JORDANA CRISTINA OLIVEIRA

Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2014**

JORDANA CRISTINA OLIVEIRA

Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Biologia da Relação Patógeno – Hospedeiro

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Silvia Reni Bortolin Uliana

Versão original

**São Paulo
2014**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Oliveira, Jordana Cristina.

Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase / Jordana Cristina Oliveira. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular de *Leishmania*; Potenciais alvos para quimioterapia das leishmanioses.

Versão do título para o inglês: Development of alternative strategies for drug testing: obtainment and characterization of stable mutant strains of *Leishmania* expressing luciferase.

1. Parasitologia 2. Biologia molecular 3. Quimioterápicos 4. *Leishmania* I. Uliana, Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0136/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jordana Cristina Oliveira.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 104 nas fls. 133 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Silvia Reni Bortolin Uliana**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de estratégias para teste de drogas: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de Leishmania expressando luciferase*" do qual participam o(s) aluno(s) **Jordana Cristina Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 10.08.2012, com validade de 4 anos.

São Paulo, 10 de agosto de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico esta dissertação de Mestrado primeiramente a Deus, por transmitir a sua paz. Aos meus pais Inácio e Angela, por sempre acreditarem em mim, ao meu irmão Jordan, por ser exemplo de persistência e amizade. Dedico ainda a todos os meus familiares e amigos pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me instruindo, me confortando e me devolvendo cada dia a alegria de viver. A Nossa Senhora, por ser minha mãezinha e me pegar no colo transmitindo seu amor de mãe. A São Pio de Pitrelcina, por ser meu amigo fiel e protetor.

À minha família, pelo apoio e orações. Aos meus pais Inácio e Angela, por confiarem em mim e lutarem cada minuto para a realização dos meus sonhos. Ao meu irmão Jordan, pelo amor transmitido e por ser exemplo em todos os momentos da minha vida. Ao meu avô Sebastião, por todo o conhecimento transmitido. A todos os meus primos, por estarem sempre presentes na minha vida. Aos meus amigos pelas conversas, companheirismo, descontração e admiração. Ao meu afilhado Pietro, por me fazer sentir especial. Aos meus amigos do grupo Anel de Tucum, por todos os momentos que passamos juntos e as minhas amigas da república pela convivência e amizade.

À Professora Silvia Reni Bortolin Uliana, por me conceder a oportunidade de realizar o mestrado. A todos os momentos de aprendizado e conversas, pela paciência e carinho nos momentos de desânimo e por todo o apoio recebido para que a conclusão deste trabalho pudesse acontecer. Agradeço também pela compreensão nos momentos em que senti saudade dos meus familiares e me concedeu a permissão para que eu viajasse, enfim por todos os momentos que compartilhamos durante os dois anos e meio de convivência.

Aos meus amigos de laboratório Adriano, Anna, Caroline, Cristiana, Grazielle, Juliana e Jenicer pelo companheirismo na realização de cada experimento, a amizade na transmissão de um sorriso, pelo apoio nos momentos mais difíceis e pela troca de conhecimento. Agradeço por serem a minha família em São Paulo, pelos momentos de comemorações e de incentivo.

Aos amigos do departamento Paola, Oneida, Carla pelas conversas, caronas, almoços.

A todos do laboratório da Professora Marta Teixeira pelo acolhimento no início do mestrado. A Carminha pela ajuda no sequenciamento.

A todos do laboratório do Professor Paulo Cesar Cotrim em especial a Técnica Mussya, por me ajudar nos experimentos com Hamster.

A todos do laboratório da Professora Beatriz Stolf, pelos momentos de aprendizado, pelas dicas recebidas e por sempre estarem disponíveis para ajudar.

Ao laboratório da Professora Tânia Katzin, por ter permitido a utilização do leitor de placas.

Ao laboratório do Professor Alejandro Miguel Katzin, pelos empréstimos de materiais.

A todos do laboratório do Professor Mauro Cortez, por emprestar os anticorpos, pela companhia na sala de cultura, das risadas e descontração.

À Professora Andréa Cristina, por disponibilizar o NanoDrop para a quantificação das minhas amostras.

À Professora Silvia Boscardin, pela doação dos camundongos C57BL/6 Nocaute.

Aos técnicos do departamento, a Marinete por manter a limpeza dos materiais, aos funcionários de limpeza e segurança.

“A oração é a melhor arma que temos, é a chave que abre o coração de Deus.”

Padre Pio de Pitrelcina

RESUMO

Oliveira JC. Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos pela picada de insetos vetores conhecidos como flebotomíneos, representando um complexo de doenças com amplos espectros clínicos e diversidade epidemiológica. No Brasil, as principais espécies causadoras da leishmaniose cutânea são *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O tratamento da leishmaniose apresenta diversas dificuldades, como a necessidade de administração parenteral dos fármacos disponíveis, alto custo, toxicidade, efeitos colaterais severos e o desenvolvimento de resistência dos parasitas frente aos fármacos, sendo este último um fator responsável pelo aumento no número de casos não responsivos ao tratamento tradicional. A descoberta de novos fármacos ativos no tratamento de leishmaniose é, portanto, fundamental. A enzima luciferase é um repórter muito utilizado em testes de seleção de novos fármacos. Esta enzima catalisa a reação de oxidação da luciferina na presença de ATP emitindo luz, que pode ser detectada em células cultivadas *in vitro* e também em animais íntegros, através da técnica de bioimageamento. Neste trabalho, propusemo-nos a produzir linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* expressoras de luciferase e caracterizar o comportamento das linhagens mutantes em testes de sensibilidade a fármacos e de infecção *in vitro* e *in vivo*. A introdução do gene que codifica luciferase foi obtida pelo método de recombinação homóloga com integração no DNA ribossômico. Confirmou-se a emissão de luz pelas linhagens mutantes das duas espécies de *Leishmania*, em promastigotas e amastigotas. O comportamento das linhagens mutantes obtidas em relação a curvas de crescimento, sensibilidade aos fármacos tamoxifeno e anfoterina B em promastigotas, perfil de infectividade e sobrevivência em macrófagos e sensibilidade de amastigotas à anfotericina B foi comparado ao comportamento das linhagens parentais, não sendo observadas diferenças significativas. Camundongos BALB/c infectados com a linhagem expressora de luciferase de *L. (L.) amazonensis* desenvolveram lesões comparáveis aos animais infectados com a cepa selvagem, sendo possível quantificar a carga parasitária nesses animais através de bioimageamento. Os resultados obtidos neste trabalho

indicam que os parasitas mutantes expressores de luciferase obtidos podem ser utilizados em testes de sensibilidade a fármacos tanto *in vitro* como *in vivo*, representando um avanço metodológico nessa área de pesquisa.

Palavras-chave: *Leishmania*. Transfecção. Genes repórteres. Luciferase

ABSTRACT

Oliveira JC. Development of alternative strategies for drug testing: obtainment and characterization of stable mutant strains of *Leishmania* expressing luciferase. [Master thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Leishmaniasis is a disease complex with great clinical and epidemiological diversity, caused by protozoan parasites transmitted by the bite of phlebotomine sandflies. In Brazil, the main causative species of cutaneous leishmaniasis are *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The treatment of leishmaniasis presents several difficulties, such as the need for parenteral administration of the drugs available, high cost, toxicity, severe side effects and development of drug resistance, the latter being a factor responsible for the increase in the number of cases that are unresponsive to traditional treatment. The discovery of new active drugs for the treatment of leishmaniasis is therefore fundamental. The enzyme luciferase is a reporter widely used in screening tests for new drugs. This enzyme catalyzes the oxidation of luciferase in the presence of ATP emitting light that can be detected in cultured cells *in vitro* as well as in intact animals, using the technique of bioimaging. In this work, we sought to produce strains of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* expressing luciferase and characterized the behavior of these mutant strains in drug susceptibility tests and in *in vitro* and *in vivo* infections. The introduction of the luciferase encoding gene was obtained through homologous recombination into the ribosomal DNA locus. Production of light was detected in mutants of both species, in all life cycle stages. Mutant strains were compared to their corresponding parental lines as to their growth pattern, infectivity and survival profile in macrophages and sensitivity to amphotericin B and tamoxifen. No significant differences were observed for these parameters. BALB/c mice infected with the luciferase expressing line of *L. (L.) amazonensis* developed lesions comparable to those in animals infected with the wild-type strain. The parasite load in these animals was quantified through bioimaging. The results obtained in this study indicate that the mutant parasites expressing luciferase can be used for drug susceptibility testing *in vitro* and *in vivo*, representing a methodological advance in this area of research.

Keywords: *Leishmania*. Transfection. Reporter genes. Luciferase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELAS

Tabela 1 - Incidência de leishmaniose cutânea no Brasil: ano de 2012.....	26
Tabela 2 - Incidência de leishmaniose visceral no Brasil: ano de 2012.....	27
Tabela 3 - Esquema representativo das indicações de primeira e segunda escolha no tratamento da leishmaniose.....	31
Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.....	39
Tabela 5 - Concentrações inibitórias 50% (CI ₅₀) de anfotericina B e tamoxifeno determinadas para promastigotas das linhagens selvagem e mutante.....	65
Tabela 6 - Concentrações inibitórias 50% (CI ₅₀) de anfotericina B determinadas para amastigotas das linhagens selvagem e mutante.....	70
Tabela 7 - Exemplos de parasitas e genes repórteres utilizados na pesquisa.....	76

FIGURAS

Figura 1 - Ciclo celular do parasita <i>Leishmania spp.</i>	21
Figura 2 - Aspectos clínicos em pacientes portadores da leishmaniose.....	23
Figura 3 - Desenho esquemático de plasmídios utilizados como base para a construção do cassete luciferase.....	54
Figura 4 - Amplificação dos fragmentos <i>luc2</i> e 3' UTR α -tubulina.....	54
Figura 5 - Representação esquemática da reação de “PCR overlap”.....	55
Figura 6 - Ligação dos fragmentos <i>luc2</i> e α - <i>tub</i> por “PCR overlap”.....	55
Figura 7 - Esquema da clonagem do inserto <i>luc2atub</i> ao plasmídio <i>pSSUint</i>	56
Figura 8 - Confirmação da orientação do inserto <i>luc2α-tub</i> no plasmídio <i>pSSUint</i>	57
Figura 9 - Estratégia de sequenciamento do gene <i>luc2</i> na construção obtida.....	58
Figura 10 - Correlação entre a atividade da luciferase e o número de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> (A) e <i>L. (L.) amazonensis</i> (B).....	59
Figura 11 - PCR de DNA genômico das linhagens mutantes e selvagens.....	61
Figura 12 - Correlação entre a atividade de luciferase e o número de promastigotas em clones transgênicos de <i>L. (V.) braziliensis</i> (A) e <i>L. (L.) amazonensis</i> (B).....	61
Figura 13 - Comparação da intensidade de luz entre os clones transgênicos de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	62
Figura 14 - Correlação entre a atividade da luciferase e o número de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> (A) e <i>L. (L.) amazonensis</i> (B) mantidos ou não com pressão de higromicina.....	62
Figura 15 - Correlação entre a atividade da luciferase e o número de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> (A) e <i>L. (L.) amazonensis</i> (B) na fase log e estacionária de cultura.....	63
Figura 16 - Curva de crescimento de <i>L. (V.) braziliensis</i> (A) e <i>L. (L.) amazonensis</i> (B) selvagem e mutante.....	64
Figura 17 - Curva dose-resposta de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem e mutante frente ao fármaco anfotericina B.....	65
Figura 18 - Curva dose-resposta de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem e mutante frente ao fármaco tamoxifeno.....	65
Figura 19 - Infecção de macrófagos com <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagem e expressora de luciferase.....	67
Figura 20 - Infecção de macrófagos com <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem e expressora de luciferase.....	68

Figura 21 - Infecção de macrófagos com <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem e mutantes LbLUC3 e LaLUC3 ao longo do tempo.....	70
Figura 22 - Curva dose-resposta de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem e mutante frente ao fármaco anfotericina B.....	71
Figura 23 - Acompanhamento da lesão em camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagem e LaLUC3.....	72
Figura 24 - Bioluminescência de camundongos BALB/C infectados com <i>L. (V.) braziliensis luc2</i>	73
Figura 25 - Bioluminescência em camundongos BALB/C infectados com <i>L. (L.) amazonensis luc2</i> ..	73
Figura 26 - Avaliação da carga parasitária em camundongos infectados com LaWT e LaLUC3..	74
Figura 27 - Infecção de hamster com <i>L. (V.) braziliensis</i>	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
BSA	Albumina sérica bovina
CI ₅₀	Concentração inibitória para 50% da cultura
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Gás carbônico
D.O.	Densidade ótica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
g	Grama
IFN-γ	Interferon gama
kb	Quilobase
mg	Miligrama
mM	Milimolar
RNA _m	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
N	Normal
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PBS	Salina em tampão fosfato
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SL	Spliced leader
TAE	Tampão Tris – acetato – EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetrametilnodiamina
Tris	Tris (hidroximetilaminometano)

URL	Unidades relativas de luz
UTR	Regiões não codificantes
v/v/v	volume/volume/volume
xg	Aceleração da gravidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ASPECTOS GERAIS	19
1.2 CICLO DE VIDA.....	20
1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	21
1.4 LEISHMANIOSE VISCERAL	24
1.5 EPIDEMIOLOGIA	25
1.6 CO-INFECÇÃO LEISHMANIA/HIV	27
1.7 DIAGNÓSTICO	28
1.8 TRATAMENTO	29
1.9 FERRAMENTAS PARA A BUSCA DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS ALTERNATIVOS.....	32
1.10 INTRODUÇÃO DE GENES EXÓGENOS EM LEISHMANIA	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 MATERIAL.....	38
3.1.1 ORGANISMOS	38
3.1.1.1 LEISHMANIA SPP.	38
3.1.1.2 BACTÉRIAS	38
3.1.1.2.1 Escherichia coli.....	38
3.1.1.3 CAMUNDONGOS	38
3.1.1.4 PLASMÍDIOS	38
3.1.1.4.1 pCR2.1-Topo	38
3.1.1.4.2 pLUC2	38
3.1.1.4.3 pSSUint.....	39
3.1.1.4.4 pSPaHYGa.....	39
3.1.1.5 OLIGONUCLEOTÍDEOS	39
3.1.1.6 FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS.....	40
3.1.1.7 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E T4 DNA LIGASE.....	40
3.1.1.8 REAGENTES	40
3.1.1.8.1 ONE-Glo™ Luciferase Assay System	40
3.1.1.8.2 VivoGlo™ Luciferin.....	41
3.2 MÉTODOS.....	41
3.2.1 CULTURA DE PROMASTIGOTAS DE LEISHMANIA.	41
3.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA	41
3.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM LARGA ESCALA	42
3.2.4 PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM PEQUENA ESCALA	42
3.2.5 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)	43
3.2.6 ELETROFORESE DE DNA	44
3.2.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	44
3.2.8 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS	44
3.2.9 CLONAGEM MOLECULAR	45
3.2.9.1 PREPARAÇÃO DA BACTÉRIA COMPETENTE	45
3.2.9.2 PREPARAÇÃO DO VETOR	45
3.2.9.3 PREPARAÇÃO DO INSERTO	45

3.2.10.1 ELETROPORAÇÃO	46
3.2.10.2 OBTENÇÃO DE CLONES	47
3.2.11 CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES.....	47
3.2.11.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE PROMASTIGOTAS IN VITRO.....	47
3.2.11.2 ATIVIDADE DE LUCIFERASE.....	47
3.2.11.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE MTT.....	48
3.2.12 ENSAIOS DE INFECÇÃO IN VITRO E SOBREVIVÊNCIA DE AMASTIGOTAS	48
3.2.12.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE MONÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA	48
3.2.12.2 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS IN VITRO.....	49
3.2.12.3 TRATAMENTO DAS CULTURAS INFECTADAS.....	49
3.2.13 ENSAIOS IN VIVO	49
3.2.13.1 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS.....	49
3.2.13.2 QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA:DILUIÇÃO LIMITANTE.....	50
3.2.13.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA : BIOIMAGEAMENTO	50
3.2.14ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS	52
4.1. OBTENÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS EXPRESSORAS DE LUCIFERASE	53
4.1.1 CONSTRUÇÃO DE CASSETE CONTENDO O GENE QUE CODIFICA LUCIFERASE	53
4.1.2 CLONAGEM MOLECULAR.....	56
4.1.3 TRANSFEÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSORES DE LUCIFERASE	58
4.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS LINHAGENS MUTANTES	63
4.2.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE PROMASTIGOTAS.....	63
4.2.2 SUSCETIBILIDADE A ANFOTERICINA B E TAMOXIFENO EM PROMASTIGOTAS DE LINHAGENS EXPRESSORAS DE LUCIFERASE	64
4.2.3 INFECTIVIDADE DAS LINHAGENS MUTANTES	67
4.2.4 SOBREVIVÊNCIA DE AMASTIGOTAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS	68
4.2.5 SUSCETIBILIDADE DE AMASTIGOTAS DE LINHAGENS EXPRESSORAS DE LUCIFERASE À ANFOTERICINA B	69
4.2.6 TESTES IN VIVO	70
4.2.6.1 INFECTIVIDADE EM CAMUNDONGOS	70
4.2.6.2 BIOIMAGEAMENTO.....	71
4.2.7.3 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR DILUIÇÃO LIMITANTE	72
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A leishmaniose é uma doença com amplo espectro de manifestações clínicas causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Estes são parasitas digenéticos que tem como hospedeiros naturais diversos mamíferos e são transmitidos através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. As formas clínicas principais são a leishmaniose tegumentar e a visceral.

