. No entanto, o baixo rendimento desses parasitos puros (aproximadamente 0,1% do total) não favoreceu o uso do protocolo.

4.5. INFECÇÃO DE BMDMs

Os macrófagos cultivados como descrito em 4.3 foram plaqueados em contagens de 5×10^4 células por poço quando utilizadas placas de 96 poços (Corning) e 2×10^5 células por poço em placas de 24 poços (Corning) com lamínulas redondas de 13 milímetros no fundo. Em seguida esses macrófagos foram infectados com as *Leishmanias*, previamente contadas, com diversas taxas infecção de parasitos por célula (MOI, do inglês *Multiplicity of Infection*), por exemplo MOI 5 foram colocados 5 parasitos para cada célula ou MOI 10 onde foram colocados 10 parasitos para cada célula.

Esses parasitos foram incubados a 33 ou 36°C durante 3 horas junto aos macrófagos para que fossem fagocitados. Em seguida todas as condições eram lavadas para a remoção dos parasitos residuais e recebiam meio R10, sendo mantidas na incubadora até cada *timepoint* de interesse.

4.6. COLORAÇÃO DE PARASITOS PARA MICROSCOPIA

Para análises de taxa de infecção *in vitro* as células plaqueadas e infectadas em lamínulas, foram fixadas e coradas seguindo o protocolo do uso do kit de panótico rápido (Laborclin). Em seguida foram lavadas com PBS e montadas em lâminas de 26 x 76mm. Essas lâminas foram observadas em microscópio óptico para contagem de 100 células por replicata, avaliando o número de células infectadas e quantas amastigotas por célula.

4.7. LEITURA DE LUMINESCÊNCIA

As células cultivadas em placas de 96 poços opacas (Corning) foram infectadas com cepas geneticamente modificadas que expressam a enzima Luciferase. Nos *timepoints* definidos foi adicionado o kit OneGlo (Promega) que contém o substrato necessário para a quantificação de luminescência por espectrofotometro (Spectra L). Sendo assim outra ferramenta para quantificação dos índices de infecção.

4.8. INFEÇÃO DE CAMUNDONGOS

Após contagem dos parasitos purificados, estes foram ressuspensos em PBS estéril para infecção dos animais. Camundongos C57BL/6, com 5 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da FMRP-USP, foram transferidos para o biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos no Prédio Central da FMRP-USP. Esses animais permaneceram em adaptação nesse biotério por uma semana e todos os animais foram infectados com 6 semanas de idade.

4.8.1. INFECÇÃO INTRAPERITONEAL

Os parasitos de interesse para cada ensaio foram ressuspensos em PBS estéril de maneira que a concentração determinada era calculada para que fosse injetado 100 uL intraperitonealmente em cada animal e o número de parasitos foi determinado a cada ensaio.

4.8.2. INFECÇÃO INTRADÉRMICA

Os parasitos de interesse para cada ensaio foram ressuspensos em PBS estéril de maneira que a concentração determinada era calculada para que fosse injetado 15 uL na orelha esquerda de cada animal e o número de parasitos foi determinado a cada ensaio.

4.9. QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA POR ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE

Após o tempo determinado de infecção, os camundongos foram eutanasiados para a coleta do baço e do fígado, órgãos alvo da Leishmaniose Visceral. Após coleta, os órgãos foram lavados em álcool 70% e em seguida em PBS estéril, e transferidos para pacas de 6 poços (Corning) contendo 5 mL de meio Schneider. Com o auxílio do êmbolo estéril de uma seringa de 5 mL foram macerados para desestruturação do tecido e liberação das amastigotas intracelulares, o volume foi transferido para um falcon contendo um Cell Strainer de 70 nm (Falcon), os poços foram lavados com mais 5 mL de Schneider, seguindo para as etapas de centrifugação. A primeira centrifugação foi de 130 x g por 10 minutos, para separar hemácias e tecidos restantes. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 3200 x g por 15 minutos para coleta das amastigotas.

O pellet foi ressuspendido em Schneider completo; 600 uL para cada amostra do baço e 400 uL para cada amostra do fígado, e metade do volume total foi colocado em cada poço da duplicata montada em placas de 96 poços (Corning). Para o fígado a diluição foi de 1:10 e para o baço, 1:3.

As placas foram vedadas e encubadas a 25°C em estufa do tipo BOD durante 10 dias até que as amastigotas se diferenciasssem em promastigotas para serem analisadas no microscópio, permitindo assim a quantificação da carga parasitária.

4.10. CONSTRUÇÃO DA CEPA COM VETOR TdTOMATO

Em colaboração com o Laboratório da Professora Ângela Cruz, foi realizada a construção da cepa *L. infantum* NCL TdTomato. O plasmídeo pSSUneoTdTOMATO (BEATTIE *et al.*, 2010) foi linearizado com as enzimas *PacI* e *PmeI* (New England Biolabs). Cerca de 5 µg de DNA linearizado foram utilizados para transfectar *L. infantum* NCL, seguindo protocolo abordado por Lorenzon, 2020. Por homologia de sequência, a construção é direcionada para o *locus* que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal (18S), sob controle de promotor de RNA polimerase I (transcrição constitutiva). Os transfectantes foram selecionados em meio 199 (Sigma) sólido, contendo 30 µg/mL de G418.

4.11. ANÁLISE DO PERFIL DE CÉLULAS INFECTADAS

4.11.1. MARCAÇÕES EXTRA CELULARES

Uma *gate* inicial foi realizada em células vivas através do anticorpo Live/Dead Pacific blue. Em seguida, a marcação de leucócitos totais foi utilizada através do anticorpo CD45 APCcy7. Foram realizadas as seguintes marcações extracelulares para caracterização de células mieloides: células dendríticas foram caracterizadas como CD45+CD11c+/- MHC-II+ utilizando os anticorpos CD11c PECY7 e MHC-II FITC. Neutrófilos (CD45+Ly6C+CD11b+) foram caracterizados utilizando os marcadores Ly6G+Percp CD11b+FITC. Monócitos: Ly6C PE e CD11b FITC; Macrófagos F4/80+CD11b+ ou F4/80+CD11b- foram marcados com os anticorpos para F4/80 APC e CD11b FITC.

4.11.2. PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Cerca de 1×10^6 células isoladas do fígado e baço de animais infectados foram incubadas a 4°C por 20 minutos com FcBlock, diluído 1:1000. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais descritos acima, durante 20 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas com 2 mL de tampão PBS contendo 2% SBF, seguindo-se fixação com solução tamponada contendo 1% de formol. As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCantoTMII (BD, San José, CA, USA), no qual foram coletados, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. Inicialmente, foi selecionada uma região para exclusão das células aderidas entre si, processo conhecido como exclusão de *doublets*. As células foram avaliadas dentro de células vivas utilizando o marcador Live/dead (Pacific blue). Em seguida, foram avaliadas por tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade de fluorescência. Para isso, as células foram selecionadas pelos parâmetros de FSC-A (área) e FSC-H (altura). Após excluídos os doublets, foram utilizados os parâmetros de FSC-A e SSC-A, para selecionar região correspondente às células mieloides. Em seguida, realizamos as *gates* para cada subtipo celular conforme descrito acima.

4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa Prism 8 (GraphPad Software, versão 8.0). Os valores apresentam sempre suas medianas e desvios padrão obtidos em cada condição. Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e todos os experimentos *in vivo* tinham um n experimental maior que 4 animais. Os valores foram analisados com o teste *Two-way* ANOVA e intervalos de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de modelos animais têm sido uma importante ferramenta no estudo de doenças infecciosas. Estes modelos animais possibilitam estudos sobre a patofisiologia de doenças, bem como estudos sobre os aspectos imunológicos em uma relação patógeno-hospedeiro. Dentre os modelos animais disponíveis para estudos, os camundongos são os mais amplamente utilizados, visto que a similaridade genética entre camundongos e seres humanos permitem o entendimento da doença *in vivo*. Essa funcionalidade parte desde um entendimento das vias envolvidas na infecção, de maneira microscópica, sabendo diretamente quais mecanismos celulares são afetados, até a forma macroscópica, entendendo a fisiologia e as manifestações clínicas da doença.

Estudos experimentais para leishmaniose têm sido conduzidos em diversos modelos animais (como camundongos, hamsters, cães e primatas) (SACKS; MELBY, 2001). Visto que as leishmanioses são caracterizadas por uma complexidade de manifestações clínicas, que variam de lesões ulcerativas na pele a alterações em órgãos viscerais (HANDMAN, 2001), dependendo da espécie infectante, a escolha de modelos animais e vias de infecção adequadas de modo que representem a imunopatologia da doença que se assemelhe à desenvolvida por seres humanos deve ser feito com cautela.

Embora os modelos animais para leishmaniose exibam diversas vantagens, nenhum deles ainda reproduz completamente a infecção em humanos. Os camundongos, por exemplo, são animais resistentes à LV, gerando uma dificuldade no estabelecimento de um modelo padronizado de infecção para avaliação da patogenicidade. Dentre os fatores que contribuem para essas diferenças na infecção de humanos e animais, pode-se destacar o tamanho e natureza do inóculo, vias de infecção e cepas tanto do hospedeiro, quanto do parasito (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Muitas vezes, a utilização da via intravenosa se deve ao fato da infecção se instalar com maior carga parasitária, alcançando os órgãos alvo com menor perda dos parasitos, porém, como já mencionado, o modelo acaba sendo o que mais se afasta das tentativas de simular a fisiologia da doença, quando se inocula promastigotas livres na corrente sanguínea. Dessa forma, a seleção de uma cepa com alto potencial de infecção é crucial para dar início a padronização e, posteriormente, estabelecimento de um bom modelo de infecção de camundongos com cepas capazes de causar LV por outras vias de infecção.