Os agentes etiológicos da leishmaniose foram descobertos por Cunningham que descreveu, no ano de 1885, formas amastigotas em casos de calazar na Índia. Em 1903, Leishman e Donovan descreveram pela primeira vez o protozoário responsável pelo calazar indiano, que foi denominado por Ross como *Leishmania donovani*. No mesmo ano Wright nomeou de *Leishmania tropica* o parasito isolado de uma criança com leishmaniose cutânea e a partir de 1904, relatos demonstraram que havia registro de alguns casos na China não sendo a doença restrita à Índia (Hoare, 1938; Rey, 2001).

No ano de 1908, Nicolle verificou através das observações de casos de calazar que estavam ocorrendo no Mediterrâneo, que as manifestações eram diferentes das causadas pela leishmânia em outras regiões, estabelecendo assim uma nova espécie, a *Leishmania infantum*. Um ano depois, Gaspar Vianna observou que, com a derrubada da mata para a construção de uma ferrovia, no interior de São Paulo, vários operários da construtora apresentaram feridas de difícil cicatrização e que em alguns casos acometia o nariz, desfigurando a face. Esta doença era conhecida como úlcera de Bauru ou ferida brava e a espécie causadora desta patologia foi denominada por ele como *Leishmania braziliensis* (Rath et al., 2003). Atualmente são conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania*, sendo que cerca de 20 dessas causam doença humana. Essas espécies são subdivididas em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Ashford, 2000).

No mundo cerca de 310 milhões de pessoas em 98 países, estão em áreas com risco de infecção por *Leishmania* (WHO, 2014). O impacto desta doença na saúde pública foi por muito tempo subestimado e apenas recentemente a mesma foi incluída entre as prioridades para ações de controle de doenças tropicais (Alvar et al., 2012).

1.2 CICLO DE VIDA

O ciclo biológico de *Leishmania* é heteroxeno e envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados (Figura 1). Os hospedeiros invertebrados são insetos conhecidos como flebotomíneos e os principais hospedeiros vertebrados são os humanos, os mamíferos silvestres (preguiça, gambá, vários roedores) e animais domésticos como o cão. Durante o ciclo o parasita se apresenta em duas formas principais: a forma amastigota e a forma promastigota. A forma amastigota é a forma intracelular, ovalada, com núcleos grandes e redondos e com flagelo não aparente. A forma promastigota está presente no inseto vetor, desenvolve-se no ambiente extracelular, é alongada e possui um núcleo central e um longo flagelo (Ashford, 2000).

Os insetos vetores da leishmaniose são denominados flebotomíneos e pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus* no velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. São encontrados principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Os principais transmissores da leishmaniose cutânea no Brasil são: *L. flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*. Na leishmaniose visceral a principal espécie transmissora é *L. longipalpis* (Brasil, 2010).

Esses insetos são nomeados popularmente de acordo com a localização geográfica, sendo conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, etc. Possuem aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com pernas longas e delgadas, com o corpo densamente piloso, sendo importante notar que as fêmeas são as responsáveis pela transmissão, por conter o aparelho bucal adaptado para picar a pele de vertebrados e sugar sangue (Brasil, 2010).

O ciclo da leishmânia no hospedeiro invertebrado se limita ao trato digestivo do flebotomíneo, e a localização exata dentro do inseto difere entre os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. As leishmânias do subgênero *Viannia* ocupam e se multiplicam largamente no intestino posterior definindo a Seção Peripylaria. No entanto, a maioria das leishmânias do subgênero *Leishmania* se restringe ao intestino médio e são por isso classificadas na Seção Suprapylaria. As amastigotas ingeridas pelo inseto junto com o bolo alimentar se transformam em promastigotas procíclicas no intestino médio. Estas são as formas replicativas que apresentam um curto flagelo. Na digestão do bolo alimentar é formada a matriz peritrófica sendo esta uma barreira quitinosa e semipermeável onde ocorre a ação de enzimas e a saída de nutrientes. Para não serem excretados os parasitas escapam da matriz peritrófica migrando para o lúmen do intestino médio e posteriormente para a parte anterior do intestino médio, sendo que nesse processo as formas promastigotas passam por diferentes transformações e se

multiplicam. Quando os parasitas colonizam a válvula estomodeal elas se transformam em promastigotas metacíclicas (forma infectante) e migram para a probóscide do inseto, acumulando-se nessa região. Esses parasitas serão injetados na derme do hospedeiro mamífero no próximo repasto sanguíneo (Sacks, Kamhawi, 2001).

As promastigotas no hospedeiro mamífero são fagocitadas pelas células de defesa do sistema imune inato e os macrófagos são as principais células infectadas. No interior dos macrófagos ocorre a formação de um vacúolo digestivo (fagolisossomo) a partir da fusão do lisossomo com o fagossoma. Nesta organela ocorre a diferenciação das promastigotas em amastigotas e estas se multiplicam constantemente. Com o elevado número de amastigotas intracelulares a célula se rompe, liberando as leishmânias no meio intercelular e consequentemente infectando outras células (Rogers et al., 2004).

Figura 1 - Ciclo celular do parasita *Leishmania* spp.
Fonte: CDC (2013).

1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A leishmaniose tegumentar ou cutânea é uma doença de larga distribuição geográfica. No Brasil, os primeiros estudos sobre essa doença foram feitos por Gaspar Vianna em 1911 e o parasita foi nomeado de *L. braziliensis* por ser considerado diferente da *L.*

tropica. A forma mucosa da doença foi identificada por Splendore e foi Aragão que demonstrou experimentalmente pela primeira vez o papel do flebotômíneo na transmissão de leishmaniose tegumentar (Rey, 2001), sendo identificado o inseto vetor do gênero *Lutzomya* (Grimaldi et al., 1989).

Atualmente são reconhecidas 11 espécies dermatrópicas que causam a doença em humanos e 8 espécies que causam a doença somente em animais. No Brasil foram identificadas 7 espécies causadoras da leishmaniose cutânea, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. Maior frequência de infecção no Brasil está relacionada às espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (Grimaldi et al., 1989).

L. (V.) braziliensis tem ampla distribuição desde o sul do Pará ao Nordeste, atingindo algumas áreas da Amazônia Oriental e o centro-sul do país. *L. (L.) amazonensis* está presente no Nordeste (Bahia), no sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e no Centro Oeste (Goiás), mas tem sua principal distribuição nas florestas primárias e secundárias da Amazônia, principalmente na floresta tipo várzea e nas áreas de igarapé, nos estados de Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão. *L. (V.) guyanensis* é encontrada principalmente nas florestas de terra firme, nas áreas que não se alagam no período de chuvas, limitadas à Bacia Amazônica (Amazonas, Amapá, Roraima e Pará) abrangendo também as Guianas (Basano As, 2004).

As manifestações clínicas na leishmaniose tegumentar americana variam dependendo da espécie da leishmânia, da localização da lesão, e da imunidade celular do hospedeiro (Figura 2) (Schwartz et al. 2006).

As lesões típicas encontradas em pacientes com leishmaniose tegumentar são ulcerações indolores, arredondadas ou ovaladas e que se localizam principalmente nas áreas expostas da pele, o que provavelmente está relacionado a áreas expostas à picada dos insetos vetores. Apresentam bordas elevadas e bem delimitadas com granulações grosseiras. A ocorrência de infecção secundária por bactérias na lesão leva ao aparecimento de dor local e produção de exsudato seropurulento. Menos frequentemente podem aparecer lesões nodulares ou pequenas pápulas como de uma picada de inseto, que crescem aumentando o tamanho e a profundidade. Lesões primárias ou secundárias podem também assumir a forma de lesões vegetantes, que são caracterizadas por seu aspecto papilomatoso, úmido e de consistência mole ou lesões verrucosas, que possuem superfície seca, áspera, e com presença de pequenas crostas e descamação. Estas lesões podem evoluir para a cura espontânea, em um período de poucos meses, ou permanecer durante anos (Schwartz et al. 2006).

A forma mucocutânea, também conhecida como cutâneo-mucosa, é causada geralmente por *L. (V.) braziliensis*. Os sintomas relatados primeiramente pelos pacientes são de obstrução nasal e com a progressão da ulceração reclamam de dor. Geralmente as lesões atingem a região nasal ou a região bucofaringiana (Rey, 2001). O comprometimento das mucosas pode se manifestar semanas ou anos após a cura da lesão cutânea inicial, ocorrendo destruição do septo nasal, provocando no indivíduo afetado uma aparência de focinho de anta, pois provoca o abaixamento da ponta do nariz e a inflamação no lábio superior. Em casos mais graves de acometimento do dorso do nariz, as lesões se espalham para a região da face, e podem acometer o palato, faringe e a laringe, levando o indivíduo a se excluir da sociedade (Rey, 2001; Schwartz et al., 2006).

A forma cutânea difusa é uma manifestação rara e severa relacionada à anergia do sistema imunológico e tem como agente etiológico a *L. (L.) amazonensis*. Esta manifestação não é limitada à América do Sul, ocorrendo também na Índia e África em pacientes co-infectados por *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major* e HIV (Khandelwal et al., 2011). As lesões são nodulares e atingem diversas áreas do corpo como face, orelha, troncos e membros podendo levar a mutilação dos mesmos. No exame histopatológico há presença de alta carga parasitária (Ashford, 2000).

Tem sido observado que cerca de 30% dos pacientes com leishmaniose cutânea apresentam também manifestações sistêmicas como febre, mal-estar, dores musculares, emagrecimento e anorexia.

Figura 2 - Aspectos clínicos em pacientes portadores da leishmaniose

1.4 LEISHMANIOSE VISCERAL

Em 1913 Mignone diagnosticou o primeiro caso brasileiro de leishmaniose visceral em paciente proveniente do estado do Mato Grosso (Costa et al., 1995). Esta doença tem evolução crônica, sendo caracterizada por febre irregular e prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia e, em sua fase terminal, caquexia (Brasil, 2006; Rey, 2001). Na ausência de tratamento, os pacientes com leishmaniose visceral quase invariavelmente vão à óbito e mesmo com o acesso ao tratamento, a porcentagem de casos fatais varia de 10 a 20% (Alvar et al., 2006).

As espécies causadoras da leishmaniose visceral no mundo são *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e a *L. (L.) infantum chagasi*, sendo a última a espécie causadora desta doença no Brasil. Em nosso meio, a leishmaniose visceral se distribui principalmente nas regiões nordeste (maior prevalência), sudeste e centro-oeste (Alvar et al., 2006).

O sistema macrofágico apresenta hipertrofia e hiperplasia, justificando o aparecimento de hepatomegalia e esplenomegalia, pois as células reticulares e os macrófagos se multiplicam exageradamente e o seu citoplasma se torna abundante, com presença de parasitas ou não. O linfonodo fica com elevada carga parasitária, como também a medula óssea, que é acometida com esta superpopulação de parasitas, e como consequência há substituição do tecido hematopoiético, afetando a produção de células sanguíneas, comprometendo toda a função imunológica do hospedeiro. O paciente com leishmaniose visceral, dentre as principais alterações laboratoriais apresenta anemia (Rey, 2001). Esta anemia é considerada multifatorial por ser causada pelo sequestro e destruição de hemácias no baço, por deficiência de ferro, mecanismos imunes (Woodruff, 1973) e alteração da eritropoese (Lafuse et al., 2013).

O número de casos graves ou sintomáticos é menor quando comparado com o número de indivíduos infectados, o que determina a maior frequência de casos inaparentes, ou também chamados de assintomáticos. Nesta forma, o paciente não apresenta nenhum sintoma clínico, mas há positividade nos testes sorológicos ou no teste intradérmico e parasitos estão presentes nos tecidos.

A forma oligossintomática apresenta-se como um quadro de febre baixa ou ausente e adinamia; estão presentes também hepatomegalia e a esplenomegalia que quando detectadas, são discretas.

Na forma clássica, os sintomas mais presentes são: febre, astenia, adinamia, anorexia, perda de peso e caquexia. Por possuir um quadro de evolução prolongada, ocorre

queda de cabelos, crescimento e brilho dos cílios e edema de membros inferiores, caracterizando um forte comprometimento no estado nutricional do paciente. Ocorre ainda hepatoesplenomegalia acentuada, micropoliadenopatia generalizada e intensa palidez de pele e nas mucosas com forte anemia. Há hemorragias e as mulheres frequentemente apresentam amenorréia. Nas crianças e adolescentes ocorre um atraso no crescimento e na puberdade. Através de exames laboratoriais, verifica-se a presença de anemia acentuada, leucopenia, plaquetopenia (pancitopenia), hiperglobulinemia e hipoalbuminemia.

1.5 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que por ano no mundo ocorram 1,3 milhão de novos casos, com aproximadamente 12 milhões de pessoas atualmente afetadas pela doença. Esses números provavelmente são subestimados, pois somente 33 países de 98 considerados endêmicos possuem notificação obrigatória (WHO, 2014).

Surtos epidêmicos de grandes proporções ocorrem em alguns países como, por exemplo, o Afeganistão, por causa dos longos períodos de guerra e o difícil controle das infecções presentes, o que faz com que as condições sejam favoráveis à propagação da doença. No ano de 2002 em Cabul foram registrados 100.000 novos casos, enquanto hoje ocorrem 35.000 novos casos por ano. Outras partes do mundo também estão sendo afetadas com surtos de leishmaniose cutânea, por exemplo, as províncias do sul do Cante e Beluchistan no Paquistão, em Ban na Republica Islâmica do Irã e nos campos de Treguine e Koukou, em Chade no ano de 2007 (WHO, 2014). Os países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria juntos representam 90 % dos casos de LC no mundo (Desjeux, 2004).

A leishmaniose cutânea é a forma clínica mais comum com aproximadamente 0,7 a 1,3 milhão de novos casos por ano segundo a Organização Mundial da Saúde (2014). No ano de 2012 no Brasil foram reportados 23.004 novos casos (Tabela 1) (Datasus, 2012a).

Tabela 1 - Incidência de leishmaniose cutânea no Brasil: ano de 2012.

REGIÃO	TAXA DE INCIDÊNCIA ^a	CASOS POR ANO
Norte	61,07	9.983
Nordeste	15,07	8.124
Sudeste	1,65	1.348
Sul	1,54	426
Centro-Oeste	21,65	3.123
Total	11,86	23.004

^a Incidência por 100.000 habitantes.

Fonte: Datasus (2012).

A leishmaniose visceral é considerada uma zoonose de animais silvestres que atinge o homem através do contato com focos zoonóticos. Tradicionalmente, essa doença predominava em adultos jovens do sexo masculino e a transmissão ocorria na área rural e na periferia das áreas urbanas. Atualmente, ela apresenta um novo padrão em sua transmissão e no perfil de pacientes atingidos, sendo incluídas as crianças e mulheres.

Com relação à leishmaniose visceral os países que representam 90% dos casos em todo o mundo são: Bangladesh, Índia, Brasil, Nepal, Etiópia e Sudão. No Brasil, desde 1999 ocorreu um grande aumento no número de registros de leishmaniose visceral, observando-se a ocorrência de casos em áreas urbanas, o que antes não era comum. Isto se deve à migração da população das áreas rurais para as áreas urbanas, ocasionando o contato dos parasitas com um elevado número de pessoas não imunizadas e muitas vezes imunocomprometidas, apresentando maior vulnerabilidade à infecção como as crianças (WHO, 2014).

Cerca de 400.000 pessoas são infectadas por ano e aproximadamente 40.000 chegam a óbito (Ready, 2014). No Brasil só no ano de 2012 foram 3.058 novos casos (Tabela 2) (Datasus, 2012b).

Tabela 2 - Incidência de leishmaniose visceral no Brasil: ano de 2012

REGIÃO	TAXA DE INCIDÊNCIA ^a	CASOS POR ANO
Norte	3,68	601
Nordeste	2,71	1.460
Sudeste	0,73	597
Sul	0,02	5
Centro-Oeste	2,74	395
Total	1,58	3.058

^a Incidência por 100.000 habitantes.

Fonte: Datasus (2012).

1.6 CO-INFECÇÃO LEISHMANIA/HIV

A AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) é uma doença sexualmente transmissível que tem como causador o vírus HIV. No Brasil a AIDS teve seu primeiro caso detectado em 1980, na cidade de São Paulo, e segundo o Ministério da Saúde até junho de 2011 o Brasil registrou cerca de 608.230 casos. Esta doença leva a uma supressão do sistema imune celular do indivíduo fazendo com que ele fique mais susceptível às doenças oportunistas. Casos de leishmaniose em pacientes com AIDS tiveram um aumento expressivo desde os anos 90, destacando-se a Europa com 70% dos pacientes com co-infecção, sul da Ásia, África subsaariana e América do Sul. O Brasil é um dos países que requer maior atenção por apresentar elevados índices das duas doenças associados à urbanização da leishmaniose e à interiorização do HIV (Maia-Elkhoury et al., 2008; Rabello et al., 2003).

A leishmaniose muda a progressão da doença pelo HIV acelerando o início da AIDS, e a imunossupressão causada pelo vírus facilita a disseminação da leishmaniose. As manifestações na maioria dos casos são características da leishmaniose visceral, mas em cerca de 10 a 16% ocorrem manifestações atípicas. Dentre estas estão o acometimento de órgãos que não fazem parte do sistema mononuclear fagocítico e aumento de recidivas da doença na ausência de terapia anti-retroviral. Na doença cutânea pode ocorrer disseminação, ocorrendo o que se chama de visceralização da leishmaniose cutânea (Jarvis, Lockwood, 2012).

Em muitos casos os indivíduos descobrem que são portadores da leishmaniose através de achados em lesões ocasionadas por outras doenças oportunistas como herpes. Nos centros especializados para tratamento de leishmaniose e HIV, os portadores da co-infecção

devem ser acompanhados e avaliados, pois a progressão da doença nestes casos é mais rápida e mais severa.

1.7 DIAGNÓSTICO

As técnicas de diagnóstico aplicadas às diversas formas clínicas de leishmaniose são diferentes, mas em todos os casos busca-se o isolamento ou a identificação dos parasitas nos tecidos apropriados. O exame microscópico direto é uma forma rápida e simples para o diagnóstico de leishmaniose cutânea. O material é obtido através de aspirado de lesões cutâneas ou mucosas, raspado das bordas das lesões ou esfregaços de biópsias. O material é corado com Giemsa e, em cerca de 50% a 80% dos casos é possível observar a presença de amastigotas. Na leishmaniose visceral a punção de medula óssea é a técnica de primeira escolha para obtenção de material, tendo uma sensibilidade de 80 a 95%.

O material colhido da pele ou de medula óssea também pode ser inoculado em meio de cultura axênico ou em animais susceptíveis. A cultura, porém, é um método pouco sensível, já que ocorrem com frequência contaminações, além de ser um teste muito demorado já que pode ocorrer a positividade da cultura após 4 a 8 semanas da coleta. A combinação dos métodos de microscopia e cultura aumenta a sensibilidade para 85%.

Outro teste utilizado no diagnóstico é a Intradermo reação de Montenegro (IDRM), um método altamente específico e sensível para as leishmanioses cutânea e mucosa, sendo essencial no diagnóstico dessas formas clínicas, em que o número de parasitas é pequeno. Este teste consiste na verificação de hipersensibilidade local. Uma solução contendo antígenos de leishmânia é inserida por injeção intradérmica e após 48 horas verifica-se a formação de um processo inflamatório que é mensurável. A positividade é considerada quando há formação de induração com diâmetro maior de 5 mm. Na vigência de leishmaniose visceral, assim como em infecções cutâneas por *L. (L.) amazonensis*, o teste de Montenegro é negativo porque a resposta imune celular do paciente está deprimida.

Os testes sorológicos possuem o objetivo de detectar anticorpos anti-*Leishmania*. São utilizados os métodos de imunofluorescência e ELISA (Ensaio Imuno Enzimático). Esses métodos são bastante sensíveis, mas pouco específicos (Herwaldt, 1999).

Mais recentemente tem sido aplicados ao diagnóstico da leishmaniose visceral o teste de aglutinação direta (DAT) ou a pesquisa de anticorpos contra o antígeno K39 através de teste imunocromatográfico. Ambos os métodos são sensíveis e específicos e têm também a vantagem de poderem ser utilizados em campo, dada a simplicidade e rapidez de realização.

Outro tipo de teste diagnóstico é o molecular, utilizando-se a reação em cadeia de polimerase (PCR), que tem uma alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, essa técnica ainda não é utilizada rotineiramente no diagnóstico de leishmaniose.

Dentre os exames inespecíficos que podem auxiliar no diagnóstico de leishmaniose, estão avaliação das alterações presentes nas células sanguíneas e no metabolismo de proteínas. No hemograma observa-se anemia, leucopenia, linfocitose relativa, plaquetopenia e um achado típico que é a aneosinofilia. Nas dosagens de proteínas plasmáticas, observa-se o aumento na concentração de gama-globulina e inversão da razão entre a concentração de albumina e gama-globulina (Brasil, 2010).

1.8 TRATAMENTO

A leishmaniose tem sido descrita há séculos pelo mundo como revelam vários indícios observados em documentos e pinturas com imagens de mutilação do corpo e da face. Desde a descoberta dos causadores desta doença, diversos estudos nos grandes centros de pesquisas pelo mundo visaram entender o ciclo de vida do parasita, as diversas manifestações clínicas geradas, o mecanismo de infecção nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, a resposta imunológica do hospedeiro e a descoberta de tratamentos efetivos.

Atualmente a terapêutica da leishmaniose é um dos tópicos mais importantes, pois constitui-se em um grande problema mundial. O aumento de casos que não respondem ao tratamento tradicional leva cada vez mais indivíduos a óbito ou à exclusão da sociedade por apresentarem seu corpo mutilado. Além disso, existem dificuldades relacionadas ao tratamento disponível, sendo necessária a administração parenteral de fármacos, o alto custo principalmente dos que possuem modificações nas formulações, toxicidade, efeitos colaterais severos e desenvolvimento de resistência dos parasitas frente aos fármacos, sendo este um dos principais motivos para o insucesso na terapia da doença.

Um passo muito importante com relação à terapêutica ocorreu no ano de 1911, quando Vianna no Brasil, realizou testes utilizando antimonial trivalente e tártaro emético para tratar a leishmaniose cutânea e outras doenças. Em 1913, Christina e Caronia na Itália e Rogers na Índia em 1915 confirmaram esta eficácia utilizando o antimonial trivalente para tratar leishmaniose visceral. Neste mesmo ano Cole fez uma crítica citando as propriedades irritantes do tártaro emético. Isso levou ao descobrimento dos antimoniais pentavalentes, como uréia stibamine, stibosan e neostibosan no ano de 1920. Após este descobrimento os

antimoniais pentavalentes tornaram-se as opções de escolha para todos os tipos de leishmanioses (Frezard et al., 2009).

Entre os anos de 1935 e 1945 foram descritos os antimoniais pentavalentes: estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). Logo nos primeiros anos de utilização, esses ganharam destaque pela alta taxa de cura e menor toxicidade em comparação com os antimoniais trivalentes, tornando-se rapidamente o fármaco de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose, principalmente na Índia. Entretanto, seu mecanismo de ação e sua composição química ainda não eram conhecidos. Apesar de o uso ser obrigatoriamente parenteral, do tempo de tratamento ser prolongado, de possuir efeitos colaterais comuns e graves, de ter incidência de falha terapêutica e de ser comprovada a existência de parasitas resistentes aos antimoniais pentavalentes estes ainda são os fármacos de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose visceral e cutânea na maior parte das áreas endêmicas. O uso de antimoniais é contra-indicado em gestantes, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (Brasil, 2010). Durante o tratamento deve-se fazer acompanhamento clínico e realizar exames complementares para verificar se há sinais de efeitos colaterais.

Na década de 70 em Bihar na Índia foi reportado o primeiro indício do aparecimento de cepas resistentes frente aos antimoniais pentavalentes com 30% de falha terapêutica. As doses e o período de tratamento foram aumentados e em certas regiões da Índia encontram-se altas taxas de casos não responsivos. O aparecimento de resistência está relacionado aos pacientes que desistem do tratamento e ao uso irregular dos fármacos (Croft et al., 2006).

O fármaco de segunda linha recomendado para leishmaniose é a anfotericina B, principalmente nos casos de leishmaniose visceral. A grande preocupação com relação a este fármaco são os efeitos colaterais. Como alternativa foram desenvolvidas formulações lipídicas de anfotericina B que tem se mostrado promissoras nas respostas clínicas, sendo eficazes em baixas doses, com período menor de tratamento e com baixa nefrotoxicidade. Entretanto, seu custo é muito alto.

No Novo Mundo a leishmaniose cutânea também pode ser tratada com pentamidina, que é utilizada em casos não responsivos aos antimoniais ou nos casos de hipersensibilidade ao antimônio (Tabela 3). É uma droga que possui efeitos colaterais severos, como nefrotoxicidade, hipotensão, hipoglicemia, hiperglicemia, alterações cardiológicas e tem sido descritos casos de morte repentina (Rath et al., 2003).

Tabela 3 - Esquema representativo das indicações de primeira e segunda escolha no tratamento da leishmaniose.

Fármaco	Dose	Via	Duração	Monitoramento durante o tratamento	Acompanhamento após tratamento
Escolha					
Antimoniato de N-metil glucamina	10 - 20 mg/kg/dia de Sb ^v	EV ou IM	20 - 30 dias	Semanal	Mensal por 3 meses. Em casos de falta de resposta utilizar anfotericina B
Alternativas					
Anfotericina B	1 mg/kg/dia	EV	14 – 20 dias	Diário	Mensal por 3 meses
Anfotericina B Lipossomal	1 - 4 mg/kg/dia	EV	5 – 7 dias	Diário	Mensal por 3 meses
Isotionato de pentamidina	4 mg/kg/dia do sal dias alternados	IM ou EV	3 a 10 aplicações	Semanal	Mensal por 3 meses

Fonte: Ministério da Saúde (2010).

Na última década foi descrito o primeiro fármaco de uso oral para o tratamento de leishmaniose, este fármaco é a miltefosina que demonstrou atividade no tratamento da leishmaniose visceral (Sundar et al., 2000) nos casos de resistência ao antimônio (Jha et al., 1999) e contra leishmaniose cutânea (Soto et al., 2001). A miltefosina é utilizada como primeira escolha no tratamento da leishmaniose na Índia, mas estudos tem demonstrado *in vitro* e *in vivo* que casos de recidivas de pacientes com leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea pós visceral (PKDL) estão associados a diminuição da sensibilidade à miltefosina de parasitas isolados destes pacientes (Bhandari et al., 2012; Sundar, 2001) Alguns trabalhos demonstram que as leishmânias do Novo Mundo possuem menor sensibilidade à miltefosina o que resulta em menor eficácia clínica em comparação com o tratamento de pacientes infectados com espécies de leishmânia do Velho Mundo (Alvar et al., 2006; Velez et al., 2010).

Alguns fármacos encontram-se atualmente em fase de estudo clínico (por exemplo paromomicina) ou pré-clínico. Dentre os últimos anos, podemos citar o tamoxifeno, um exemplo de reposicionamento de fármacos. O tamoxifeno é utilizado no tratamento e prevenção do câncer de mama por sua atividade moduladora do receptor de estrógeno. (Miguel et al., 2007). Foi demonstrado que o tamoxifeno possui atividade leishmanicida *in vivo* em espécies causadoras de leishmaniose cutânea (*L. (L.) amazonensis* e *L. (V.)*

braziliensis) e visceral (*L. (L.) chagasi*) em modelos de camundongo e hamster. Para as doses e modelos experimentais utilizados foi comprovada boa tolerância e poucos efeitos adversos (Miguel et al., 2008; Miguel et al., 2009). Estudos de associação de fármacos também foram realizados demonstrando interação indiferente quando avaliou-se a ação combinatória do tamoxifeno e anfotericina B (Trinconi et al., 2014).

Dados todos os problemas do tratamento da leishmaniose é necessário procurar novas alternativas que sejam eficientes. Os principais alvos dos grupos de pesquisas para a busca de alternativas são produtos de origem natural, “screening” de bibliotecas de compostos, caracterização de enzimas do parasita, busca de inibidores específicos e o reposicionamento de fármacos, além de esquemas de combinação de drogas.

1.9 FERRAMENTAS PARA A BUSCA DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS ALTERNATIVOS

Os genes repórteres são sequências de nucleotídeos introduzidas em um sistema biológico que permitem a detecção de parâmetros fenotípicos que pode ser distinguida facilmente de proteínas endógenas (Dube et al., 2009). Esta tecnologia é uma ferramenta muito utilizada para monitorar o crescimento e a proliferação de bactérias, vírus e outros parasitas em estudos *in vitro* (Ashutosh et al., 2005). É também uma tecnologia promissora em estudos de progressão de doenças em modelos experimentais *in vivo*.

A tecnologia de gene repórter está sendo muito utilizada tanto em laboratórios de pesquisa quanto de diagnóstico, tanto pelo fato das melhorias realizadas com os genes repórteres já desenvolvidos, quanto pelo fato do avanço da área de engenharia biomédica que permite a automação dos testes realizados. Este avanço facilita, agiliza, diminui os erros manuais e aumenta a sensibilidade dos achados. Os principais genes repórteres utilizados são a β -galactosidase, a proteína verde fluorescente (GFP) e a luciferase.