A LV é principalmente associada à *L. donovani* em infecção no Velho Mundo e *L. infantum* no Novo Mundo (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Sendo assim, para o desenvolvimento deste estudo, nós lançamos mão do uso de três cepas de *Leishmania* capazes de causar LV, e conhecidas por apresentarem um potencial de virulência. A cepa de *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8), aqui denominada como LV9, é proveniente do banco de células da Fiocruz do Rio de Janeiro. Outras cepas utilizadas foram de *L. infantum*, a cepa denominada Pp75 (MHOM/BR/1974/PP75) também proveniente do banco de células da Fiocruz do Rio de Janeiro, enquanto a cepa denominada NCL (MHOM/BR;1972/LD) proveniente do banco de células do Instituto de Ciências Biológicas da USP.

5.1. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE VIRULÊNCIA IN VITRO

As etapas iniciais para a seleção de uma cepa de *Leishmania* com alta capacidade de infecção ocorreram através da avaliação do potencial de infecção dos parasitos *in vitro*, sempre mantendo as mesmas condições experimentais descritas em cada ensaio para todas as cepas durante a execução dos experimentos. A utilização de BMDMs como célula hospedeiras, nos permite observar a internalização e a replicação desses parasitos, bem como o comportamento dessas células frente a infecção. A obtenção desses BMDM seguiu protocolos previamente descritos por Zamboni e Rabinovitch, 2003, e o uso dessas células no estudo de leishmanioses também já é bem elucidado (ZAULI-NASCIMENTO *et al.*, 2010).

5.1.1. ENSAIO REPLICATIVO INTRACELULAR

Inicialmente, determinou-se a cepa com melhor potencial de infecção de BMDMs. Para isso, foi realizado o ensaio de *killing*, de maneira que foram avaliados o tempo inicial de entrada dos parasitos (3 horas após a infecção) e dois tempos tardios para observação da replicação e andamento da infecção (24 e 48 horas após a infecção). O uso desse ensaio de contagem de macrófagos infectados e do número de amastigotas por célula já é bem estabelecido e funcional para diversas espécies de *Leishmania* (DE CARVALHO *et al.*, 2019), para *Leishmania amazonensis*, por exemplo, o ensaio é uma das melhores

ferramentas para avaliação da infecção intracelular, seja por contagem em microscopia óptica utilizando a coloração de Giemsa, ou por outras técnicas, como citometria, microscopia de fluorescência ou luminescência (DE CARVALHO *et al.*, 2019; PALOQUE *et al.*, 2013).

Hospedeiros mamíferos são naturalmente infectados por promastigotas metacíclicas de *Leishmania*. O processo de metaciclogênese ocorre no inseto vetor (diferenciação de promastigota procíclica à metacíclica), mas pode ser reproduzido em laboratório por meio do cultivo dos parasitos em meio líquido e isolamento de metacíclicas através de um protocolo de densidade, o qual resulta em uma alta pureza de metacíclicos porém com baixo rendimento em número de parasitos (YAO; WILSON, 2016). Sendo assim, muitos estudos feitos para avaliar a infecção *in vitro* de células hospedeiras por *Leishmania* utilizam promastigotas em fase estacionária do crescimento para infecção de macrófagos, porém devido à variações de fases de crescimento do parasito em cultura, decidimos adotar (e posteriormente comparar com metacíclicas) o uso de uma cultura enriquecida com metacíclicos (MEC). Essa cultura é obtida através de diferentes passos de centrifugações e foi desenvolvida no Laboratório de Leishmanioses (ICB-USP).

Sendo assim, as células foram incubadas com os parasitos à uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5 parasitos por célula e a infecção ocorreu a 33°C; todas as cepas foram avaliadas paralelamente, sob os mesmos protocolos de purificação para obtenção de MEC e mesmas condições experimentais (Figura 5). Assim, após a contagem do número de células infectadas em cada triplica experimental (Figura 5A) e do número de amastigotas por célula (Figura 5B) observamos o comportamento de infecção de BMDMs pelas cepas em estudo. É possível observar que a cepa NCL apresenta um número maior de células infectadas em todos os tempos avaliados, no entanto a cepa LV9 apresenta mais amastigotas por célula no tempo inicial de internalização quando comparado com as demais. Um outro fator relevante é evidenciado quando avaliamos os demais tempos de infecção, mostrando que apesar de apresentar mais amastigotas por célula, essa cepa LV9 é mais rapidamente controlada pela célula hospedeira quando comparada com a cepa NCL. Assim, avaliando a infecção *in vitro* com as três diferentes cepas é possível identificar a NCL como mais infectiva e menos controlada. Esse resultado está de acordo com o observado por Frank e colaboradores, 2015, que

demonstra uma eliminação do parasito intracelular. Esse controle pode ser explicado por uma participação da autofagia na imunidade inata, sugerindo um mecanismo de neutralização no início da infecção, dependente da fosforilação de MTOR e uma eliminação das amastigotas intracelulares na fase final da infecção, via autofagia em BMDMs.

Figura 5. Quantificação comparativa da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9 na proporção de cinco parasitos para cada célula. Após 3, 24 e 48 horas de infecção, os macrófagos infectados foram fixados e corados com o uso do kit Panótico); os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. Após a contagem e análise no microscópio foi possível identificar o (A) percentual de células infectadas e o (B) número de amastigotas em cada célula. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; *= $p < 0,05$.

5.1.2. ENSAIO REPLICATIVO INTRACELULAR COM CEPAS LUMINESCENTES

A aplicação de genes repórter em micro-organismos vem sendo usada como importante ferramenta em pesquisas, uma vez que diminui as contagens laboriosas por microscopia óptica e reduzem as variações associados ao observador (ROCHA *et al.*, 2013). Estes micro-organismos podem ser utilizados em diversos ensaios como contagem automatizadas, identificação de células infectadas por tais micro-organismos, dentre outras aplicações. Sendo assim, ainda na tentativa de comprovar a diferença de infecção *in vitro*, realizamos infecção de BMDMs com as mesmas cepas citadas anteriormente, porém expressando vetores de luminescência. Entretanto, neste ensaio as células foram

infectadas utilizando MEC em dois diferentes MOIs (3 e 6). Adicionalmente, foi realizada ainda a padronização da concentração a ser utilizada do kit para leitura de luminescência (OneGlo - Promega).

Paloque e colaboradores, 2013 já haviam demonstrado o uso da técnica de bioluminescência na quantificação de promastigotas, durante um *screening* de novos fármacos. Quando se fala de amastigotas intracelulares, os resultados são ainda mais interessantes, visto que é possível lisar as células hospedeiras e quantificar o número de parasitos existentes utilizando um espectrofotômetro, desde que esses parasitos estejam expressando a luciferase e seja fornecida a luciferina (SHARMA *et al.*, 2019). Essa técnica de bioluminescência em parasitos possibilita ainda o acompanhamento do curso da infecção *in vivo*, e, dessa maneira, poderíamos avaliar a progressão da doença ao longo do tempo, bem como órgãos afetados.

Assim, infectamos BMDMs com as cepas bioluminescentes e incubamos a 33°C. Após 3 horas de infecção todas as condições foram lavadas, as placas para leitura do tempo inicial para internalização dos parasitos foram encubadas durante uma hora com três concentrações distintas do kit OneGlo (10%, 25% e 50%) (Figura 6). A cepa Pp 75 (Figura 6A) apresentou baixa detecção mesmo em concentrações mais altas do kit de leitura e com MOI 6, não ultrapassando 2×10^4 unidades de luminescência (U de luminescência), indicando baixo número de parasitos. A cepa LV9 (Figura 6B) se mostrou mais eficiente que a Pp75, em analogia ao que vimos no ensaio anterior por Giemsa (Figura 5B) quando analisamos o número de amastigotas por célula.

Um resultado bastante relevante ressaltou um maior potencial da cepa NCL (Figura 6C) na infecção de BMDMs quando comparada com as demais cepas em estudo. Ultrapassando 8×10^7 U de luminescência quando utilizamos 50% do kit OneGlo em amostras infectadas com MOI 6.

Figura 6. Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9 e padronização do uso do kit para luminômetro após três horas de infecção. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com as cepas (A) *L. infantum* Pp75, (B) *L. donovani* LV9 e (C) *L. infantum* NCL na proporção de três ou seis parasitos para cada célula. Após três horas foram lisados com o kit OneGlo para quantificar a carga parasitária no espectrofotômetro já que os parasitos expressavam o vetor de luminescência constitutivamente; os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$.

As leituras de luminescência foram ainda realizadas nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção (Figuras 7 e 8, respectivamente), observamos que a cepa NCL (Figura 7C e 8C) se manteve com taxas de U de luminescência mais altas que a cepa Pp75 (Figura 7A e 8A) e LV9 (Figura 7B e 8B). Porém, em concordância com o observado no ensaio de *killing* por Giemsa (Figura 5), os parasitos foram fagocitados e com o passar do tempo foram controlados pela célula hospedeira. Ademais, para as cepas Pp75 e LV9 o kit OneGlo não foi capaz de diferenciar as infecções realizadas em dois MOIs distintos, mesmo em concentrações mais altas do kit (Figura 7A, 7B, 8A, 8B). No caso da cepa NCL, a concentração de 10% do kit OneGlo também não nos permitiu diferenciar infecções feitas com MOIs de 3 e 6 no tempo de 24h após infecção, inviabilizando o uso nesta concentração. Por outro lado, as concentrações de 25 e 50% do kit OneGlo permitiram a diferenciação das MOIs utilizadas nos tempos de 24 e 48h (Figura 7C e 8C). Além desses dados, identificamos que para a MOI mais baixa, é possível utilizar a concentração do kit em até 25%, no entanto, para MOIs mais altos é necessário o uso da concentração de 50%, conforme recomendação do fabricante. A concentração de 10% foi descartada devido à alta perda de dados comparativos.

Figura 7. Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9 e padronização do uso do kit para luminômetro após vinte e quatro horas de infecção. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com as cepas (A) *L. infantum* Pp75, (B) *L. donovani* LV9 e (C) *L. infantum* NCL na proporção de três ou seis parasitos para cada célula, após vinte e quatro horas foram lisados com o kit OneGlo para quantificar a carga parasitária no espectrofotômetro já que os parasitos expressavam o vetor de luminescência constitutivamente; os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$.

Figura 8.: Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9 e padronização do uso do kit para luminômetro após quarenta e oito horas de infecção. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com as cepas (A) *L. infantum* Pp75, (B) *L. donovani* LV9 e (C) *L. infantum* NCL na proporção de três ou seis parasitos para cada célula, após quarenta e oito horas foram lisados com o kit OneGlo para quantificar a carga parasitária no espectrofotômetro já que os parasitos expressavam o vetor de luminescência constitutivamente; os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$.

Observando então a cinética de replicação dos parasitos *in vitro* foi possível avaliar que tanto com MOI 3 (Figura 9A), quanto com MOI 6 (Figura 9B), os parasitos eram internalizados e posteriormente controlados. Foi observado também que a cepa NCL tem um melhor potencial de infecção quando comparada as outras duas cepas e por isso optamos por prosseguir as análises seguintes com esta cepa.

Figura 9. Comparativo da carga parasitária em macrófagos infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9 em diferentes *timepoints* por luminescência. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com as cepas *L. infantum* Pp75, *L. donovani* LV9 e *L. infantum* NCL na proporção de (A) três ou (B) seis parasitos para cada célula, usando diferentes concentrações de diluição do kit OneGlo para leitura de luminescência (1:3 para MOI 3 (A) e 1:1 para MOI 6 (B)). O kit foi aplicado em cada *timepoint* e as leituras de luminescência foram realizadas no espectrofotômetro. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média ± DPM; *= p<0,05.

5.1.3. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INFECÇÃO DE BMDMS COM A CEPA NCL *IN VITRO*

Apesar do controle intracelular *in vitro* da *Leishmania major* já ter sido observado anteriormente e justificado como uma participação da autofagia na imunidade inata, para espécies causadoras da LV (FRANK *et al.*, 2015), nos questionamos ainda se não haveria outra justificativa que favorecesse o controle do parasito. E para otimizar os experimentos *in vitro*, optamos por tentar entender se algum fator experimental estaria favorecendo o controle desse parasito pela célula hospedeira.

Infecções com espécies de *Leishmania spp.* causadoras da Leishmaniose Tegumentar estão bem estabelecidas por ocorrerem otimamente a 33°C, temperatura esta

que mimetiza àquela encontrada na pele do hospedeiro mamífero (ZULI-NASCIMENTO *et al.*, 2010). Considerando que a temperatura da pele é inferior a temperatura visceral, decidimos avaliar se temperaturas mais altas (36°C) favoreceriam a replicação do parasito *in vitro*. De fato, autores relatam o uso de temperaturas mais altas *in vitro* quando se trata de cepas causadoras da LV (DAS *et al.*, 2001).

Outro questionamento que surgiu foi em relação ao estágio infectivo do parasito usado nos ensaios *in vitro*. Uma vez que os hospedeiros são infectados através da inoculação de formas metacíclicas, avaliamos se o uso de metacíclicas purificadas por gradiente de densidade potencializaria a infecção quando comparado com MEC (SPATH; BEVERLEY, 2001). Já foi demonstrado que, para algumas espécies de *Leishmania*, o uso de metacíclicas purificadas potencializa a infecção (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2013). Assim, optamos por comparar a infecção com MEC (Figura 10A e C) e a infecção com as formas metacíclicas (Figura 10B e D), nas temperaturas de 33 e 36°C, possibilitando avaliar o quanto as variáveis poderiam interferir na cinética do parasito.

É possível observar que mesmo utilizando temperaturas mais elevadas, que mimetizem a temperatura de órgãos internos acometidos pela LV, os parasitos ainda são controlados *in vitro*. No caso da infecção feita com MEC, verifica-se uma maior entrada (3h após infecção) dos parasitos a 36°C, porém nos demais tempos avaliados os parasitos mantidos a 36°C foram controlados mais rapidamente, observando uma inversão das condições do cultivo a 33°C. Nas infecções feitas com metacíclicas, poucas diferenças foram vistas no tempo de entrada dos parasitos (3h após infecção), porém nos outros tempos exibiu uma tendência à mesma resposta vista na infecção por MEC, ou seja, os parasitos mantidos a 36°C foram controlados.

Ao analisarmos o estágio do parasito usado na infecção, era esperado que as metacíclicas purificadas tivessem maior potencial de infecção que as amostras infectadas com MEC, no entanto, a taxa de entrada com o uso de metacíclicas foi cerca de 10 vezes menor. Uma explicação que podemos encontrar, é que muitas metacíclicas foram perdidas durante o processo de purificação com o Ficoll, favorecendo o rendimento dos parasitos mais infectivos separados pelo protocolo para obtenção de MEC.

Figura 10. Quantificação por luminescência da carga parasitária em macrófagos infectados com a cepa *L. infantum* NCL com diferentes fases do parasito em diferentes temperaturas. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com a cepa *L. infantum* NCL, os parasitos foram purificados em Cultura Enriquecida de Metacíclicas (A; C) ou em Metacíclicas Purificadas (B; D) na proporção de três (A; B) ou seis (C; D) parasitos para cada célula. As condições foram feitas paralelamente em duas temperaturas distintas, 33 e 36°C. As células foram lisadas com o kit OneGlo para a leitura da luminescência emitida pelos parasitos que expressavam o vetor de luminescência constitutivamente; os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; *= $p < 0,05$.

5.2. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO IN VIVO

Até o momento nesse estudo havia sido avaliada apenas infecções *in vitro* e o potencial de infecção das cepas de *Leishmania* em células. Dada as discrepâncias entre um sistema *in vitro* isolado e toda a complexidade de um sistema *in vivo*, decidimos analisar se os padrões de infecção de BMDMs exibidos pelas diferentes cepas utilizadas se manteriam *in vivo*. Sendo assim, definimos a realização dos testes comparativos *in vivo* visando estabelecer o modelo de infecção ideal no uso de camundongos.

5.2.1. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM AS DIFERENTES CEPAS

O fator importante para que um modelo animal seja confiável é que as características patológicas e as respostas imunológicas observadas em humanos, quando expostos a uma variedade de *Leishmania spp.*, sejam representadas com alta semelhança nos modelos murinos. Diversos modelos animais experimentais como roedores, cães e macacos foram desenvolvidos, mas nenhum com sucesso em reproduzir a doença humana. Quando se fala em saúde pública, a LV é uma antroponose, acometendo humanos e cães, esses são considerados hospedeiros secundários ou “acidentais” no ciclo de vida do parasito. Os sintomas clínicos são graves em humanos e cães, já nos hospedeiros reservatórios apresentam poucos ou nenhum sinal, o que dificulta a definição de um modelo laboratorial adequado, visto que muitos hospedeiros comportam-se apenas como reservatório (GARG; DUBE, 2006).

Sendo assim, decidimos avançar no estabelecimento de um modelo de infecção de LV *in vivo* padronizado e reprodutível. Poucos trabalhos exploram animais C57BL/6 como modelo animal para infecção experimental de LV, porém devido às várias ferramentas disponíveis (animais *knockouts* para diferentes vias) em animais com *background* C57BL/6, testamos a infecção de camundongos C57BL/6 com as três diferentes cepas, visando avaliar qual delas seria capaz de alcançar os órgãos alvo da doença e estabelecer uma infecção nestes animais. As três cepas foram sincronizadas e passaram pelo mesmo protocolo para obtenção de MEC, visto que é o processo de purificação com melhor rendimento, como discutido anteriormente.

Além disso, outro questionamento no estabelecimento de um modelo de infecção seria quanto a proximidade do que acontece fisiologicamente. Diversos modelos experimentais com características bastante específicas foram desenvolvidos, no entanto, nenhum deles reproduz precisamente o que observamos em humanos e cães. Além da natureza do hospedeiro, o inóculo do parasito pode ser considerado a principal diferença entre infecções naturais e experimentais, variando de centenas de parasitos depositados na derme do hospedeiro versus milhões de parasitos de cultivo injetados, respectivamente

(HOMMEL *et al.*, 1995). Como já mencionado anteriormente, infectar animais pela via intravenosa é a alternativa que mais se afasta do modelo ideal. As *Leishmanias* são parasitos intracelulares obrigatórios e inserir os parasitos livres na corrente sanguínea é uma situação que não se observa na natureza, por esse motivo, apesar de ser a forma de infecção conhecida por apresentar altas cargas parasitárias, é uma situação menos condizente com o natural.