A luciferase representa uma das mais eficientes moléculas repórter utilizada em triagens biológicas. Ela é uma enzima produzida principalmente por animais marinhos, e por alguns insetos como o vaga-lume. Nestes animais ocorre uma reação conhecida como bioluminescência, que acontece quando há catálise pela enzima luciferase da oxidação de luciferina por oxigênio na presença de ATP formando AMP, oxiluciferina, CO₂ e luz (Auld et al., 2008).

A sequência codificadora da luciferase mais comumente utilizada nos laboratórios de pesquisa foi isolada há mais de 20 anos de um vaga-lume encontrado na América do Norte conhecido como *Photinus pyralis* (Bitler, Mc, 1957; Green, McElroy, 1956). Esta sequência

sofreu algumas modificações para a melhoria da expressão proteica em células procariotas e eucariotas, com o aumento da emissão de luz e do tempo de meia-vida no sistema. Este gene repórter torna a técnica de quantificação celular mais rápida, mais sensível, diminui os erros manuais, possui alta reprodutibilidade, pode ser utilizada em testes de descoberta de novos fármacos em larga escala e é facilmente distinguida das proteínas endógenas, podendo ser utilizada como método de quantificação parasitária em experimentos *in vitro* e acompanhar a progressão da doença, como a determinação da carga parasitária em experimentos *in vivo*. O seu ponto negativo é o alto custo do reagente para realizar a reação.

Dessa forma, elegemos obter nesse trabalho mutantes de *Leishmania* expressando o repórter luciferase. A expressão exógena de genes em *Leishmania* está sujeita a algumas particularidades que precisam ser consideradas, como exposto a seguir.

1.10 INTRODUÇÃO DE GENES EXÓGENOS EM LEISHMANIA

A expressão de genes exógenos em *Leishmania* pode ser obtida a partir de duas estratégias principais, colocando-se o gene de interesse em moléculas circulares extracromossomais, ou epissomos, ou induzindo-se a integração do gene exógeno no DNA cromossômico por recombinação homóloga (Roberts et al., 2011).

Epissomos são moléculas de DNA circulares com capacidade replicativa, que se encontram no núcleo da célula separados do DNA cromossômico. Assim como o DNA cromossômico, o DNA epissomal é duplicado antes da divisão celular e propagado para gerações sucessivas. Entretanto, a distribuição de cópias para células filha não é homogênea. O número de cópias presentes na célula varia também de acordo com a pressão de seleção aplicada. Na ausência de pressão seletiva pode haver perda desse DNA extra-cromossômico (Serenio et al., 2007).

Outro ponto a ser considerado na expressão a partir de epissomos é a transcrição, que ocorre de forma bidirecional (Kapler, Beverley, 1989). Essa transcrição bidirecional leva à produção de RNAm dos genes presentes, mas pode levar também à produção de RNAs dupla fita (RNAds) pela complementariedade das duas fitas formadas. Em células que possuem a maquinaria de RNAi intacta, a presença de RNAds ativa a degradação desses RNAs e a expressão gênica é impedida.

Os genes chave no funcionamento do RNAi são *Argonaute* (AGO1) e *Dicer* (DCL1). Lye et al., 2010 demonstraram através de estudos filogenéticos que o subgênero *Viannia* apresenta os genes AGO1 e DCL1, que não estão presentes no subgênero

Leishmania. Esses estudos demonstram também que provavelmente esta maquinaria esteve presente em um ancestral comum e que foi perdida por algumas espécies de protozoários, mas que em *Leishmania (V.) braziliensis* este gene é ativo (Lye et al., 2010; Sereno et al., 2007). A atividade de RNAi em *L. (V.) braziliensis* representa um forte fator limitante para a expressão de genes repórteres a partir de episômos.

A expressão por integração no DNA cromossômico elimina os problemas de instabilidade no número de cópias, necessidade de pressão seletiva constante e possível degradação de mensageiros por atividade de RNAi. Para que ocorra a integração por recombinação homóloga, deve haver na construção transfectada sequências idênticas ao sítio onde se pretende integrar o fragmento. Em tripanossomatídeos, a transcrição por RNA polimerase II ocorre na ausência de sequências promotoras típicas. Por outro lado, a transcrição por RNA polimerase I ocorre de forma típica e resulta em transcritos muito abundantes (Uliana et al., 1996). Assim, pode-se obter altos níveis de transcritos dirigindo-se a integração do fragmento de interesse ao DNA ribossômico. A expressão de proteínas dirigida pela RNA polimerase I nesses organismos só é possível porque a via de processamento do pré-RNAm se dá pelo mecanismo de “trans-splicing” (Beverley, 2003; Uliana, Cruz, 2007).

A regulação gênica em *Leishmania sp.* ocorre predominantemente após a transcrição. Os genes nos tripanosomatídeos são transcritos de forma policistrônica (pré-RNAm) com uma organização genômica constituída por arranjos em tandem. A conversão de pré-RNAm policistrônico para monocistrônico requer duas clivagens nas regiões intergênicas. A primeira clivagem está associada ao “trans-splicing” processo em que ocorre a ligação de uma sequência de 39 nucleotídeos chamado de “spliced leader” (SL) ou mini-exon na extremidade 5’ do RNAm. A segunda clivagem está associada à poliadenilação da extremidade 3’ do RNAm (Kazemi, 2012; LeBowitz et al., 1993). Para ocorrer o “trans-splicing” são necessárias a presença do sítio acceptor de SL (um dinucleotídeo AG) e de um trato de pirimidinas.

As regiões não traduzidas (UTRs) são, portanto de extrema importância para que esta regulação possa ocorrer. A especificidade de expressão nos diferentes estágios do ciclo do parasita parecem estar relacionadas às UTRs dos RNAm principalmente o 3’ (Brittingham et al., 2001). A escolha de uma boa UTR para a construção de um vetor de expressão é crucial para se conseguir uma produção de proteína recombinante em larga escala. Vários outros mecanismos também estão envolvidos no processo de transcrição e na regulação pós-transcricional, como degradação do RNAm, da tradução do RNAm ou por modificação e degradação da proteína (Clayton, Shapira, 2007).

2.1 OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral desse trabalho foi obter mutantes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* expressando luciferase de forma estável, para utilização em teste de atividade de fármacos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obter construção contendo o gene que codifica luciferase flanqueado por fragmentos de sequência do gene ribossômico de *Leishmania* e contendo um marcador de resistência para seleção dos mutantes.
2. Isolar e transfectar o fragmento descrito acima em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Selecionar os mutantes.
3. Caracterizar fenotipicamente os mutantes quanto ao crescimento, infectividade *in vitro* e *in vivo* e produção de luciferase.
4. Caracterizar a sensibilidade das linhagens mutantes a fármacos de uso corrente.
5. Caracterizar o comportamento das linhagens mutantes na infecção de camundongos BALB/c.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 ORGANISMOS

3.1.1.1 *LEISHMANIA SPP.*

Foram utilizadas as cepas *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) e de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227).

3.1.1.2 BACTÉRIAS

3.1.1.2.1 *Escherichia coli*

Foram utilizadas *Escherichia coli* da linhagem DH5 α (F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (r $_k^-$ m $_k^+$) *deoR*thi-1 *pHoAsupE44* λ^- gyrA96 *relA1*) (Gibco-BRL).

3.1.1.3 CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 3 a 4 semanas provenientes do biotério de Experimentação do Departamento de Parasitologia (Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, ICB-USP). A manipulação dos animais seguiu as normas preconizadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB – USP.

3.1.1.4 PLASMÍDIOS

3.1.1.4.1 *pCR2.1-Topo*

pCR2.1-Topo (Invitrogen®) é um vetor linearizado com uma única desoxitimidina (T) nas extremidades 5' e 3' conferindo um sítio eficiente de clonagem “AT” para produtos de PCR. Possui aproximadamente 3,9 kb e confere resistência a ampicilina.

3.1.1.4.2 *pLUC2*

Plasmídio contendo a sequência codificadora do gene *luc2* obtida do vetor pGL4

(Promega) clonado no plasmídio pShuttle 2 (Clontech) (Soltys et al., 2012). Este plasmídio foi gentilmente cedido pelos Drs. Clarissa R. R. Rocha e Carlos Menck (Departamento de Microbiologia, ICB-USP).

3.1.1.4.3 pSSU_{int}

Vetor de clonagem modificado a partir do pNEB193 (New EnglandBioLabs) para possibilitar a clonagem de fragmentos e posterior integração no locus do RNA ribossômico (rRNA) de *Leishmania*, nas regiões repetitivas da subunidade menor (SSU) (Misslitz et al., 2000). Nas extremidades do cassete estão as sequências 5'SSU e 3'SSU da subunidade menor de rDNA de *L. (L.) tarentolae*, a fim de promover a recombinação homóloga. Em sequência à região 5'SSU há um sítio acceptor de "splicing" (SAS), um sítio de clonagem (MCS), a sequência codificadora da higromicinafosfotransferase (HYG) seguida da região intergênica do gene que codifica a cisteína protease B de *Leishmania mexicana* e finalmente a sequência 3'SSU. Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Toni Aebischer (Robert Koch Institut, Berlim, Alemanha).

3.1.1.4.4 pSP α HYG α

Plasmídio construído clonando-se um fragmento de 0,78 kb da região intergênica de α -tubulina de *Leishmania enrietti* a 5' e a 3' do gene que codifica higromicinafosfotransferase no vetor pSP72 (Promega) (El Fadili et al., 2002). Este plasmídio foi gentilmente cedido pelo Dr. Adriano Cappellazzo Coelho (ICB, USP).

3.1.1.5 OLIGONUCLEOTÍDEOS

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência ^a	T _m (°C)
pSSU-For	5' TGACGAACAACCTGCCCTATCAG3'	61 °C
pSSU-Rev	5' ATGAGCTGCGCCTACGAGACA3'	61 °C
pSSU-Seq	5'GGATTGTCATTTCAATGGGGGA3'	59 °C

Luc2For	5'ATGGAAGATGCCAAAAACATTAAG3'	59 °C
Luc2Rev	5'TTACACGGCGATCTTGCCGC3'	59 °C
Luc-465-484	5'GACCGACTACCAGGGCTTCC3'	61 °C
Luc2ForBamHI	5'GCGGGATCCATGGAAGATGCCAAAAACATTAA G3'	59 °C
Luc2Rev/ α Tub	5' CACGCGCATACATTCACGGCGTTACACGGCGATC TTGCCGC 3'	59 °C
α TubFor/luc2	5'GCGGCAAGATCGCCGTGTAACGCCGTGAATGTAT GCGCGTG3'	59 °C
α TubRevBamHI	5' GCG <u>GGA TCC</u> GGGGAGAGGGATGAGGGGT 3'	59 °C
S1 ^b	5' GATCTGGTTGATTCTGCCAG 3'	57 °C
S4 ^b	5' GATCCAGCTGCAGGTTTACC 3'	60 °C

^a Sequências sublinhadas indicam sítios para enzimas de restrição.

^b (Uliana et al., 1994).

3.1.1.6 FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

Higromicina (Invitrogen®) é um antibiótico aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces hygroscopicus*. Este antibiótico inibe a síntese de proteína em procariotos e eucariotos exercendo ação bacteriostática.

Concentrações estoque de anfotericina B (Cristália) 5,4 mM foram preparadas em água.

Concentrações estoque de tamoxifeno (Sigma) 10 mM foram preparadas em DMSO.

3.1.1.7 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E T4 DNA LIGASE

As enzimas de restrição (New EnglandBiolabs ou Fermentas) e T4 DNA ligase (Invitrogen) foram utilizadas seguindo o protocolo descrito pelos fabricantes.

3.1.1.8 REAGENTES

3.1.1.8.1 One-GloTM Luciferase Assay System

O sistema de ensaio luciferase ONE-Glo (Promega) utiliza a 5'-fluoroluciferina como substrato para a reação. Esse substrato favorece a homogeneidade e sensibilidade na detecção da expressão do gene repórter luciferase. A 5'-fluoroluciferina é mais estável e mais tolerante aos componentes das amostras e tem menos odor do que a luciferina.

3.1.1.8.2 VivoGlo™ Luciferin

O VivoGlo™ Luciferin (Promega) é sal de potássio de D-luciferina para testes de bioluminescência *in vivo*.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CULTURA DE PROMASTIGOTAS DE LEISHMANIA

Promastigotas de *Leishmania spp.* foram cultivadas em meio M199 (GIBCO BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, HEPES 40 mM pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005%, penicilina/estreptomicina 100 µg/mL e acrescido ou não com 2% de urina. As culturas foram mantidas a 25 °C com repiques semanais.

3.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

A extração de DNA plasmidial foi realizada de acordo com o protocolo de Birnboim e Dolly modificado (Birnboim, Doly, 1979). A cultura de bactérias contendo o gene de interesse foi submetida à centrifugação a 21.910 x g para sedimentação das mesmas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspense em 300 µL de PI (Tris-HCL 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0 e RNase 100 µg/mL) por agitação em vórtex. Em seguida, adicionou-se 300 µL de PII (NaOH 0,2 N e SDS 1%). A solução foi homogeneizada por inversão 5 vezes e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo foi adicionado 300 µL de solução PIII (KOAc 3,1 M, pH 5,5), misturada por inversão 5 vezes e centrifugado a 21.910 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado, acrescentou-se 400 µL de isopropanol e centrifugou-se a 21910 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 70% sem ocorrer a ressuspensão do “pellet” e em seguida submetido à centrifugação a 21.910 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco para posterior ressuspensão em 50 µL de TE e armazenamento a -20 °C.

3.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM LARGA ESCALA

A extração plasmidial em larga escala foi realizada utilizando-se o Purelink Hipure Plasmidial Maxi-prep Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Partiu-se de uma cultura de *Escherichia coli* DH5 α transformada com o plasmídio de interesse cultivada por 16 horas em 3 mL de meio LB com o antibiótico apropriado a uma temperatura de 37 °C. Foi adicionado 250 μ L da cultura em um volume de 250 mL de meio LB com o antibiótico apropriado, mantendo-se a cultura a 37 °C por 16 horas sob agitação. Após a incubação para o crescimento das bactérias a cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O “pellet” foi ressuspensão em 10 mL de solução R3 (Tris-HCL 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; RNase 100 μ g/mL) e homogeneizado. Para lise celular foi adicionado 10 mL do tampão L7 (NaOH 0,2 M, SDS 1% w/v) e a mistura foi invertida gentilmente 5 vezes seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 10 mL de solução de precipitação N3 (KOAc 3,1 M, pH 5,5) e misturou-se por inversão até a mistura ficar homogênea, sem vortexar. A solução foi centrifugada a 15.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi aplicado na coluna equilibrada com o tampão EQ1 (NaAc 0,1 M, pH 5,0; NaCl 0,6 M; Triton[®]X-100 0,15% (v/v)). O “flow-through” resultante da passagem da solução pela coluna foi descartado. Foram adicionados 60 mL de solução de lavagem W8 (NaAc 0,1 M, pH 5,0; NaCl 825 mM) e a seguir 15 mL de E4 (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5; NaCl 1,25 M) para eluir o DNA. À solução eluída foram adicionados 10,5 mL de isopropanol 100% e centrifugou-se a 15.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de etanol 70%. Centrifugou a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Após remover-se cuidadosamente o sobrenadante, o “pellet” foi seco a temperatura ambiente e ressuspensão em TE (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5; EDTA 0,1 M). O DNA foi armazenado a -20 °C.