Estudos anteriores já demonstraram o uso da via de infecção intradérmica (ID) como uma ferramenta eficiente na infecção de camundongos por *L. infantum* (AHMED *et al.*, 2003). No entanto, esses estudos utilizam camundongos BALB/C, considerados mais suscetíveis às leishmanioses. Também já foram apresentados dados referentes a infecção de camundongos BALB/C por *L. infantum* utilizando a via intraperitoneal (IP) (CAJUEIRO *et al.*, 2017). Dessa forma, optamos por avaliar as vias ID e IP de infecção em camundongos C57BL/6, considerados resistentes.

Utilizando as vias que se distanciam menos da infecção em sua forma fisiológica (Figura 11), avaliamos as diferenças entre o inóculo intraperitoneal (IP – barras pretas) e o inóculo intradérmico (ID – barras verdes). Dessa forma, ao injetar os parasitos na pele ou no peritônio, as células residentes reconhecem e fagocitam os parasitos. A replicação dos protozoários dentro da célula hospedeira levam a uma lise da membrana e, posteriormente, a infecção de outras células, alcançando órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea. É sabido que os linfócitos têm papel crucial na defesa específica contra *L. infantum*, também já foi elucidado o papel dos neutrófilos no controle da infecção no baço durante fase aguda, nesta fase inicial há mais parasitos no fígado que no baço, possivelmente devido a atividade desses neutrófilos (ROUSSEAU *et al.*, 2001).

Após 21 dias da infecção desses animais com as cepas avaliadas, coletamos os baços (Figura 11A) e os fígados (Figura 11B) para quantificação da carga parasitária pelo ensaio de diluição limitante considerado padrão ouro (OLIVEIRA, 2016) para esse tipo de análise. Assim foi possível observar que tanto para as amostras do baço quanto para as amostras do fígado a cepa NCL se mostrou mais infectiva que a Pp75 e que a LV9, em concordância com o observado nos ensaios *in vitro*, em ambas vias de infecção avaliadas. Verifica-se ainda que a via intraperitoneal apresenta uma infecção mais efetiva, resultando em uma maior carga parasitária. De maneira análoga, estudos mostram que o uso de infecção via IP mostrou-se efetiva para o estabelecimento da LV em camundongos

BALB/c (BOAS DE MELO *et al.*, 2020). Vale ressaltar que o modelo de LV geralmente é iniciado por injeção intravenosa de uma alta dose de amastigotas (STANLEY; ENGWERDA, 2007) o que está longe do que ocorre naturalmente.

Figura 11. Quantificação comparativa da carga parasitária em camundongos C57BL/6 infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9 por via intraperitoneal e por via intradérmica na orelha. Camundongos C57BL/6 *wild type* foram infectados com as cepas *L. infantum* NCL, *L. infantum* Pp75 e *L. donovani* LV9 com 10^7 parasitos por animal, pela via intraperitoneal (baras pretas) ou pela via intradérmica na orelha (barras verdes). Após vinte e um dias, baços (A) e fígados (B) foram coletados para a quantificação da carga parasitária pelo ensaio de diluição limitante. Cada marcador representa um animal (n=5 animais por grupo). Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,00005$.

5.2.2. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM A CEPA *L. INFANTUM* PELA VIA INTRADÉRMICA

Verificamos, que os grupos infectados pela via intradérmica com a cepa NCL também demonstraram potencial de infecção. Apesar do estabelecimento de infecção visceral por infecção intradérmica no modelo de camundongo ainda ser controverso, decidimos explorar essa via de infecção. Uma vez que, a via intradérmica ou subcutânea se aproxima muito do curso natural da infecção devido à transmissão pela picada de um flebotomíneo (AHMED *et al.*, 2003).

Ao observarmos que muitos animais infectados na orelha não estavam parasitados, nos questionamos se essa ausência de carga parasitária era realmente uma não infecção do animal, ou se o protocolo de infecção na orelha poderia gerar uma perda

no número de parasitos inoculados, devido ao baixo volume de inóculo feito na orelha (15 μ L). Nesse contexto, decidimos então infectar os camundongos pela via intradérmica em duas regiões em paralelo, na pata (Figura 12A) e na orelha (Figura 12B), para avaliar se esses resultados seriam divergentes. Coletamos os baços (barras azuis) e fígados (barras pretas) 4 e 6 semanas após a infecção. E ao avaliarmos esses resultados, concluímos que apesar dos parasitos inoculados via intradérmica alcançarem os órgãos alvo, estes não estabeleciam uma infecção permanente e com altas taxas de parasitos. A partir de então, foi definida a via intraperitoneal como mais efetiva no estabelecimento do modelo de infecção.

O uso da via IP é amplamente aplicado para infecção de hamster (OTT *et al.*, 1967; NIETO *et al.*, 2011) e esses animais manifestam sintomas clínicos compatíveis com o observado nas leishmanioses caninas e humanas (MELBY *et al.*, 2001; DEA-AYUELA *et al.*, 2007). No entanto, a ausência de ferramentas para hamster tornou este modelo limitado ao nosso estudo de LV. Nesse sentido, o modelo funcional de camundongos C57BL/6 para entender o papel dos inflamassomas na LV se fez essencial.

Figura 12. Infecção de animais C57BL/6 com *L. infantum* NCL pela via intradérmica. Os parasitos *L. infantum* NCL foram purificados em Cultura Enriquecida de Metacíclicas e utilizados na concentração de 10^7 para infectar animais C57BL/6 pela via intradérmica, (A) na pata e (B) na orelha. Após vinte e um dias de infecção, os animais foram sacrificados e tiveram fígados e baços coletados para quantificação da carga parasitária por ensaio de diluição limitante. Cada marcador representa um animal (n=5 animais infectados na pata e n=5 animais infectados na orelha). Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; *= p<0,05.

5.2.3. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DAS DIFERENTES FORMAS DE PURIFICAÇÃO DO PARASITO

Como mencionado anteriormente, sabe-se que os hospedeiros mamíferos das leishmanioses são infectados através da inoculação de promastigotas metacíclicas (ROGERS *et al.*, 2010). Sendo assim, outro questionamento se deu quanto à forma do parasito usada para infecção. Observamos durante os ensaios *in vitro* que os parasitos purificados para obtenção de MEC foram mais efetivos na entrada das células hospedeiras. Porém, sabe-se que em uma cultura mista de parasitos em fase estacionária apenas 0,1 a 2% desses parasitos são verdadeiramente metacíclicas altamente infectivas, com alta capacidade de invadir macrófagos. Assim, os outros parasitos acabariam apenas atuando como ativadores do sistema imune e sendo ineficientes durante a infecção (SPATH; BEVERLEY, 2001). Considerando essas informações, ao infectar os animais com 10^7 parasitos de uma cultura em fase estacionária mista, uma grande quantidade de parasitas não seria infectiva e estariam sendo prejudiciais para infecção ativando o reconhecimento para uma resposta imunológica. Isso nos leva a pensar que infectar os animais com 10^5 parasitos em sua forma metacíclica purificada levaria a um desenvolvimento mais favorável da infecção.

No entanto, ao infectarmos os camundongos via intraperitoneal com diferentes fases do parasito, o que observamos foi divergente do esperado. Após 21 dias da infecção, foram coletados fígados (Figura 13A) e baços (Figura 13B) de animais infectados com 10^7 parasitos de uma cultura de fase estacionária mista (S Ph, do inglês *Stationary Phase*), também com 10^7 parasitos MEC e com 10^5 metacíclicas purificadas por gradiente de densidade, todos via intraperitoneal. Surpreendentemente, os animais infectados com 10^5 metacíclicas não apresentaram nenhum sinal de infecção. Uma das hipóteses levantadas é que a inoculação de um alto número de parasitos seja relevante na infecção de animais resistentes. Por esse motivo, o uso de metacíclicas purificadas não foi considerado como vantajoso. Além disso, comparativamente, o uso de parasitos MEC apresentou uma tendência a ser mais infectivo que os parasitos mistos em fase estacionária.

Para estabelecer um modelo referência, decidimos selecionar a quantidade mínima de parasitos capazes de estabelecer a infecção nos camundongos C57BL/6. A escolha da quantidade partiu do número de 10^7 parasitos MEC, já considerada eficiente nos experimentos anteriores e então testamos 5×10^6 e 10^6 , no entanto os animais não

desenvolveram sinais de uma infecção efetiva após 21 dias, visto que foram coletados baços e fígados e não foram detectados parasitos nestes órgãos (dados não apresentados).

Figura 13. Comparativo das diferentes fases do parasito *L. infantum* NCL na infecção de animais C57BL/6. Os parasitos *L. infantum* NCL foram purificados de três maneiras distintas para que fosse possível comparar como essa purificação interfere na infecção de animais C57BL/6. Após vinte e um dias de infecção, os animais foram sacrificados e tiveram (A) fígados e (B) baços coletados para quantificação da carga parasitária por ensaio de diluição limitante. Cada marcador representa um animal (n=5 animais por grupo). Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$.

5.3. AVALIAÇÃO DO USO IN VIVO DA CEPA *L. INFANTUM* NCL EXPRESSANDO LUCIFERASE

Os experimentos *in vivo* discutidos até aqui foram realizados por meio da análise de diluição limitante após a coleta dos órgãos alvo (fígado e baço). Porém, o uso de cepas, como por exemplo *L. infantum*, expressando luciferase em estudos *in vivo* já é bastante conhecido. Trabalhos anteriores mostram que a inserção desse gene na cepa é bastante funcional tanto em hamsters (REIMÃO *et al.*, 2015) quanto em camundongos BALB/c (MENDES COSTA *et al.*, 2019). As cargas de parasitas foram avaliadas usando imagens bioluminescentes *in vivo* de camundongos inteiros pela tecnologia IVIS (*In Vivo Imaging System*), que favorece o acompanhamento da infecção nesses animais. No entanto a tecnologia não está disponível em todos os centros de pesquisa, podendo alternativamente ser coletada a amostra para realizar análises *ex vivo* em espectrofotômetros.