3.2.4 PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM PEQUENA ESCALA

A extração do DNA genômico de leishmânia foi feita com base no protocolo experimental descrito por Medina-Acosta e Cross (1993). Centrifugou-se 5 mL de cultura de promastigotas no 3º dia de crescimento a 800 x g por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. O sedimento obtido foi ressuspensão em 150 μ L de TELT (Tris-HCL 50 mM, pH 8,0; EDTA 62,5 mM, pH 9,0; LiCl 2,5 M e Triton X-100 4% (v/v)) e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 150 μ L de fenol :

clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) e misturou-se por inversão. Centrifugou-se a 13.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 300 µL de etanol 100% gelado para precipitar o DNA. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada a 13.000 x g durante 10 minutos. Para finalizar foi realizada mais uma centrifugação para lavar o “pellet” com etanol 70%. O DNA precipitado e seco foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0) com RNase a uma concentração final de 0,2 mg/mL.

3.2.5 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)

As reações de amplificação das sequências alvos presentes nos DNAs (gDNA e DNA de plasmídio) foram realizadas pela técnica de PCR com o Kit AccuPrime*Taq* DNA Polimerase System (InvitrogenTM) em que as amostras foram submetidas a reações no volume final de 50 µL em tampão 1x AccuPrime Buffer I (DNA plasmidial) ou II (DNA genômico), 100 ng de cada um dos oligonucleotídeos e *TaqAccuprime* polimerase, conforme instruções do fabricante. O tampão I difere do tampão II nas concentrações de proteína termostável AccuPrimeTM; ambos são constituídos de Tris SO₄ (pH 8,9) 600 mM, (NH₄)₂SO₄ 180 mM, MgSO₄ 20 mM, dGTP 2 mM, dATP 2 mM, dTTP 2 mM, dCTP 2 mM. A reação inicialmente foi incubada a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 segundos, anelamento de acordo com o T_m de cada “primer” por 1 minuto, extensão a 68 °C por 3 minutos e 5 minutos a 68 °C para extensão final.

Para reações de PCR “overlap”, o DNA contendo a sequência alvo foi submetido à reação de PCR com volume final de 50 µL em tampão de *Taq Platinum* polimerase 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM) contendo MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 200 µM; *Taq Platinum* polimerase 2,5 UI (InvitrogenTM) e 100 ng de cada um dos oligonucleotídeos. Inicialmente a reação foi incubada a 94 °C por 1 minuto sendo em seguida submetida a 35 ciclos de amplificação, com as seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto na temperatura de anelamento (variando de 61 °C a 69,1 °C) e 80 segundos a 72 °C. Para a extensão final utilizamos a temperatura de 72 °C por 7 minutos. A amplificação do produto esperado foi verificada submetendo-se uma alíquota de 10 µL da reação à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.6 ELETROFORESE DE DNA

Foram utilizados géis de agarose 0,8% em tampão TAE 1x (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM) para separação de fragmentos de DNA. O gel foi corado com brometo de etídio (0,75 µg/mL) ou, alternativamente, utilizaram-se amostras coradas com GelRed™ (Biotium). Como padrão de peso molecular utilizou-se DNA do fago lambda (λ) (Gibco BRL) digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII. Os géis foram visualizados em transluminador ultravioleta (UV) e fotografados em ImageQuant (Molecular Dynamics, CA) (Amersham Pharmacia Biotech, NJ).

3.2.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O produto da clonagem foi sequenciado utilizando-se o método de Sanger e Coulson (1977) modificado para leituras automatizadas. Para isso, foi utilizado o “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems®). Foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial, 100 ng de oligonucleotídeos, 0,75 µL de Big DyeTerminator, 3,25 µL de Tampão “Save Money” (Tris-HCL 1 M, pH 9,0; MgCl₂ 50 mM) e H₂O para completar o volume final de 10 µL. A reação foi incubada por 1 minuto a 96 °C, seguido de 30 ciclos de extensão por 15 segundos a 96 °C, anelamento por 15 segundos em temperatura correspondente ao T_m do primer e 4 minutos de extensão a 60 °C. Em seguida à reação de amplificação, o DNA foi precipitado com 90 µL de isopropanol 66%, seguido de agitação, incubação por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugação por 20 minutos a 15.300 x g. Descartou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspensão com 150 µL de isopropanol 75% e centrifugado por 10 minutos a 15.300 x g. O sobrenadante foi descartado e seco para ressuspensão em 20 µL de TSR (“template supression reagente”) para análise no aparelho ABI Prism 310 Genetic.

3.2.8 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

As sequências de nucleotídeos geradas no sequenciamento foram analisadas através do programa Lasergene (DNASTar Inc., Madison, WI, U.S.A.), e a busca de similaridade foi processada utilizando-se o programa BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*).

3.2.9 CLONAGEM MOLECULAR

3.2.9.1 PREPARAÇÃO DA BACTÉRIA COMPETENTE

As bactérias competentes foram obtidas segundo protocolo descrito por Sambrook, 2001. Obteve-se inicialmente cultura de bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α em 3 mL de meio LB (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,18 M) incubada a 37 °C por 16 horas sob agitação. No dia seguinte, 500 μ L do pré-inóculo foi inoculado em 50 mL de meio LB, que foram mantidos sob agitação a 37 °C até atingir DO₆₀₀ entre 0,3 e 0,6. A cultura foi então mantida no gelo por 5 a 10 minutos e a seguir centrifugada a 1.780 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso com a metade do volume original de CaCl₂ 50 mM gelado. A suspensão foi mantida em repouso no gelo por 10 minutos e em seguida centrifugada novamente nas condições descritas acima. O precipitado contendo as células foi ressuspenso em CaCl₂ 50 mM contendo 15% de glicerol, utilizando-se volume correspondente a 10 vezes o valor da DO₆₀₀ obtido para a cultura inicial. As células foram então aliquotadas em volumes de 200 μ L e armazenadas a -70 °C.

3.2.9.2 PREPARAÇÃO DO VETOR

O vetor pSSUint foi linearizado com a enzima *Bam* HI para posterior ligação do inserto.

3.2.9.3 PREPARAÇÃO DO INSERTO

Os fragmentos a serem subclonados foram isolados por eletroforese em gel de agarose e o fragmento de interesse foi cortado e transferido para um tubo tipo eppendorf. Os fragmentos de interesse foram purificados com o kit de extração PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Adicionou-se no tubo o L3 (tampão de solubilização de gel) e incubou-se a 50 °C até dissolver completamente o gel. O gel dissolvido foi aplicado à coluna de extração, que foi centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto, descartando-se o “flow-through”. A seguir a coluna foi lavada com 500 μ L de W1 (tampão de lavagem) contendo etanol e centrifugada a 20.160 x g por 2 minutos, descartando-se novamente o “flow-through”. Para eluir o DNA adicionou-se 50 μ L de E5 (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5) no centro da coluna, que foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente.

Centrifugou-se a coluna a 12.000 x g por 1 minuto recolhendo-se a solução contendo o DNA, que foi armazenado a -20 °C.

3.2.9.4 LIGAÇÃO

A reação de ligação foi realizada nas proporções de 4:1 e 2:1 (inserto:vetor) com 1U T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão de ligação 1x (Invitrogen) (Tris-HCL 50 mM, pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; ATP 1 mM; DTT 1 mM e polietilenoglicol-8000 2,5%). A reação foi incubada a 16 °C durante toda a noite.

3.2.9.5 TRANSFORMAÇÃO E PLAQUEAMENTO

O DNA a ser transformado foi misturado a 200 µL de bactérias *E. coli* DH5α competentes e incubado a 4 °C por 15 minutos. A mistura foi então submetida a choque térmico a 42 °C por 90 segundos e transferida novamente para o gelo por mais 5 minutos. Foram adicionados 800 µL de meio LB e incubou-se a 37 °C por 1 hora. A cultura foi plaqueada em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e foi incubada a 37 °C durante toda a noite. No dia seguinte foi observado o crescimento das colônias.

3.2.9.6 IDENTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS CONTENDO O INSERTO

As colônias crescidas no meio LB foram selecionadas e identificadas. Com auxílio de um palito de madeira as colônias foram destacadas e adicionadas na mistura de reação de PCR. Os primers utilizados para a realização do PCR foram Luc2For e Luc2Rev específicos para a amplificação da *luc2*.

3.2.10 TRANSFEÇÃO DE *L. (V.) BRAZILIENSIS* E *L. (L.) AMAZONENSIS*

3.2.10.1 ELETROPORAÇÃO

As linhagens mutantes de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foram obtidas através do protocolo de transfecção desenvolvido por Coburn e Beverley, 1990. Formas promastigotas no 3º dia de crescimento foram centrifugadas a 1.500 x g por 10 minutos e lavadas uma vez com PBS estéril. As células foram ressuspensas no mesmo tampão com densidades finais de 1x10⁸ parasitas/mL. Foram adicionados 4x10⁷ parasitas/mL nos tubos contendo 5 µg de DNA linear e incubados por 15 minutos no gelo. Como controle positivo foi

utilizado um DNA circular (plasmídio) contendo o gene de resistência a higromicina e como controle negativo foi utilizado amostra sem DNA. As misturas foram eletroporadas em cubetas de eletroporação Gene Pulser (Bio-Rad) de 0,2 cm com pulsos de 400 V e capacitância 960 μ F. Na própria cubeta foi adicionado 1 mL de meio 199 e as células foram incubadas no gelo por 10 minutos para recuperação. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas contendo 10 mL de meio 199. Para eletroporações em amostras de *L. (V.) braziliensis* o meio foi também suplementado com 2% de urina. Após 24 horas foram adicionados 32 μ g/mL de higromicina, para a seleção dos parasitas transfectados.

3.2.10.2 OBTENÇÃO DE CLONES

Para obtenção dos clones de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, promastigotas foram plaqueadas em meio 199 contendo 2% de ágar, 1,2 μ g/mL de biopterina e 32 μ g/mL higromicina. Após 10 a 15 dias 4 colônias foram escolhidas e isoladas em placas de 96 poços em um volume de 100 μ L de meio 199 sem higromicina. Após 24 horas foram adicionados mais 100 μ L de meio 199 com higromicina para concentração final 32 μ g/mL. Observado o crescimento dos parasitas os mesmos foram transferidos para placa de 24 poços em um volume final de 1 mL de meio 199 com a droga de seleção. A cultura foi observada diariamente e quando houve um aumento do número de parasitas nos poços estes foram transferidos para garrafas de culturas correspondentes para cada clone com 10 mL de meio 199 mais a droga de seleção. Em culturas de *L. (V.) braziliensis* foram adicionados 2% de urina.

3.2.11 CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES

3.2.11.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE PROMASTIGOTAS IN VITRO

Os parasitas foram cultivados em 10 mL de meio 199 à 25 °C em garrafas de cultura. As curvas de crescimento *in vitro* foram realizadas em triplicata e o crescimento foi avaliado diariamente removendo-se alíquotas da cultura para contagem do número de parasitas em câmara de Neubauer, durante 7 dias de cultivo. A quantidade de parasitas foi expressa em número de parasitos/mL.

3.2.11.2 ATIVIDADE DE LUCIFERASE

A atividade da luciferase foi verificada através da realização de diluição seriada em placas de 96 poços. Foram centrifugados 10 mL da cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* no 3º ou 6º dia de crescimento. As células foram semeadas para uma concentração de 5×10^6 promastigotas por poço ou 1×10^7 promastigotas por poço. As diluições em base 2 foram feitas em 200 µL de PBS e as diluições de base 10 em 100 µL. Para a leitura adicionou-se “ONE-Glo™ Reagent” (Promega) na proporção de 20 µL/100 µL de solução por poço. Este reagente contém fluoroluciferina que resulta na maior estabilidade física quando comparado a luciferina comum, além de conter detergentes para lisar as células e DTT sendo este um agente redutor. Em seguida as células foram homogeneizadas vigorosamente para que ocorresse a lise. A quantificação de unidades relativas de luz (URL) foi feita em aparelho POLARstarOmega (BMG LABTECH), o ganho foi determinado no poço que corresponde ao maior valor de URL.

3.2.11.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE MTT

O teste de MTT foi realizado em microplaca de 96 poços como descrito por Zauli-Nascimento et al., 2010. Foram cultivadas em placas de 96 poços 2×10^6 promastigotas (volume final de 200 µL de meio 199) na ausência ou na presença de anfotericina B (0,3; 0,2; 0,15; 0,1; 0,075; 0,05 e 0,037 µM) ou tamoxifeno (44; 27; 22; 13,5; 11; 6,75 e 5,5 µM) a 25 °C por 24 horas. Foram adicionados 30 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio; USB Corporation) a 5 mg/mL após o período de incubação e a placa foi mantida a 25 °C por 3 horas. Em seguida, foram adicionados 50 µL de SDS 20% para lise celular e posterior leitura medindo-se a absorbância a 595 nm, tendo como referência a leitura de 655 nm em espectrofotômetro de placa (POLARstarOmega, BMG, Labtech).

3.2.12 ENSAIOS DE INFECÇÃO IN VITRO E SOBREVIVÊNCIA DE AMASTIGOTAS

3.2.12.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE MONÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA

Monócitos foram obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c. Após sacrifício dos animais em câmara de CO₂, os fêmures foram retirados. Os ossos foram lavados com PBS 1x, em seguida as epífises foram cortadas e com auxílio de uma seringa contendo 10 mL de meio R2030 (meio RPMI 1640 acrescido de 30% de sobrenadante de cultura de células L929

e 20% de soro fetal bovino) inseriu-se uma agulha de 21 G no canal medular para lavagem de seu conteúdo. Os 10 mL foram distribuídos em 3 placas de Petri plásticas, 3,3 mL em cada placa e completou-se o volume para 20 mL. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ durante 7 dias, sendo que no terceiro dia foram adicionados mais meio fresco R2030 (10 mL). Ao final de 7 dias as células foram lavadas com PBS 1x gelado e despregadas da placa por raspagem e reservadas em tubos tipo Falcon de 50 mL para posterior centrifugação por 10 minutos a 700 x g na temperatura de 4 °C. O precipitado obtido foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI para contagem em câmara de Neubauer.

3.2.12.2 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS IN VITRO

Macrófagos de camundongos BALB/c foram semeados em placas de 24 poços contendo em cada orifício uma lamínula circular estéril de 13 mm de diâmetro. Em volumes de 400 µL de meio RPMI-1640 cerca de 3×10^5 macrófagos por poço foram incubados a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 16 h para a adesão. Após este período o sobrenadante foi descartado e adicionou-se promastigotas na fase estacionária (5º dia de cultura) das linhagens selvagem e mutante de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* em diferentes razões, que variaram de 15:1 a 30:1 e 15:1 a 25:1 respectivamente, parasitas por célula. As culturas foram incubadas a 33 °C/ 5% CO₂ por 3 a 4 horas, lavadas com PBS 1xmorno para retirada dos parasitas livres e adicionados 400 µL de RPMI-1640 para posterior incubação a 33 °C/ 5% CO₂ por tempos que variaram de 24 a 120 horas. Após a infecção, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x morno, fixadas durante 1 minuto com metanol 100 % e coradas com o kit *Instant Prov* (Newprov). As lamínulas coradas foram observadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 para contagem de células infectadas e o número de amastigotas por macrófago.

3.2.12.3 TRATAMENTO DAS CULTURAS INFECTADAS

A avaliação da sensibilidade a fármacos em amastigotas intracelulares foi realizada com o fármaco anfotericina B. Após a infecção das células foi adicionado às culturas anfotericina B (0,2 µM, 0,1 µM, 0,05 µM, 0,025 µM) adicionadas nos poços em um volume final de 400 µL de meio RPMI. O poço controle não recebeu o fármaco. As células foram incubadas por 48 horas.