Como já mencionado anteriormente, a cepa NCL (a mais promissora no estabelecimento da LV de acordo com nosso modelo) já havia sido transformada para expressão do vetor luminescente responsivo à luciferina (NCL Luc), sendo assim avaliamos ainda o emprego da NCL Luc em nossos ensaios *in vivo*. Infectamos animais C57BL/6 com a cepa NCL Luc para validar se a expressão do vetor se manteria durante a infecção e se a ferramenta seria funcional na quantificação da carga parasitária por espectrofotometria. Após 21 dias de infecção, coletamos baços e fígados dos animais, e avaliamos em paralelo a quantificação da carga parasitária por diluição limitante e por luminescência.

Para validar a quantificação da intensidade de luminescência frente ao número de parasitos, desenvolvemos primeiramente uma curva padrão correlacionando número de parasitos e unidades de luminescência (Figura 14). Foram feitas contagens do parasito NCL Luc, seguida pela incubação com o kit OneGlo por uma hora e então os dados foram analisados por espectrofotometria. Dessa maneira sabíamos exatamente os valores de luminescência relativos ao número de parasitos, conforme descrito por Reimão e colaboradores, 2015.

Figura 14. Quantificação da intensidade de luminescência por unidade de *L. infantum* NCL expressando o vetor luciferase constitutivamente. Os parasitos *L. infantum* NCL que expressam constitutivamente o vetor luminescente foram contadas e distribuídas de acordo com as quantidades conhecidas. As amostras foram lisadas com o kit OneGlo para a leitura da luminescência emitida pelos parasitos. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$.

Observamos que os resultados não eram similares, evidenciando que a quantificação da carga parasitária por luminescência não estava sendo eficaz nas amostras vindas de tecidos. Outras otimizações para o protocolo de leitura das amostras por luminescência provenientes de tecidos foram realizadas, como por exemplo o uso de saponina para liberação das amastigotas, porém os valores de carga parasitária quantificado por luminescência continuavam baixos, apesar de cargas parasitárias altas identificadas pelo ensaio de diluição limitante.

Comparando os valores de luminescência obtidos na avaliação de promastigotas livres e de amastigotas (MOI 5) em BMDMs infectados, é possível verificar que a perda de luminescência não acontece na forma amastigota, fortalecendo a nossa hipótese de uma possível interferência do tecido. Avaliamos também uma amostra de fígado que, por ensaio de diluição limitante, encontramos um valor de 10^6 para a carga parasitária. O resultado da leitura de luminescência não apresentou diferença estatística da amostra de fígado não infectada, ambas processadas da mesma maneira. Ademais, não foram vistas diferenças estatísticas entre a amostra e o controle da reação (apenas o kit OneGlo) (Figura 15).

Figura 15. Comparativo da intensidade de luminescência emitida por unidade de *L. infantum* NCL expressando o vetor luciferase constitutivamente em diferentes condições experimentais. Os parasitos *L. infantum* NCL que expressam constitutivamente o vetor luminescente foram quantificados em suas formas promastigotas, amastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo* para avaliar a interferência dos tecidos na leitura. As amostras foram lisadas com o kit OneGlo para a leitura da luminescência emitida pelos parasitos. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$.

Ao final dessas etapas definimos parâmetros a serem utilizados para modelo de infecção *in vivo*; como a forma do parasito usada para a infecção de camundongos, quantidade de parasitos a serem inoculados e método para quantificação da carga parasitária. Ou seja, ficou estabelecido 10^7 parasitos MEC (cepa NCL) por animal, seguindo com quantificação da carga parasitária por diluição limitante.

Na sequência, foi então avaliada a cinética da infecção de camundongos C57BL/6 com a cepa NCL *wild type*, quantificando as cargas parasitária pelo ensaio de diluição limitante. Enquanto isso, prosseguíamos com o objetivo de construir uma cepa de NCL expressando um gene repórter, inserindo um novo vetor expressando proteína fluorescente na cepa em estudo para avaliar sua funcionalidade em ensaios *in vivo*.

5.4. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA IN VIVO DA CEPA L. INFANTUM DURANTE A INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Para os estudos de cinética, parasitos (cepa NCL) recém isolados de animais e altamente infectivos foram utilizados. Foram infectados 30 animais C57BL/6 *wild type* com 10^7 parasitos por animal, purificados para obtenção de MEC e ressuspensos em PBS. Esses animais foram infectados com 100µL de solução e todos foram mantidos às mesmas condições. A cada semana posterior a data de infecção, 5 animais foram eutanasiados e tiveram baços e fígados coletados para avaliar a cinética de infecção dos parasitos nos animais até a sexta semana pós infecção.

Os resultados observados são coerentes com os dados de infecções anteriores (Figura 11), sendo verificado para o fígado um pico da infecção 21 dias após a infecção (Figura 16A) e um posterior controle. Para o baço o pico também foi observado após 21 dias de infecção e, posteriormente, observamos estabilidade da carga parasitária por um tempo mais longo (Figura 16B).

Já é sabido que após a injeção IV de *L. donovani* em camundongos, os parasitos alcançam o fígado de 2 a 4 semanas após a infecção (BRADLEY, 1974). Nossos

resultados corroboram com essas informações prévias, de maneira que encontramos parasitos no fígado e no baço após duas semanas de infecção, utilizando 10^7 MEC via IP. A fase aguda da doença, onde inicialmente são encontrados um alto número de parasitos no fígado é vista até a quarta semana. Trabalhos anteriores mostraram que o fígado é capaz de controlar a infecção em camundongos coordenando a defesa imune do hospedeiro por meio do desenvolvimento de infiltrados celulares conhecidos como granulomas inflamatórios (MCEL RATH *et al*, 1988). Esses dados coincidem com os nossos resultados onde há controle da infecção por *L. infantum* no fígado 5 semanas após a infecção.

Na literatura, o baço torna-se cronicamente infectado com falta de formação de granuloma (ENGWERDA *et al.*, 2004). Isso pode explicar a persistência de parasitas no baço por um tempo mais longo após a infecção. Alguns animais tiveram órgãos coletados 8 semanas após a infecção, apresentando uma carga parasitária residual no baço, mas não no fígado (dados não apresentados).

Figura 16. Cinética de replicação de *L. infantum* NCL em animais C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal. Os parasitos *L. infantum* NCL foram purificados em Cultura Enriquecida de Metacíclicas e utilizados na concentração de 10^7 para infectar animais C57BL/6 pela via intraperitoneal. A cada semana posterior a infecção um grupo de animais (n=5) foi sacrificado e tiveram (A) fígados e (B) baços coletados para quantificação da carga parasitária por ensaio de diluição limitante. Cada marcador representa um animal (n=5 animais por grupo), dados representativos de 2 experimentos com resultados semelhantes. Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; *= p<0,05.

Uma vez estabelecido um modelo eficiente de infecção, mais próximo do que acontece fisiologicamente, com um inóculo mínimo e com um bom rendimento na purificação da cepa para estabelecer a LV em camundongos, prosseguimos com a construção da cepa expressando um gene repórter, a fim de ter uma ferramenta que nos possibilite um maior espectro de parâmetros para realizar a avaliação da infecção.

5.5. CONSTRUÇÃO DA CEPA *L. INFANTUM* COM O VETOR FLUORESCENTE TDTOMATO

Em colaboração com a professora Ângela Kaysel Cruz (Laboratório de Parasitologia Molecular – FMRP/USP) foi desenvolvida a construção da cepa *L. infantum* NCL TdTomato, para expressão da fluorescência constitutivamente. O plasmídeo pSSUneoTdTOMATO (TdTom, descrito anteriormente em *L. donovani* por Beattie e colaboradores, 2010, foi linearizado e utilizado para transfectar *L. infantum* NCL, seguindo protocolo abordado por Lorenzon, 2020, como apresentado no esquema da Figura 17A. A integração da construção foi confirmada por PCR (Figura 17B) utilizando os primers apresentados na Tabela 1, em três diferentes clones, e após observação dos clones por microscopia de fluorescência, selecionamos o clone 3, por ser aquele com maior intensidade de fluorescência. O clone 3 teve ainda sua fluorescência confirmada tanto na forma promastigota (Figura 17C), quanto na forma amastigota intracelular (Figura 17D) (na infecção de BMDMs com núcleos marcados em azul utilizando Hoechst).

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para confirmar a integração do TdTomato

Primer	Sequência (5' - 3')
SSU::APRT_F	GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG
Overhang- <i>Xho</i> I-SAS-R	GTACATCTCGAGACCACCGCTACGGTGGACGGC

Além disso, a fluorescência da cepa NCL TdTomato pode ser ainda identificada por citometria de fluxo (Figura 17E). Para tal identificação, utilizamos BMDMs não infectados e infectados com a cepa NCL TdTomato. Sendo assim, a cepa expressando este gene repórter poderia ser utilizada como uma importante ferramenta na análise do perfil de células infectadas de camundongos, por exemplo.