3.2.13 ENSAIOS IN VIVO

3.2.13.1 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS

Camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea, no coxim plantar traseiro esquerdo, com 1×10^6 promastigotas de fase estacionária (5º dia) de linhagens de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* selvagens e mutantes. A medida da lesão foi tomada com medidor de espessura (Mitutoyo) avaliando-se a espessura da pata infectada e da pata contralateral sadia. Os dados apresentados relativos a tamanho da lesão correspondem à diferença (mm) entre a pata posterior esquerda (com lesão) e a pata posterior direita (sadia).

Alternativamente, utilizamos amastigotas recuperados de culturas de macrófagos para infectar camundongos C57/Bl6. Para a obtenção de amastigotas, 1×10^7 macrófagos foram cultivados em placas de 148 cm² e infectados com promastigotas de fase estacionária. Após 72 h, os macrófagos infectados foram desprendidos da placa usando “rodinho”. Os amastigotas foram quantificados em câmara de Neubauer. Amastigotas (1×10^6) foram injetados no coxim plantar da pata posterior direita dos camundongos em um volume de 20 µL.

3.2.13.2 QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA: DILUIÇÃO LIMITANTE

Utilizamos o método de diluição limitante descrito por Lima. Camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foram sacrificados na 12ª semana após a infecção. A pata foi recortada isolando-se o tecido na região da lesão que foi homogeneizado em PBS estéril e armazenado no gelo. O material foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos e o sobrenadante em seguida foi lavado com PBS por 2 vezes através de centrifugação a 1000 x g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de meio 199, as células foram contadas em câmara de Neubauer e alíquotas de 150 µL da suspensão foram adicionadas ao primeiro poço de uma placa de 96 poços, contendo 50 µL de meio 199. Desta suspensão inicial realizaram-se diluições sucessivas de 20 µL até o 12º poço sendo que todos os poços continham 180 µL do mesmo meio. As placas foram incubadas por 7 a 10 dias a 25 °C e então examinadas observando-se qual a última diluição na qual detecta-se crescimento de promastigotas. O teste foi realizado em duplicata e os dados foram analisados utilizando-se o programa ELIDA (Lima et al., 1997).

3.2.13.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PARASITÁRIA : BIOIMAGEAMENTO

Na 8ª semana após infecção camundongos BALB/c foram submetidos ao bioimageamento (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences). Para a detecção de luz, foi administrado por animal 75 mg/Kg de VivoGlo™ Luciferin (Promega) e os mesmos foram anestesiados com 2,5% de isofluorano (Cristália). Após a anestesia os camundongos foram transferidos para a câmera de imagem, sendo mantidos com 1,5% de isofluorano. A emissão de fótons foi coletada usando o modo de alta resolução e a emissão total de fótons foi estabelecida em uma região definida de interesse (ROI) no local da lesão. O mesmo ROI foi estabelecido para todos os animais. Foi determinado o tempo de maior emissão de luz, realizando uma leitura a cada 2 minutos, estabelecendo o tempo de 18 minutos para a captação da maior emissão luz.

3.2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPadPrism 6 CA, USA. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.1. OBTENÇÃO DE LINHAGENS TRANSGÊNICAS EXPRESSORAS DE LUCIFERASE

4.1.1 CONSTRUÇÃO DE CASSETE CONTENDO O GENE QUE CODIFICA LUCIFERASE

A construção do cassete para expressão da proteína luciferase em *Leishmania* foi feita utilizando-se o gene *luc2*. O gene *luc2*, presente no vetor comercial pLUC2 (Promega) corresponde a uma modificação do gene que codifica a luciferase de vaga-lume, construído sinteticamente para remover sítios de ligação de fatores de transcrição crípticos e para otimizar os códons para expressão em células de mamíferos.

A fase aberta de leitura *luc2* foi amplificada pela técnica de PCR utilizando-se como molde o plasmídeo pLUC2 (Figura 3A). Os oligonucleotídeos Luc2For e Luc2Rev foram desenhados para se anelarem às extremidades da fase aberta de leitura de *luc2*, resultando em um tamanho esperado para o produto amplificado de 1.6 kb. Na Figura 4 (canaleta 1) pode-se observar o fragmento referente à amplificação de um fragmento específico com o tamanho esperado de 1.6 kb. Este fragmento foi ligado ao plasmídeo pCR2.1TOPO e transformado em bactérias DH5 α competentes para obtenção de massa de plasmídios.

O vetor *pSSUint* foi escolhido para a construção do cassete para transfecção de leishmânia. Este plasmídeo contém sequências correspondentes às extremidades do gene que codifica a subunidade 18S do DNA ribossômico (rDNA) de *Leishmania*, regiões necessárias para que possa ocorrer a recombinação homóloga dirigida ao gene ribossômico.

Sabe-se que o processamento de transcritos em *Leishmania* depende de sinais presentes nas regiões a 5' e a 3' da fase aberta de leitura conhecidas como 3'UTR e 5'UTR. Estas regiões não são traduzidas, mas são locais de sinalização para que possa ocorrer a ligação do mini-exon (5' UTR) e a poliadenilação (3' UTR), necessárias para a maturação do pré-RNA em RNA mensageiro maduro que será traduzido em proteína (Uliana, Cruz, 2007). Assim, para que o gene *luc2* fosse expresso com sucesso a partir da construção no plasmídeo *pSSUint* (Figura 3B) era necessário que ele fosse flanqueado por sequências a 5' e 3' que permitissem o correto processamento do RNA em *Leishmania*.

A sequência escolhida para ser adicionada a 3' do gene *luc2* foi uma sequência presente no plasmídeo pSP α HYGa (Figura 3C), correspondente à região 3' UTR do gene que codifica α -tubulina (*α -tub*) de *L. enrietti*. O fragmento *α -tub* foi amplificado com os oligonucleotídeos α TubForLuc2 e α TubRevBamHI, obtendo-se um produto com tamanho de 0,8 kb, como pode ser observado na Figura 4 (canaleta 2).

Figura 3 - Desenho esquemático de plasmídios utilizados como base para a construção do cassete luciferase. **A.** pLUC2. **B.** pSPαHYGα. **C.** pSSU-int. MCS: sítio de clonagem múltiplo; α-tub: 3' UTR de α-tubulina; 5' SSU e 3' SSU: regiões 5' e 3' da subunidade 18S do rDNA; SAS: sítio aceitor de "splicing"; HYG: higromicina fosfotransferase; CPB 2.8: região 3' UTR do gene que codifica a cisteíno-protease 2.8 de *L. mexicana*.

Figura 4 - Amplificação dos fragmentos *luc2* e 3' UTR α-tubulina. Separação dos produtos amplificados em gel de agarose 0,8%. **(1)** Fragmento correspondente ao gene *luc2* e **(2)** fragmento 3' UTR da α-tubulina. Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII.

Para a clonagem da região 3' UTR a jusante da fase aberta de *luc2*, optamos por utilizar a técnica de "PCR overlap", que consiste em duas reações para a ligação de dois fragmentos distintos, com a finalidade de se obter um único produto amplificado contendo a fase aberta da *luc2*, amplificado a partir do plasmídeo pCR2.1TOPO, e a região 3' UTR da α-tub, a partir do plasmídeo pSPαHYGα. Os "primers" foram desenhados para adicionar seqüências de nucleotídeos complementares ao gene oposto. Na primeira reação em cadeia de polimerase as duas seqüências foram amplificadas separadamente como visto na Figura 2. Entretanto, o oligonucleotídeo reverso para amplificação de *luc2* continha 20 nucleotídeos em sua extremidade 3' complementares à seqüência α-tub. Da mesma forma, o oligonucleotídeo direto para amplificação de α-tub continha 20 bases complementares à seqüência de *luc2*.

Esses dois produtos amplificados foram então utilizados em uma segunda reação de PCR-overlap que acontece como está ilustrado na Figura 5. Foram utilizados os “primers” Luc2For*Bam*HI e α TubRev*Bam*HI5’. Inicialmente, a hibridização dos dois produtos amplificados, que ocorre na região central, permite a primeira extensão. O tamanho esperado para a banda referente à amplificação do fragmento *luc2 α -tub* é de 2.4 kb, que pode ser observado no gel de agarose apresentado na Figura 6.

Figura 5 - Representação esquemática da reação de “PCR overlap”. Esquema da reação de PCR overlap para a ligação dos fragmentos *luc2* e *α-tub* e posterior clonagem no plasmídeo *pSSUint*.

Figura 6 - Ligação dos fragmentos *luc2* e *α-tub* por “PCR overlap”. Separação em gel de agarose de fragmento de 2.4 kb referente à ligação de *luc2 α -tub*. Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII. (1) e (2) fragmento amplificado *luc2 α -tub*; (3) controle negativo com os primers Luc2For*Bam*HI e α TubRev*Bam*HI.

4.1.2 CLONAGEM MOLECULAR

O fragmento *luc2 α -tub* foi cortado e purificado do gel, digerido com a enzima *Bam* HI e ligado no plasmídeo *pSSUint*, entre a sequência aceptora de “splicing” (SAS) e o gene que codifica o marcador de resistência a higromicina, como pode ser observado na Figura 7.

O plasmídeo *pSSUint:luc2 α -tub*, resultado da ligação do inserto *luc2 α -tub* com o plasmídeo *pSSUint* foi transformado em bactérias DH5 α e as colônias contendo o inserto foram selecionadas por PCR de colônia. A técnica de PCR possibilitou a identificação de colônias que continham o plasmídeo *pSSUint:luc2 α -tub* de uma forma mais rápida, pois como o plasmídeo foi digerido com uma única enzima (*Bam* HI) havia possibilidade de ocorrer a ligação do plasmídeo sem a inserção do inserto.

Figura 7 - Esquema da clonagem do inserto *luc2 α tub* ao plasmídeo *pSSUint*. O *pSSUint* contém as regiões 5' SSU (região 5' da subunidade 18S do rDNA), SAS (sítio aceptor de “splicing”), HYG (higromicinasofotransferase), CPB 2.8 IR (3' UTR de cisteína protease 2.8 de *L. mexicana*) e 3' SSU (região 3' da subunidade 18S do rDNA), sendo que o inserto foi clonado entre as regiões SAS e HYG, no sítio de restrição de *Bam* HI. São mostrados também os sítios de restrição para as enzimas *Pac* I e *Pme* I, utilizadas para purificar o cassete linear.

Como a ligação do inserto com o plasmídeo ocorreu por um único sítio de clivagem da enzima de restrição, como descrito anteriormente, era possível a ligação do inserto em duas orientações: a correta (ou desejada) (*luc2 α -tub*) e a incorreta (ou invertida) (*α -tubluc2*). Sendo assim foi necessário estabelecer um padrão de restrição que permitisse identificar os plasmídios que continham o inserto na orientação correta e também confirmar por mais uma técnica a presença de *luc2* na colônia selecionada. O DNA plasmidial foi purificado de bactérias identificadas pela técnica de PCR e digerido com as enzimas *Bam* HI para confirmar a presença da *luc2* e *Xho* I para verificar a orientação do inserto. Dessa forma, clones em orientação direta deveriam apresentar fragmentos de 6,5 e 2,4 kb quando digeridos com *Bam*

HI e fragmentos de 7.2 e 1.7 kb quando digeridos com *Xho* I. Na Figura 8 apresentamos o padrão de digestão de um dos clones selecionados, contendo o inserto na a orientação correta.

Figura 8 - Confirmação da orientação do inserto *luc2α-tub* no plasmídio *pSSUint*. Digestão do DNA plasmidial de um dos clones com as enzimas de restrição (1) *Bam* HI, (2) *Xho* I. Desenho em escala. Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hind* III. As siglas utilizadas nos esquemas estão definidas na legenda da Figura 7.

O DNA do clone *pSSUint:luc2α-tub* selecionado, foi então submetido ao sequenciamento para verificar a integridade da fase aberta de leitura de *luc2*. Nós utilizamos os “primers” Luc2For, Luc 465-484 e Luc2Rev e com o programa DNASTar alinhamos a sequência para obter toda a sequência de nucleotídeos correspondente à fase aberta de leitura *luc2* (Figura 9). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas no programa tblastx e observamos 100% de identidade com a sequência de *luc2* disponível no banco de dados (número de acesso AAA89082.1). Este resultado foi importante para certificarmos que o cassete contendo a sequência *luc2* não apresentava nenhuma mutação que alterasse a expressão da proteína ou interrompesse a expressão.

Figura 9 - Estratégia de sequenciamento do gene *luc2* na construção obtida. O sequenciamento do gene *luc2* foi realizado com os oligonucleotídeos Luc2For, Luc 465-484 e Luc2Rev. As setas indicam as sequências determinadas nas diferentes reações.

4.1.2 TRANSFEÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSORES DE LUCIFERASE

Para obter o DNA para realizar a transfecção, digerimos o plasmídeo *pSSUint:luc2 α -tub* com *Pac I* e *Pme I*, o que permitiu isolar o cassete SSU:luc2 α -tub. Este fragmento linear foi purificado e transfectado por eletroporação em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Após 4 subcultivos na presença do fármaco de seleção, foi avaliada a expressão de luciferase em parasitas transfectantes através de teste de luminescência com a cultura heterogênea de cada espécie. Este primeiro teste teve como finalidade responder três perguntas iniciais importantes: 1. Os parasitas estavam expressando luz? 2. A condição da transfecção foi eficaz? 3. A construção do cassete estava correta?

Observamos que promastigotas transfectadas e selecionadas na presença de higromicina, quando incubadas na presença de luciferina, eram capazes de produzir luz e que havia correlação direta entre a intensidade de luz e número de células, tanto em transfectantes de *L. (V.) braziliensis* (LbLUC) (Figura 10A) como de *L. (L.)amazonensis* (LaLUC) (Figura 10B). A detecção da produção de luz indica que a construção estava correta, já que foi expressa a proteína luciferase com capacidade de clivagem de seu substrato. O 3' UTR α -tub adicionado permitiu que os processos de transcrição e processamento do RNAm fossem realizados corretamente, resultando na tradução da proteína *luc2*. Concluimos ainda que as condições utilizadas na transfecção foram adequadas. Existem protocolos que diferenciam as condições de amperagem e voltagem da eletroporação por espécies. Nós utilizamos uma mesma condição para as duas espécies e elas expressaram luz, indicando a eficiência da transfecção.

Figura 10 - Correlação entre a atividade da luciferase e o número de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) amazonensis* (B). Promastigotas em diluições seriadas foram incubados na presença de reagente contendo luciferina e a emissão de luz, analisada em luminômetro, foi expressa em Unidades Relativas de Luz (URL). Os dados representam a média e o desvio padrão de amostras em triplicata.

A pergunta que surgiu a seguir foi se o gene *luc2* havia sido integrado na região 18S do DNA ribossômico. Para responder essa pergunta, era necessário primeiramente que as culturas dos parasitas fossem homogêneas. A clonagem foi obtida por plaqueamento em meio 199 semi-sólido.

O DNA genômico de cada clone foi purificado e submetido à amplificação com a finalidade de confirmar a presença da fase aberta de leitura *luc2* nos clones selecionados e para verificar se o cassete estava integrado no 18S (Figura 11). A amplificação com o par de oligonucleotídeos Luc2For e Luc2Rev permitiu confirmar a presença de *luc2* nas linhagens mutantes e a sua ausência nas linhagens selvagens, como pode ser observado nas figuras 11B e 11D. A integração no locus 18S foi confirmada pela utilização de dois pares de oligonucleotídeos S1/Luc2Rev, Luc465-484/S4 (Figura 11A), graças a sua complementaridade com sequências presentes dentro e fora do cassete transfectado. A amplificação com os oligonucleotídeos S1 e S4 destinava-se a amplificar a unidade 18S do rDNA.

Reações de amplificação com os pares de “primers” S1/Luc2Rev e Luc465-484/S4 resultaram em fragmentos com tamanho aproximado de 2.4 kb (Figura 11C e 11E, canaleta 4) e 5.5 kb (Figura 11C e 11E canaleta 6), respectivamente, como esperado. Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para amplificações de DNA genômico das linhagens selvagens e não foi observada amplificação quando a reação continha “primers” que se anelavam à região *luc2* (Figura 11). A amplificação com “primers” complementares ao 18S (S1 e S4) resultou em fragmentos com tamanho de 2.2 kb, tanto na linhagem mutante quanto

na linhagem selvagem (Figura 11C e 11E, canaletas 1 e 2). Era de se esperar que a linhagem mutante apresentasse também um fragmento amplificado com tamanho de 8.9 kb mas sabe-se que o 18S é repetido várias vezes no genoma e a amplificação ocorre nas sequências que são mais abundantes, por isto foram detectados somente fragmentos de 2.2 kb referentes ao 18S sem integração.

Com base nestes resultados pode-se concluir que o cassete contendo o gene *luc2* foi integrado em uma cópia do gene que codifica a subunidade 18S do DNA ribossômico.

Figura 11 - PCR de DNA genômico das linhagens mutantes e selvagens. A. Esquema representativo da integração do cassete *pSSUint:luc2 α -tub* no genoma de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e representações das reações de PCR realizadas para confirmar a integração no locus da subunidade 18S do rDNA. As setas indicam as posições dos oligonucleotídeos utilizados. O esquema não está desenhado em escala. B-D. Separação em gel de agarose dos produtos amplificados obtidos a partir de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* (B e C) ou de *L. (L.) amazonensis* (D e E). B e D. Amplificação de *luc2* com os “primers” Luc2For e Luc2Rev de clones transfectados (1 – 4) e da cepa selvagem (5). C e E. Produtos de reações de amplificação com os “primers” S1 e S4 (1 e 2), S1 e Luc2Rev (3 e 4), Luc465-484 e S4 (5 e 6) a partir de DNA genômico de linhagem transfectada (2, 4 e 6) e da cepa selvagem (1, 3 e 5). Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII. Controle negativo da reação nas figuras C e E na canaleta 7 com os primers S1 e S4.

A produção de luz de 4 clones isolados de cada espécie foi avaliada comparativamente. Observamos que as 8 linhagens de parasitas expressavam luciferase. Os parasitas isolados da colônia 3, tanto de *L. (V.) braziliensis* (LbLUC) (Figura 12A) quanto de *L. (L.) amazonensis* (LaLUC) (Figura 12B), foram os escolhidos para prosseguir com os experimentos *in vitro* e *in vivo*. Estes clones foram denominados LbLUC3 e LaLUC3.

Figura 12 - Correlação entre a atividade de luciferase e o número de promastigotas em clones transgênicos de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) amazonensis* (B). Promastigotas das linhagens LbLUC3 e LaLUC3 foram diluídos seriadamente e, após a adição de luciferina, mediu-se luminescência em leitor de microplaca. Os resultados representam a média e o desvio padrão de triplicatas.

Foi realizado um teste comparativo entre LbLUC3 e LaLUC3, que teve como finalidade verificar se entre as duas espécies de leishmânia havia diferenças na intensidade de luz emitida. No ensaio de luciferase não foi estatisticamente significativo a diferença da intensidade de luz entre as duas espécies, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Comparação da intensidade de luz entre os clones transgênicos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Promastigotas das linhagens LbLUC3 e LaLUC3 foram diluídos seriadamente e, após a adição de luciferina, mediu-se luminescência em leitor de microplaca. Os resultados representam a média e desvio padrão de triplicatas. Resultado representativo de 3 experimentos

Para avaliar a estabilidade da expressão de *luc2* pelas linhagens mutantes, foi realizado o teste de luciferase de culturas mantidas sem higromicina por 25 passagens. Para as duas espécies, LbLUC3 e LaLUC3, não houve diferenças significativas quando comparadas a culturas mantidas com higromicina, como pode ser observado na Figura 14.

Investigamos também se havia alteração de expressão da proteína luciferase nas diferentes fases de crescimento. Realizamos o teste de luminescência no 3º dia de cultura (referente à fase log) e no 6º dia de crescimento (referente à fase estacionária) e verificamos que a expressão de luz é comparável nas duas fases. Esses dados demonstram que não há alteração da expressão de *luc2* nas diferentes fases do crescimento de promastigotas de LbLUC3 (Figura 15A) e LaLUC3 (Figura 15B). Esta afirmativa foi confirmada pela análise estatística.

Figura 14 - Correlação entre a atividade da luciferase e o número de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) amazonensis* (B) mantidos ou não com pressão de higromicina. Culturas de LbLUC3 e LaLUC3 foram mantidas em cultura por aproximadamente 25 passagens na presença ou na ausência de higromicina. Ao final desse período, a luminescência foi avaliada como descrito anteriormente. Os dados apresentados são da média e desvio padrão de amostras em triplicata representativos de 2 experimentos independentes.

Figura 15 - Correlação entre a atividade da luciferase e o número de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (**A**) e *L. (L.) amazonensis* (**B**) na fase log e estacionária de cultura. A luminescência foi avaliada como descrito anteriormente. Os dados apresentados são da média e desvio padrão de amostras em triplicata representativos de 2 experimentos independentes.

4.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS LINHAGENS MUTANTES

4.2.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE PROMASTIGOTAS

Curvas de crescimento foram obtidas cultivando-se promastigotas em meio 199 contendo higromicina para os parasitas mutantes e sem o antibiótico para as linhagens selvagens. Durante 7 dias realizou-se a contagem em câmara de Neubauer e foi calculado o número de parasitas por mL de cultura. As curvas de crescimento para as linhagens de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) amazonensis* são apresentadas nas figuras 16A e 16B, respectivamente. Podemos observar que todas as linhagens analisadas apresentaram a mesma cinética de crescimento, atingindo a fase estacionária por volta do 4º dia e com densidades semelhantes. Os dados obtidos demonstraram que o crescimento das linhagens mutantes das duas espécies foi equivalente aos das linhagens selvagens, demonstrando que a inserção do gene *luc2* não levou a alteração na replicação celular.

Figura 16 - Curva de crescimento de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) amazonensis* (B) selvagem e mutante. Os dados apresentados representam a média e desvio padrão de contagens realizadas em triplicata. Dois experimentos independentes.

4.2.2 SUSCETIBILIDADE A ANFOTERICINA B E TAMOXIFENO EM PROMASTIGOTAS DE LINHAGENS EXPRESSORAS DE LUCIFERASE

Para utilizar os parasitas mutantes para testes de novos fármacos, é de suma importância saber se a sensibilidade dos parasitas mutantes frente aos fármacos leishmanicidas foi alterada. O segundo teste realizado foi a comparação da sensibilidade de promastigotas das linhagens mutantes e selvagens frente a anfotericina B e tamoxifeno. Os testes da atividade de fármacos contra promastigotas foram realizados pela técnica de MTT.

As curvas dose-resposta obtidas permitiram concluir que a sensibilidade de linhagens mutantes expressoras de luciferase de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Figuras 17 e 18) a anfotericina B e a tamoxifeno não foram significativamente diferentes da sensibilidade das cepas selvagens respectivas aos dois fármacos. Os resultados da análise estatística são apresentados na Tabela 5. O teste de sensibilidade com promastigotas é o primeiro passo realizado nos experimentos para verificação da eficácia de um novo fármaco ou composto, assim é a primeira seleção dos fármacos mais promissores. Esses resultados indicam que a integração de um gene que codifica uma proteína não própria do parasita (*luc2*), não modificou a sensibilidade dos mesmos frente aos fármacos testados podendo assim ser utilizado nesta primeira etapa de seleção.

Figura 17 - Curva dose-resposta de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* selvagem e mutante frente ao fármaco anfotericina B. (A) *L. (V.) braziliensis* e (B) *L. (L.) amazonensis*. Os dados foram obtidos a partir de uma curva feita com amostras em triplicata. Representativo de três experimentos independentes.

Figura 18 - Curva dose-resposta de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* selvagem e mutante frente ao fármaco tamoxifeno. (A) *L. (V.) braziliensis* e (B) *L. (L.) amazonensis*. Os dados foram obtidos a partir de uma curva feita com amostras em triplicata. Representativo de três experimentos independentes.

Tabela 5 - Concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) de anfotericina B e tamoxifeno determinadas para promastigotas das linhagens selvagem e mutante.

Parasitas	CI ₅₀ (μM) ± SEM ^a Anfotericina B	P ^b	CI ₅₀ (μM) ± SEM ^a Tamoxifeno	P ^b
LaWT	0,157 ± 0,022	0,6802	13,513 ± 0,483	0,9484
LaLUC3	0,140 ± 0,031		13,567 ± 0,606	
LbWT	0,113 ± 0,007	0,4746	12,067 ± 0,572	0,0953
LbLUC3	0,113 ± 0,015		10,350 ± 0,150	

^aCI₅₀ ± SEM: Concentração inibitória 50% ± erro padrão da média

^b Valor de P: Teste estatístico t, sendo significativamente diferente P < 0,05.

Para completar a validação das linhagens mutantes era necessário também comparar a sensibilidade de amastigotas a fármacos padrão. Mas, antes de iniciar os testes de sensibilidade das amastigotas frente ao fármaco foi necessário saber se a infectividade das promastigotas mutantes em macrófagos murinos permanecia igual à da linhagem selvagem. Para isso realizamos testes comparando o perfil de infecção das duas linhagens de cada espécie.

4.2.3 INFECTIVIDADE DAS LINHAGENS MUTANTES

A infecção das células ocorreu com adição de diferentes proporções de promastigotas por macrófago. Em infecções por *L. (V.) braziliensis* foram testadas as proporções de 20:1, 25:1, 30:1 e 35:1. Em infecções por *L. (L.) amazonensis* foram utilizadas as proporções de 15:1, 20:1 e 25:1. Sabe-se que a eficiência de infecção de *L. (V.) braziliensis* é menor quando comparado a *L. (L.) amazonensis* por isto foram utilizadas proporções mais altas com a finalidade de se obter uma porcentagem de infecção acima de 60%. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem e os resultados demonstram correlação entre a proporção de parasitas/célula utilizada para iniciar a infecção (Figura 19A e 20A). Essa análise permitiu ainda verificar que infecções com promastigotas das linhagens selvagens e expressoras de luciferase apresentaram infectividade semelhante, tanto no caso de *L. (V.) braziliensis* como para *L. (L.) amazonensis*, o que também ocorreu no número de amastigotas por macrófago (Figura 19C e 20C).

Nós também analisamos a expressão de luz pelas leishmânias mutantes das duas espécies. A emissão de luz pelas amastigotas permitiu confirmar que a expressão de luciferase se dá em todos os estágios de vida do parasita, tanto para *L. (V.) braziliensis* quanto para *L. (L.) amazonensis*. Como pode ser observado nas Figuras 19B e 20B houve correlação entre a intensidade de luz e o número de células infectadas. Estes resultados demonstram que o gene inserido não alterou a capacidade de infecção dos parasitas mutantes sendo que o perfil de infecção foi igual ao do parasita selvagem. Isto é importante, pois gera maior segurança quando se avalia a eficiência do fármaco ou composto podendo facilmente ser distinguidos graus diferentes de toxicidade.

Figura 19 - Infecção de macrófagos com *L. (V.) braziliensis* selvagem e expressora de luciferase. Macrófagos de medula de camundongos BALB/c foram infectados diferentes razões de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por célula e posteriormente mantidos em cultura por 48 horas. A porcentagem de infecção foi avaliada por contagem (A) e (C) ou por detecção de luz (B). Foram utilizadas as linhagens: selvagem (WT) e mutante (LUC). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

Figura 20 - Infecção de macrófagos com *L. (L.) amazonensis* selvagem e expressora de luciferase. Macrófagos de medula de camundongos BALB/c foram infectados diferentes razões de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por célula e posteriormente mantidos em cultura por 48 horas. A porcentagem de infecção foi avaliada por contagem (**A**) e (**C**) ou por detecção de luz (**B**). Foram utilizadas as linhagens: selvagem (WT) e mutante (LUC). Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

4.2.4 SOBREVIVÊNCIA DE AMASTIGOTAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

A avaliação de atividade de alguns fármacos sobre amastigotas intracelulares exigem maior tempo de incubação como é o caso de miltefosina, que requer incubações de 72 horas, e antimoniais pentavalentes que necessitam de 120 horas de ensaio para uma atividade completa. Isto nos levou a avaliar comparativamente a sobrevivência de amastigotas intracelulares por períodos de até 120 horas. Na Figura 21 está ilustrado o perfil de sobrevivência para as duas espécies.

No caso de *L. (V.) braziliensis* podemos observar que nas primeiras 48 horas a porcentagem de macrófagos infectados se manteve estável e após este tempo houve diminuição da porcentagem que se manteve até o último dia de infecção (Figura 21A). O mesmo padrão é observado com relação ao número de amastigotas (Figura 21B).

Na Figura 21C está representado o comportamento de infecções por *L. (L.) amazonensis* que, diferentemente de *L. (V.) braziliensis*, mostrou aumento na porcentagem de macrófagos infectados com o passar do tempo, o que também se refletiu no número de amastigotas (21D). A análise estatística revelou ausência de diferenças significativas entre o perfil de infecção com a linhagem mutante e a linhagem selvagem das duas espécies, permanecendo um perfil idêntico de multiplicação das amastigotas.

Figura 21 - Infecção de macrófagos com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* selvagem e mutantes LbLUC3 e LaLUC3 ao longo do tempo. Macrófagos derivados de medula de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (A e B) e *L. (L.) amazonensis* (C e D). A porcentagem de infecção e o número de amastigotas foram determinados por microscopia óptica. Foram utilizadas as linhagens: selvagem (WT) e mutante (LUC). Foi realizado o teste estatístico (teste t) e o valor de P foi igual a 0,6986 para *L. (V.) braziliensis* e 0,7766 para *L. (L.) amazonensis*. Os dados representam a média de um experimento em duplicata representativo de dois experimentos independentes.

4.2.5 SUSCETIBILIDADE DE AMASTIGOTAS DE LINHAGENS EXPRESSORAS DE LUCIFERASE À ANFOTERICINA B

Com os resultados obtidos nos testes de infecção de macrófagos murinos, e no perfil de crescimento das amastigotas durante um período determinado foi visto que as linhagens mutantes e selvagens das duas espécies se comportaram da mesma forma. A fim de comparar a suscetibilidade de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* mutantes e selvagens ao fármaco anfotericina B foi realizado o teste de desafio ao fármaco em macrófagos infectados com amastigotas. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com formas promastigotas. Essas células infectadas foram tratadas com anfotericina B em concentrações crescentes.

Os resultados das análises das porcentagens de macrófagos infectados em cada concentração foram plotados obtendo-se uma curva dose resposta, em que não foram

observadas diferenças significativas entre as duas linhagens (Figura 22). Os valores de IC_{50} foram calculados e estão ilustrados na Tabela 6. Assim como havíamos observado para promastigotas, também em amastigotas não observamos diferenças significativas entre as linhagens selvagem e mutante, tanto para *L. (V.) braziliensis* como para *L. (L.) amazonensis*.

Figura 22 - Curva dose-resposta de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* selvagem e mutante frente ao fármaco anfotericina B. Macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) amazonensis* (B). Após 3 horas de incubação a 33 °C com 5% CO₂ os macrófagos infectados foram tratados com anfotericina B por 48 horas. Os macrófagos foram fixados e corados. A porcentagem de infecção foi avaliada por contagem. Os dados foram obtidos a partir de uma curva feita com amostras em triplicata, representativa de 3 experimentos independentes.