Figura 17. Construção da cepa *L. infantum* NCL expressando a proteína fluorescente TdTomato constitutivamente. Os parasitos *L. infantum* NCL foram transfectados com uma construção contendo informação para codificar a proteína fluorescente TdTomato, além de um gene que confere resistência a G418 (A). A integração da construção no *locus* SSU foi confirmada por (B) PCR em três diferentes clones. A fluorescência dos respectivos clones foi comparada utilizando microscopia de fluorescência, sendo escolhido o clone que apresentou maior intensidade para dar seguimento aos experimentos. Observamos a fluorescência do clone 3 tanto em parasitos promastigotas (C), quando amastigotas (D) num contexto de infecção *in vitro* utilizando BMDMs (macrófagos com núcleo marcado em azul, usando Hoechst, e amastigota em vermelho expressando TdTomato). Também foi avaliada a emissão de fluorescência por (E) citometria de fluxo comparativa entre macrófagos não infectados com macrófagos infectados com a cepa modificada.

A microscopia multifoton nos permitiu ainda constatar a presença dos parasitos dentro das células hospedeiras (BMDMs) (Figura 18), em conformidade com relatos descritos anteriormente de *Leishmania* expressando TdTom (BEATTIE *et al.* 2010). Os macrófagos tiveram seus núcleos marcados com Hoechst (azul) e seus componentes de membrana marcados com WGA (verde). Esses macrófagos foram infectados com *L. infantum* NCL TdTomato, purificadas para obtenção de MEC, e infectados na proporção

de 3 parasitos para cada célula (MOI 3). Após 3 horas de infecção, observamos a presença de promastigotas fagocitadas que ainda não haviam se diferenciado em amastigotas (ponta de seta) e amastigotas intracelulares completamente diferenciadas (seta).

Figura 18. Cepas *L. infantum* NCL expressando o vetor fluorescente TdTomato constitutivamente infectando macrófagos derivados de medula óssea. Os parasitos *L. infantum* NCL TdTomato (vermelho) purificados como Cultura Enriquecida de Metacíclicas infectando macrófagos de medula óssea (núcleos marcados com Hoechst em azul e componentes de membrana marcados com WGA em verde) na proporção de três parasitos para cada célula, após duas horas de infecção. A seta indica amastigota intracelular e a ponta de seta indica uma promastigota fagocitada que ainda não se diferenciou.

Sendo assim, verificamos que a cepa NCL expressando um gene repórter para proteína fluorescente (TdTomato) mostrou-se eficaz nas infecções *in vitro*, podendo ser identificada por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Após estas validações *in vitro*, a cepa NCL TdTomato foi também utilizada em infecções *in vivo*, como será discutido a seguir.

5.6. INFECÇÃO DOS ANIMAIS *Nlrp3*^{-/-} COM A CEPA *L. INFANTUM* NCL TdTOMATO

O entendimento da regulação dos inflamassomas e seu envolvimento na imunidade inata durante infecções patogênicas tem avançado significativamente. No entanto, poucos estudos relatam diretamente o envolvimento do inflamassoma de NLRP3

em infecções por *Leishmania*. O papel do inflamassoma de NLRP3 e seus componentes também não foram bem elucidados para LV (SAHA *et al.*, 2019). Sendo assim, decidimos avaliar a importância do inflamassoma de NLRP3 na infecção por *L. infantum*.

Sabe-se que diversos fatores podem influenciar na fisiologia do animal, inclusive a microbiota. Animais provenientes de biotérios diferentes por exemplo, ainda que tenham o mesmo *background* genético, podem apresentar uma maior variação em suas respostas fisiológicas, por esse motivo o uso do controle de ninhada tem sido amplamente utilizado e recomendado (ROBERTSON *et al.*, 2019). Manter animais no mesmo biotério, desde o nascimento, passando pela mesma amamentação, desmame, alimentação e condições de claro/escuro reduz as variáveis experimentais.

Com base em tais achados, foi realizado o controle de ninhada entre os animais C57BL/6 *knockout* para o gene do inflamassoma de NLRP3 (*Nlrp3*^{-/-}), provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE-FMRP/USP) e animais C57BL/6 *wild type*, provenientes do Biotério Central (BG-FMRP/USP) foram acomodados no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP. Esses animais foram acasalados gerando a primeira ninhada (F1) de filhotes toda heterozigota (*Nlrp3*^{+/-}). Todos os animais foram mantidos em um mesmo biotério, sob as mesmas condições. Após o desmame, com 21 dias, e distinção dos sexos, os animais foram mantidos separados até a completarem 8 semanas, para que pudessem ser colocados para acasalar.

Os cruzamentos F1xF1 foram realizados para a obtenção dos animais geneticamente controlados dentro das ninhadas (*Littermate Control*; LMC), para obtermos os 3 genótipos (*Nlrp3*^{+/+}, *Nlrp3*^{+/-} e *Nlrp3*^{-/-}) em uma mesma ninhada. Esses filhotes F2 foram desmamados também com 21 dias, machos e fêmeas separados e marcados para genotipagem por PCR. Amostras de DNA foram coletadas a partir de um corte da orelha do filhote para realização da genotipagem desses animais pela técnica de PCR utilizando os *primers* descritos na Tabela 2.

A genotipagem desses animais foi feita em duas etapas, como pode ser visto na Figura 19, a parte superior da figura mostra o gel de agarose referente à PCR para a amplificação do gene referente ao alelo selvagem, como confirmado com o controle na coluna identificada como B6^{+/+}. A parte inferior da figura apresenta as amostras amplificadas para o *knockout* de NLRP3, como confirmado com o controle da coluna

identificada como N3^{-/-}. Assim pode-se identificar animais com os três genótipos, com exemplos circulosados em vermelho (Figura 19).

Tabela 2. Primers utilizados para detectar a presença ou a ausência do gene do inflamassoma de NLRP3 no DNA.

Primer	Sequência (5' - 3')
NLRP3 12834	GCTACTTCCATTTGTCACGTCC
NLRP3 14584	CACCCTGCATTTTGTGTTG
NLRP3 14585	CGTGTAGCGACTGTTGAGGT

A presença dos três genótipos distintos resultantes de uma mesma ninhada diminui o viés experimental, já que os animais estão submetidos as mesmas condições de criação desde o nascimento. Dessa forma, um comparativo do potencial de infecção em animais *Nlrp3*^{-/-} frente aos animais que não são *knockouts* possui uma maior confiabilidade quando o experimento é realizado em LMC.

Figura 19. Geração de animais em *Littermate Control* de animais *knockout* para o gene do inflamassoma de NLRP3. Os animais C57BL/6 *wildtype* (*Nlrp3*^{+/+}) foram acasalados com animais C57BL/6 *knockout* para o gene do inflamassoma de NLRP3 (*Nlrp3*^{-/-}), de maneira que a primeira geração de filhotes fosse totalmente heterozigota (*Nlrp3*^{+/-}). Essa população de animais heterozigotos foi então acasalada novamente, de maneira que os filhotes, em uma mesma ninhada, apresentassem os três genótipos distintos (+/+, +/- e -/-), como representado nos círculos vermelhos.

Seguimos então com os animais LMC para avaliar a importância do inflamassoma de NLRP3 na infecção por *L. infantum*. As padronizações de infecção do modelo animal foram seguidas nesta etapa, de modo que os animais foram infectados pela via intraperitoneal com parasitos purificados para obtenção de MEC a uma multiplicidade de infecção de 10^7 parasitos por animal. Foram utilizados 6 grupos experimentais para cada um dos genótipos (*Nlrp3*^{+/+}, *Nlrp3*^{+/-} e *Nlrp3*^{-/-}) contendo 5 animais por grupo, estes animais foram infectados no mesmo dia com parasitos provenientes de uma mesma cultura.

Com base em nossos resultados (Figura 16), os animais foram eutanasiados em dois tempos após a infecção: vinte e um dias (Figura 20A e B) e 28 dias após a infecção (Figura 20C e D). A cada tempo após infecção foram sacrificados os três grupos, sendo um grupo de cada genótipo.

As amostras de baço (Figura 20A e C) e de fígado (Figura 20B e D) foram divididas, de maneira que metade da amostra foi utilizada para o ensaio de diluição limitante, para quantificação da carga parasitária. A outra parte da amostra foi processada para avaliação do perfil de células infectadas por citometria de fluxo e validação do uso *in vivo* da cepa expressando gene repórter, visto que esses animais foram infectados com a cepa *L. infantum* NCL TdTomato.

Na avaliação da carga parasitária (Figura 20) é possível observar que tanto em 21 dias quanto em 28 dias após a infecção, a presença de apenas um alelo do gene do inflamassoma de NLRP3 foi suficiente para conferir uma maior resistência do animal à infecção por *L. infantum*, assim como os dados já mostrados pelo nosso grupo em Djalma e colaboradores, 2013. Em ambos órgãos (baço e fígado) analisados a carga parasitária se apresentou em maior número nos animais *Nlrp3*^{-/-} (Figura 20).

Figura 20. Quantificação da carga parasitária em animais *Littermate Control* para o gene do inflamassoma de NLRP3 após 21 e 28 dias de infecção com *L. infantum* NCL. Animais de uma mesma ninhada (NLRP3^{+/-} x NLRP3^{+/-}) foram genotipados e infectados com a cepa *L. infantum* NCL para comparar a diferença da carga parasitária entre os animais com genótipos distintos (+/+, +/- e -/-). Os animais tiveram baços (A, C) e fígados (B, D) coletados após 21 (A, B) e 28 (C, D) dias de infecção. A quantificação da carga parasitária foi realizada por ensaio de diluição limitante. Cada marcador representa um animal (n>4 animais por grupo). Análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = p<0,05; ** = p<0,005; *** = p<0,0005; **** = p<0,00005.

Também já se sabe que, durante a infecção natural pelo vetor por *L. donovani*, a ativação do inflamassoma de NLRP3 e a produção de IL-1 β têm grande importância através do recrutamento de neutrófilos (DEY *et al.*, 2018). Esses dados sugerem que o inflamassoma de NLRP3 possa ter um importante papel como um mecanismo para o controle da infecção por *L. infantum*.

Além disso, realizamos ensaios de citometria de fluxo para observar quais tipos celulares poderiam estar participando da infecção por *L. infantum* utilizando nosso modelo de infecção. Realizamos fenotipagem para caracterizar células de Kupffer (CD45+CD11b-F4/80+), neutrófilos (CD11b+Ly6G+), monócitos inflamatórios (CD11b+Ly6C+), macrófagos derivados de monócitos (CD45+CD11b-F4/80+) e células dendríticas (CD45+CD11c+MHCII+), tanto no fígado como no baço. Nossos resultados

demonstraram que os macrófagos derivados de monócitos e as células dendríticas foram recrutadas para o fígado após 3 semanas de infecção (Figura 21). Quatro semanas após infecção, tanto os macrófagos derivados de monócitos quando as células de Kupffer estavam moduladas positivamente (Figura 22). Quando olhamos para o baço, não observamos nenhuma diferença no número desses tipos celulares quando comparamos a camundongos não infectados.

Figura 21. Análise do perfil de células infectadas por *L. infantum* NCL TdTomato em baços e fígados de camundongos C57BL/6 após 21 dias de infecção. Animais C57BL/6 infectados com *L. infantum* NCL TdTomato (barras vermelhas) e não infectados (barras brancas) foram eutanasiados e tiveram seus baços e fígados coletados após 21 dias. As amostras foram preparadas e marcadas com os anticorpos para análise por citometria de fluxo. Os dados foram analisados com auxílio do *software* Flowjo e as análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM; * = $p < 0,05$

Já foi demonstrado na literatura que células de Kupffer, neutrófilos, monócitos inflamatórios e células dendríticas participam da resposta inflamatória durante VL no fígado (TERRAZAS *et al.*, 2017; SALGUEIRO *et al.*, 2018; AGALLOU *et al.*, 2018). Isso poderia justificar um maior recrutamento dessas células para o fígado quando utilizamos o protocolo de IP para infecção por *L. infantum*, o que nos sugere que este modelo está de fato levando a uma infecção estabelecida tanto no fígado quanto no baço.

Figura 22. Análise do perfil de células infectadas por *L. infantum* NCL TdTomato em baços e fígados de camundongos C57BL/6 após 28 dias de infecção. Animais C57BL/6 infectados com *L. infantum* NCL TdTomato (barras vermelhas) e não infectados (barras brancas) foram eutanasiados e tiveram seus baços e fígados coletados após 28 dias. As amostras foram preparadas e marcadas com os anticorpos para análise por citometria de fluxo. Os dados foram analisados com auxílio do *software* Flowjo e as análises estatísticas realizadas no programa Prism 6 (GraphPad Prism, versão 6.01, 2012), utilizando teste *One-way* ANOVA, dados representados como média $\pm$ DPM.

Durante a execução desse protocolo, tentamos ainda caracterizar as células infectadas no fígado e no baço. Porém, os resultados não foram satisfatórios, e a repetição do ensaio não foi possível até a presente data devido a paralização do fornecimento de animais ocasionada pela pandemia do novo coronavírus (COVID-19). Assim que possível daremos prosseguimento ao trabalho, na tentativa de identificar o perfil de células infectadas e confirmar ainda o papel do NLRP3 durante a infecção por *L. infantum*.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido para estabelecer um modelo de infecção experimental de *Leishmania infantum* em camundongos C57BL/6. Foram avaliados diversos parâmetros como vias de administração, forma do parasito a ser inoculado e tempos pós-infecção para melhor detecção de carga parasitária. Identificamos que as injeções pela via intraperitoneal (IP) podem se aproximar da infecção natural ao modelo de infecção por *L. infantum*, resultando no estabelecimento da doença nos animais e conferindo ainda reprodutibilidade entre experimentos. O uso de MEC em vez de centrifugação por gradiente de densidade permitiu a infecção *in vivo* em larga escala. O uso de parasitos repórter expressando luciferase e sua detecção por luminescência não asseguraram a mesma quantificação da carga parasitária em órgãos de animais infectados, que àquela detectada pelo ensaio de diluição limitante. De acordo com nosso modelo de infecção experimental de LV em camundongos C57BL/6, verificamos um pico na carga de parasitos após 3 e 4 semanas em baço e fígado, respectivamente, seguidos por um controle da doença.

Buscando por parasitos, expressando um gene repórter, que fossem funcionais em ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi desenvolvida uma cepa de *L. infantum* expressando o vetor fluorescente TdTomato, o que possibilitou a identificação dos parasitos por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

Para validar o nosso modelo de infecção, utilizamos camundongos deficientes no inflamassoma de NLRP3, que é essencial para a resposta do conra a Leishmaniose. Animais KO para o inflamassoma de NLRP3 foram infectados com *L. infantum* TdTomato e verificamos que, a ausência de um alelo do gene do inflamassoma de NLRP3 foi suficiente para conferir uma maior resistência do animal à infecção por *L. infantum*. Além disso, em ambos órgãos (baço e fígado) analisados a carga parasitária se apresentou em maior número nos animais *Nlrp3*^{-/-}, sugerindo que o inflamassoma de NLRP3 possa ter um importante papel como um mecanismo para o controle da infecção por *L. infantum*, ainda a ser melhor investigado. No entanto o trabalho foi concluído com sucesso e o modelo de infecção se mostrou eficiente. A utilização da cepa *L. infantum* NCL pela via intraperitoneal foi eficaz no estabelecimento da LV em camundongos C57BL/6.

7. REFERÊNCIAS

1. AGALLOU, M.; PANTAZI, E.; TSIFTSAKI, E.; TOUBANAKI, D. K.; GAITANAKI, C.; SMIRLIS, D.; KARAGOUNI, E. Induction of protective cellular immune responses against experimental visceral leishmaniasis mediated by dendritic cells pulsed with the N-terminal domain of *Leishmania infantum* elongation factor-2 and CpG oligodeoxynucleotides. **Mol Immunol.** 2018.
2. AHMED, S., COLMENARES, M., SOONG, L., GOLDSMITH-PESTANA, K., MUNSTERMANN, L., MOLINA, R., & MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infection and immunity**, 71(1), 2003.
3. ALVAR, J., CROFT, S., OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.** 61, 224–261. 2006.
4. ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 7, n. 5, p. e35671, 2012.
5. BEATTIE, L.; PELTAN, A.; MAROOF, A.; KIRBY, A. *et al.* Dynamic imaging of experimental *Leishmania donovani*-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells. **PLoS Pathog**, 6, n. 3, p. e1000805, Mar 12 2010.
6. BHATTACHARYA, S.K., JHA, T.K., SUNDAR, S., THAKUR, C.P., ENGEL, J., SINDERMAN, H., JUNGE, K., KARBWANG, J., BRYCESON, A.D.M., BERMAN, J.D. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. **Clin. Infect. Dis.** 38, 217–221. 2004.
7. BOAS DE MELO, C. V.; HERMIDA, M. D.; MESQUITA, B. R.; FONTES, J. L. M.; KONING, J. J.; SOLCÀ, M. D. S.; BENEVIDES, B. B.; MOTA, G. B. S.; FREITAS, L. A. R.; MEBIUS, R. E.; DOS-SANTOS, W. L. C. Phenotypical Characterization of Spleen Remodeling in Murine Experimental Visceral Leishmaniasis. **Front Immunol.** Apr 15;11:653. 2020.
8. BRADLEY, D. J. Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. **Nature.** 1974.
9. BURNS, J. M. JR.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1993.
10. BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, 392, n. 10151, p. 951-970, Sep 15 2018.
11. CAJUEIRO, A. P. B.; GOMA, E. P.; DOS SANTOS, H. A. M.; ALMEIDA RODRIGUES, I. *et al.* Homeopathic medicines cause Th1 predominance and induce spleen and

megakaryocytes changes in BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. **Cytokine**, 95, p. 97-101, Jul 2017.

12. CARNEIRO, L. A. Estudo prospectivo sobre a dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção canina por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no estado do Pará. **Tese (Doutorado) - USP** / Liliane Almeida Carneiro, 2016.

13. CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**. 2009.

14. CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, 5, n. 11, p. 873-882, Nov 2007.

15. CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **J Parasit Dis**, 34, n. 1, p. 1-13, Apr 2010.

16. CRAFT, N.; BIRNBAUM, R.; QUANQUIN, N.; ERFE, M. C. *et al.* Topical resiquimod protects against visceral infection with *Leishmania infantum chagasi* in mice. **Clin Vaccine Immunol**, 21, n. 9, p. 1314-1322, Sep 2014.

17. CUPOLILLO, E. Avanço dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. 2005.

18. DAS, L.; DATTA, N.; BANDYOPADHYAY, S.; DAS, P. K. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. **J Immunol**, 166, n. 6, p. 4020-4028, Mar 15 2001.

19. DE ASSIS R. R., IBRAIM I. C., NOGUEIRA P. M., SOARES R. P., TURCO S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim Biophys Acta**. 2012.

20. DE CARVALHO, R. V. H.; LIMA-JUNIOR, D. S.; DA SILVA, M. V. G.; DILUCCA, M. *et al.* *Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 5273, Nov 21 2019.

21. DE CARVALHO, R. V. H.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome Activation in Response to Intracellular Protozoan Parasites. **Trends Parasitol**, 36, n. 5, p. 459-472, May 2020.

22. DEA-AYUELA, M. A.; RAMA-IÑIGUEZ, S.; ALUNDA, J. M.; BOLÁS-FERNANDEZ, F. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. **Vet Res Commun**. 2007.

23. DEY, R.; JOSHI, A. B.; OLIVEIRA, F.; PEREIRA, L.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; SERAFIM, T. D.; DE CASTRO, W. *et al.* Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host Microbe**. 2018.

24. ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev**, 26, n. 1, p. 58-85, Jan 2013.
25. ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol**. 2004.
26. FRANK, B.; MARCU, A.; DE OLIVEIRA ALMEIDA PETERSEN, A. L.; WEBER, H. *et al.* Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. **Parasit Vectors**, 8, p. 404, Jul 31 2015.
27. FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, 2, p. 11-19, Dec 2012.
28. GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J Med Res**. Mar;123(3):439-54. 2006.
29. GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tecumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36 (1): 71-80, jan-fev. 2003.
30. GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo , v. 7, n. 3, p. 338-349, Sept. 2004 .
31. GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 8, n. 4, p. 419-433, Apr 2010.
32. GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE : [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília : **Ministério da Saúde**, 2016.
33. HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev** 14:229–243. 2001.
34. HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann Trop Med Parasitol**. Dec;89 Suppl 1:55-73. 1995.
35. KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, 9, n. 8, p. 604-615, Jul 11 2011.
36. LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; DA MATTA, V. L.; TOMOKANE, T. Y. *et al.* Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Vet Parasitol**, 196, n. 3-4, p. 296-300, Sep 23 2013.
37. LAWYER, P. G.; NGUMBI, P. M.; ANJILI, C. O.; ODONGO, S. O. *et al.* Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **Am J Trop Med Hyg**, 43, n. 1, p. 31-43, Jul 1990.

38. LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat Med**, 19, n. 7, p. 909-915, Jul 2013.
39. LIRA, R.; MENDEZ, S.; CARRERA, L.; JAFFE, C. *et al.* Leishmania tropica: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. **Exp Parasitol**, 89, n. 3, p. 331-342, Jul 1998.
40. LORÍA-CERVERA EN, ANDRADE-NARVÁEZ FJ. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. Jan-Feb;56(1):1-11. 2014.
41. LOEUILLET, C.; BAÑULS, A. L. Hide M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasit Vectors**. Mar 11;9:144. 2016.
42. LORENZON, L. B. Estudo do papel de arginina metiltransferases em *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Tese (Doutorado) USP**. Ribeirão Preto, 2020.
43. MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL / **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
44. MATOUSSI, N., AMEUR, H.B., AMOR, S.B., FITOURI, Z., BECHER, S.B. Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report. **Med. Mal. Infect.** 37 (Suppl 3), S257–S259. 2007.
45. MCEL RATH, M. J.; MURRAY, H. W.; COHN, Z.A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **J Exp Med**. 1988.
46. MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol**, 166, n. 3, p. 1912-1920, Feb 1 2001.
47. MENDES COSTA, D.; CECILIO, P.; SANTAREM, N.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. *et al.* Murine infection with bioluminescent Leishmania infantum axenic amastigotes applied to drug discovery. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 18989, Dec 12. 2019.
48. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, 366, n. 9496, p. 1561-1577, Oct 29-Nov 4 2005.
49. NICO, D.; MARTINS ALMEIDA, F.; MARIA MOTTA, J.; SOARES DOS SANTOS CARDOSO, F. *et al.* NH36 and F3 Antigen-Primed Dendritic Cells Show Preserved Migrating Capabilities and CCR7 Expression and F3 Is Effective in Immunotherapy of Visceral Leishmaniasis. **Front Immunol**, 9, p. 967, 2018.
50. NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. **Vet Res**. 2011.

51. OLIVEIRA, F.; GIORGOBIANI, E.; GUIMARAES-COSTA, A. B.; ABDELADHIM, M. *et al.* Immunity to vector saliva is compromised by short sand fly seasons in endemic regions with temperate climates. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 7990, May 14 2020.
52. OLIVEIRA, J. C. Avaliação da eficácia do imunoestimulante Parapoxvirus ovis inativado (PPVOi) no tratamento da leishmaniose cutânea murina e aplicação da técnica de in vivo near-infrared fluorescence imaging / **Tese de Doutorado**. Janaina Correia Oliveira. - Recife: [s.n.], 2016.
53. OMS - World Health Organization. Leishmaniasis Fact sheets. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 10 jun. 2020.
54. OTT, K. J.; HANSON, W. L.; STAUBER, L.A. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. **J Parasitol**. 1967.
55. PALOQUE, L.; VIDAL, N.; CASANOVA, M.; DUMETRE, A. *et al.* A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on *Leishmania*. **J Microbiol Methods**, 95, n. 3, p. 320-323, Dec 2013.
56. PELLISON, N. C. Triagem de compostos com atividade leishmanicida em macrófagos. **Dissertação (Mestrado) USP**. Ribeirão Preto, 2018.
57. PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A. *et al.* Global distribution maps of the leishmaniasis. **Elife**, 3, Jun 27 2014.
58. REIMAO, J. Q.; OLIVEIRA, J. C.; TRINCONI, C. T.; COTRIM, P. C. *et al.* Generation of luciferase-expressing *Leishmania infantum* chagasi and assessment of miltefosine efficacy in infected hamsters through bioimaging. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 2, p. e0003556, Feb 2015.
59. REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, 7, n. 9, p. 581-596, Sep 2007.
60. ROCHA, M. N., CORRÊA, C. M., MELO, M. N., BEVERLEY, S. M., MARTINS-FILHO, O. A., MADUREIRA, A. P., & SOARES, R. P. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 75(3), 282–291. 2013.
61. ROBERTS, C.W., MCLEOD, R., RICE, D.W., GINGER, M., CHANCE, M.L., GOAD, L.J., Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Mol. Biochem. Parasitol**. 126, 129–142. 2003.
62. ROBERTSON, S. J.; LEMIRE, P.; MAUGHAN, H.; GOETHEL, A. *et al.* Comparison of Co-housing and Littermate Methods for Microbiota Standardization in Mouse Models. **Cell Rep**, 27, n. 6, p. 1910-1919 e1912, May 7 2019.
63. ROGERS, M. E.; CORWARE, K.; MULLER, I.; BATES, P. A. *Leishmania infantum* proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. **Microbes Infect**, 12, n. 11, p. 875-879, Oct 2010.

64. ROMANO, A.; DORIA, N. A.; MENDEZ, J.; SACKS, D. L. *et al.* Cutaneous Infection with *Leishmania major* Mediates Heterologous Protection against Visceral Infection with *Leishmania infantum*. **J Immunol**, 195, n. 8, p. 3816-3827, Oct 15 2015.
65. ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, 4, n. 1, p. e584, Jan 19 2010.
66. ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J. F. *et al.* *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol**, 1, p. 17, 2001.
67. SACKS D. L.; MELBY P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Curr Protoc Immunol**. 2001.
68. SAHA, G.; KHAMAR, B.M.; SINGH, O.P.; SUNDAR, S.; DUBEY, V.K.; *Leishmania donovani* evades caspase 1 dependent host defense mechanism during infection. **Int J Biol Macromol**, 126, pp. 392-401. 2019.
69. SALGUERO, F. J.; GARCIA-JIMENEZ, W. L.; LIMA, I.; SEIFERT, K. Histopathological and immunohistochemical characterisation of hepatic granulomas in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: a time-course study. **Parasit Vectors**. 2018.
70. DA SILVA, A. C.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; ZAHA, A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2003.
71. SINGH N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Indian J Med Res**. 2006.
72. SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, 16, n. 9, p. 581-592, Sep 2016.
73. SVS-MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gráficos da situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral no Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Outubro de 2017.
74. SHARMA, R.; SILVEIRA-MATTOS, P. S.; FERREIRA, V. C.; RANGEL, F. A. *et al.* Generation and Characterization of a Dual-Reporter Transgenic *Leishmania braziliensis* Line Expressing eGFP and Luciferase. **Front Cell Infect Microbiol**, 9, p. 468, 2019.
75. SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Exp Parasitol**, 99, n. 2, p. 97-103, Oct 2001.
76. STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol**. 2007.
77. SUNDAR, S. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther. Clin. Risk Manag.* 3, 733–740. 2007.

78. SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2002.
79. SUNDAR, S.; SINHA, P.K.; RAI, M.; VERMA, D.K.; NAWIN, K.; ALAM, S.; CHAKRAVARTY, J.; VAILLANT, M. *et al.* Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **Lancet** 377, 477–486. 2011.
80. TAVARES J.; SANTARÉM N.; CORDEIRO-DA-SILVA A. Quantification of *Leishmania* Parasites in Murine Models of Visceral Infection. **Methods Mol Biol.** 2019
81. TERRAZAS, C.; VARIKUTI, S.; OGHUMU, S.; STEINKAMP, H. M.; ARDIC, N.; KIMBLE, J.; NAKHASI, H.; SATOSKAR, A. R. Ly6C^{hi} inflammatory monocytes promote susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Sci Rep.** 2017.
82. TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**, 6, p. 750, 2017.
83. YAO, C., WILSON, M.E. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. **Parasites Vectors** 9, 200. 2016.
84. ZAGHLOUL, I.Y., AL-JASSER, M.. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 98, 793–800. 2004.
85. ZAMBONI, D. S.; RABINOVITCH, M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. **Infect Immun**, 71, n. 3, p. 1225-1233, Mar 2003.
86. ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; PEREIRA, L. I. *et al.* *In vitro* sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Trop Med Int Health**, 15, n. 1, p. 68-76, Jan 2010.