Tabela 6 - Concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) de anfotericina B determinadas para amastigotas das linhagens selvagem e mutante

Parasitas	CI ₅₀ (μM) ± SEM ^a Anfotericina B	P ^b
LaWT	0,047 ± 0,006	0,5942
LaLUC3	0,041 ± 0,007	
LbWT	0,050 ± 0,017	0,9765
LbLUC3	0,049 ± 0,011	

^a CI₅₀ ± SEM: Concentração inibitória 50% ± erro padrão da média.

^b Valor de P: Teste estatístico t, sendo significativamente diferente P < 0,05.

4.2.6 TESTES *IN VIVO*

4.2.6.1 INFECTIVIDADE EM CAMUNDONGOS

Os testes *in vivo* são o segundo passo para se comprovar a eficiência de um fármaco em teste, por isto a comparação da infectividade das linhagens mutantes de *L. (V.) braziliensis*

e *L. (L.) amazonensis* em modelos murinos seriam fundamentais para que se pudesse propor a utilização dessas linhagens para procura de novos compostos leishmanicidas.

Para avaliar o comportamento dos mutantes em infecções *in vivo*, grupos de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* selvagem e LbLUC3 e com *L. (L.) amazonensis* selvagem e LaLUC3.

Não houve desenvolvimento de lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* selvagem ou LbLUC3 até 5 meses após a infecção.

Como alternativa, foram também infectados camundongos C57/Bl6 nocaute para interferon gama e duplo nocaute para IL12 e interferon gama. Esses animais foram infectados na pata com amastigotas advindas de cultura de macrófagos *in vitro*. No grupo de animais infectados com LbLUC3 houve desenvolvimento de lesão após 5 meses de infecção em 100% dos animais. No grupo infectado com LbWT foi observado lesão somente em um animal após 6 meses. Os parasitas das lesões foram recuperados para realização de novos experimentos.

Para os animais infectados com *L. (L.) amazonensis*, após 4 semanas e meia foi observado o aparecimento da lesão em camundongos dos dois grupos (Figura 20). Nesse caso, observamos que o perfil de desenvolvimento da lesão em camundongos infectados com a linhagem mutante foi idêntico ao das infecções com a linhagem selvagem.

Figura 23 - Acompanhamento da lesão em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* selvagem e LaLUC3. Grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram infectados com 2×10^6 promastigotas no coxim plantar da pata esquerda. O tamanho da lesão foi considerado como a medida da espessura da pata infectada subtraindo-se a medida da pata contralateral não infectada.

4.2.6.2 BIOIMAGEAMENTO

A avaliação de carga parasitária em animais infectados com as linhagens mutantes foi realizada através de bioimageamento. Assim, na 8ª semana após a infecção foram examinados os animais infectados com LbLUC3 e LaLUC3 (Figuras 24 e 25). Como descrito

acima, não houve desenvolvimento de lesão em camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Em concordância com esse fato, também não foi observada emissão de luz no sítio da inoculação ou em qualquer outra localização nesses animais (Figura 24). Com relação a *L. (V.) braziliensis* novas tentativas de infecção serão realizadas. Em contraste, em camundongos infectados com a linhagem LaLUC3 foi evidenciada emissão de luz no sítio da lesão (Figura 25).

Figura 24 - Bioluminescência de camundongos BALB/C infectados com *L. (V.) braziliensis luc2*. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de LbLUC3 na pata esquerda. Na 8ª semana após a infecção foi realizado o teste de bioimagemamento.

Figura 25 - Bioluminescência em camundongos BALB/C infectados com *L. (L.) amazonensis luc2*. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de LaLUC3 na pata esquerda. Na 8ª semana após a infecção foi realizado o teste de bioimagemamento.

4.2.7.3 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR DILUIÇÃO LIMITANTE

Além de avaliar o tamanho e desenvolvimento das lesões, comparamos também as infecções por *L. (L.) amazonensis* através da determinação da carga parasitária por diluição limitante. Esta é uma técnica que permite determinar o número de parasitas presentes na lesão através das diluições seriadas de amastigotas obtidos por maceração da pata e lavagens. Esses parasitas são cultivados em condições adequadas para desenvolvimento de promastigotas, permitindo assim não só a determinação de número, mas também de viabilidade dos parasitas.

Observamos que não houve diferenças significativas entre a carga parasitária de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* selvagem e LaLUC3 (Figura 26). Assim, os dados obtidos *in vivo* não revelaram diferenças significativas tanto no tamanho da lesão quanto na carga parasitária entre as linhagens selvagem e mutante. Isto indica que a infectividade *in vivo* não foi alterada pela manipulação do parasita. Ficou também demonstrado que as leishmânias presentes na lesão dos camundongos infectados expressam luciferase sendo detectados pelo bioimageamento. Isto demonstra a segurança na utilização deste novo modelo também em testes *in vivo*.

Figura 26 - Avaliação da carga parasitária em camundongos infectados com LaWT e LaLUC3. Após 12 semanas da infecção quantificou-se o número de parasitas na lesão por diluição limitante. Cada símbolo representa um animal ($n = 5$ por grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (teste t de Student).

No Brasil os agentes etiológicos mais comuns de leishmaniose cutânea são as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Estas espécies estão distribuídas diferencialmente no país, podendo as áreas de suas localizações se sobrepor ou não. Outra diferença entre elas está nas formas com manifestações graves, incluindo o tipo de lesão, área do corpo acometida e carga parasitária. Estudos envolvendo a *L. (V.) braziliensis* não são muito comuns, principalmente nos laboratórios de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de leishmaniose. Um dos motivos que justificam isso ocorre é a dificuldade em se trabalhar com algumas cepas desta espécie, principalmente com relação a testes de infecções *in vitro* e *in vivo*. Muitas cepas são pouco infectivas gerando, em testes em macrófagos, baixas porcentagens de infecção. Em infecções em modelos murinos como, por exemplo, camundongos BALB/c, também é visto carga parasitária baixa com um perfil de doença que geralmente leva a auto-cura ou até mesmo a ausência de lesão.

A espécie *L. (L.) amazonensis*, ao contrário de *L. (V.) braziliensis* é muito infectiva e virulenta, sendo utilizada como modelo padrão nos testes realizados em muitos laboratórios do país e uma referência da eficácia terapêutica com fármacos e compostos testados. Nos testes em macrófagos é observada maior facilidade de se obter altas porcentagens de infecção e camundongos BALB/c são bastante sensíveis a esta espécie, gerando lesões bastante danosas ao tecido infectado, podendo levar a perda do membro.

Os testes clássicos de seleção de novos compostos são muito laboriosos, exigem muito tempo, são sujeitos a erros manuais e não permitem a utilização de automação. Para avaliação da atividade de fármacos frente a amastigotas de *Leishmania sp.* são utilizados classicamente dois testes. O primeiro, *in vitro*, é realizado através do ensaio de atividade em macrófagos infectados sendo avaliados por microscopia o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago. O segundo refere-se à avaliação de atividade do fármaco *in vivo*, em modelo experimental. Nesse caso, os animais são infectados e posteriormente tratados com o composto de interesse. A avaliação da eficácia ao final do tratamento é feita através da determinação da carga parasitária na lesão ou dos órgãos de animais infectados pelo método de diluição limitante. Dessa forma, a disponibilidade de ferramentas que acelerem e facilitem essas determinações seria de grande valor.

A utilização de genes repórteres é uma ferramenta que está sendo muito utilizada como alternativa no melhoramento de testes de seleção de candidatos ao tratamento de diversas doenças, dentre elas as parasitárias. Na tabela a seguir, estão alguns exemplos de parasitas e respectivos genes repórteres que são utilizados em testes laboratoriais.

Tabela 7 - Exemplos de parasitas e genes repórteres utilizados na pesquisa.

Parasitas	Espécies	Gene repórter	Expressão	Aplicações ^b	Tecnologia usada ^c	Ref.
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	GFP	Epissomal e integrada	Seleção de fármaco	FACS	(Singh, Dube, 2004; Singh et al., 2009)
		Luciferase	Epissomal	Seleção de fármaco	Luminômetro	(Luque-Ortega et al., 2001)
		Luciferase	Epissomal	Seleção de fármaco	Luminômetro	(Ashutosh et al., 20005)
	<i>L. amazonensis</i>	Luciferase	Integrado	Seleção de fármaco	Luminômetro	(Serenio et al., 2001)
		GFP	Epissomal	Seleção de fármaco	Espectrofluorimetro	(Chan et al., 2008)
		EGFP	Epissomal	Imagem animal	CCD - câmera	(Mehta et al., 2008)
		β -galactosidase	Epissomal	Seleção de fármacos	Leitor de microplaca	(Ouno et al., 2003)
	<i>L. major</i>	Luciferase	Epissomal e integrada	ND	ND	(Roy et al., 2000)
		β -galactosidase	Integrada	ND	ND	(Misslitz et al., 2000)
	<i>L. mexicana</i>	GFP	Epissomal	Seleção de fármaco	FACS	(Plock et al., 20001)
		β -galactosidase	Integrada	ND	ND	(Misslitz et al., 2000)
<i>Plasmodium</i>	<i>P. berghei</i>	GFP	Integrado	Seleção de fármacos	FACS	(Sanchez et al., 2004)
		Luciferase	Integrado	Imagem em tempo real	CCD câmera	(Franke-Fayard et al., 2006)
	<i>P. yoelli</i>	GFP	Integrado	Imagem – camundongo BALB/c	MF e FACS	(Tarun et al., 2006)

	<i>P. falciparum</i>	GFP	Integrado	Seleção de fármacos	FACS	(Sanchez et al., 2007)
<i>Trypanosoma</i>	<i>T. brucei</i>	EGFP, ECFP, EYFP	Integrado	Parasitas sanguíneos	FACS	(Balmer, Tostado, 2006)
	<i>T. cruzi</i>	Luciferase	Integrado	Imagem – mosca Tsetse	MF	(DaRocha et al., 2004)
		β -galactosidase	Epissomal	Seleção de fármacos – Epimastigota	ELISA	(Buckner et al., 1996)
		Luciferase + GFP	Integrado	Imagem animal	CCD câmera	(Saeih et al., 2005)
<i>Toxoplasma</i>	<i>T. gondii</i>	YFP	Integrado	Seleção de fármacos	FACS	(Gubbels et al., 2003)
		β -galactosidase	Epissomal	Seleção de fármacos	ELISA	(McFadden et al., 1997)

^{b, c} ND, não determinado; MF, microscopia fluorescente.

Fonte: Modificado de Dube, Gupta, Singh, 2009.

A expressão de um gene repórter em *Leishmania* pode ser obtida por dois mecanismos: a partir de DNA extracromossômico ou plasmidial ou por integração cromossômica do gene de interesse, por recombinação homóloga. A expressão a partir de DNA extracromossômico acontece quando o parasita é transfectado com um plasmídio circular que contém o gene de interesse e as sequências necessárias para a expressão do mesmo. Este tipo de expressão é muito utilizado na atualidade como ferramenta de diversos estudos, como na construção de super-expressores, no desenvolvimento de parasitas resistentes e na expressão de genes repórteres.

Reimão et al., 2013 expressaram o gene *luc1* a partir de epissomo em *L. (L.) amazonensis* e demonstraram a identidade da linhagem mutante (La-LUC) com a linhagem selvagem (La-WT) em vários parâmetros biológicos *in vitro* e *in vivo*. A emissão de luz apresentou correlação com o número de promastigotas, o que também foi visto na determinação da carga parasitária *in vivo*.

A expressão de genes a partir de DNA extracromossômico tem algumas desvantagens. A primeira é a expressão heterogênea da proteína devido à diferença do número

de cópias de plasmídeo presentes em cada célula (Roy et al., 2000) e a segunda é a necessidade de manter a cultura de parasitas constantemente com a pressão do fármaco de seleção, para não haver a perda de expressão protéica (Costa Sds et al., 2012). Esta pressão em experimentos *in vivo* é inviável, isto porque a administração do antibiótico de seleção poderia interferir nos resultados obtidos com os fármacos ou compostos em teste.

Além das desvantagens apontadas, temos ainda um ponto muito importante: é o fato de ser inviável a manutenção de DNA extracromossômico em *L. (V.) braziliensis*. Sabe-se que espécies do subgênero *Viannia* possuem o mecanismo de RNA de interferência (RNAi) intacto que interfere na estabilidade de RNAs específicos, impedindo a expressão de genes. Assim como *L. (V.) braziliensis*, sabe-se que *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono na África, *Plasmodium falciparum*, responsável pela doença conhecida como malária, *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose e *Entamoeba histolytica*, protozoário causador da disenteria grave, também possuem maquinaria de RNAi funcionais (Kolev et al., 2011).

Uma maneira de contornar esses pontos negativos citados para a expressão plasmidial é a integração do gene repórter por recombinação homóloga. Por isso, este foi o método escolhido para a inserção da fase aberta de leitura da luciferase (*luc2*) nos mutantes de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* que pretendíamos obter. Esta metodologia consiste na integração de um determinado gene no DNA da célula de interesse. E esta integração acontece quando o cassete transfectado contém, em suas extremidades, sequências de nucleotídeos idênticos à região de interesse no DNA da célula, que direcionam a integração no local determinado. O local escolhido para a inserção da *luc2* nos parasitas foi a região 18S do rDNA. A escolha dessa região se deve à obtenção de grande quantidade de proteínas em tripanosomatídeos durante todas as fases de vida da leishmânia devido a alta taxa de transcrição pela RNA polimerase I. Sabe-se que ao contrário da RNA polimerase II, a RNA polimerase I possui dentre suas características um forte promotor, sendo este um dos pontos principais para a escolha desta região (Uliana, Cruz, 2007).

O plasmídeo escolhido para realizar a construção do cassete de transfecção que permitiu a integração no rDNA foi o pSSUint. Este plasmídeo contém as sequências idênticas às extremidades da região 18S, também a sequência que codifica a proteína higromicina fosfotransferase e sequências não tradutoras (UTR) que são essenciais para a correta maturação do RNAm, com sítios para a poliadenilação e ligação do mini-exon. Mas, no sítio de clonagem do plasmídeo, como pode ser observado na Figura 5, não havia um 3'

UTR para o processamento da *luc2*. Para cumprir essa função, foi escolhido o 3' UTR de α -tubulina de *Leishmania* (α -*tub*), amplificado a partir do plasmídio *pSPaHYGa*.

A fusão das duas sequências, *luc2* e α -*tub*, foi obtida pela técnica de PCR “overlap”. Outro método de ligação entre dois fragmentos seria pela utilização da enzima T4 DNA ligase. Como os sítios de clivagem de enzimas de restrição presentes nas duas sequências, *luc2* e α -*Tub*, não eram compatíveis para ocorrer a ligação sem perder a estrutura de fase aberta de leitura foi utilizado o PCR “overlap”.

A fusão gerou um inserto nomeado de *luc2 α -tub*, que foi ligado ao plasmídio *pSSUint* (*pSSUint:luc2 α -tub*). A clonagem foi examinada através da verificação da orientação correta do inserto e por sequenciamento da *luc2*. O cassete SSU:*luc2 α -tub* foi a seguir transfectado em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

A emissão de luz foi detectada em testes realizados em transfectantes das duas espécies. Isto demonstrou que a construção do cassete estava correta, e que o 3' UTR adicionado desempenhou a sua função na maturação do RNAm. Esta primeira avaliação da expressão de luz foi realizada com parasitas advindos de cultura heterogênea, mas para efeito de avaliação fenotípica era importante que trabalhássemos com linhagens clonais. Através de plaqueamento em meio semi-sólido foram então selecionadas quatro colônias de cada espécie.

O teste de luminescência revelou que o clone 3 das duas espécies era capaz de produzir mais luz. Embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, estes foram os clones escolhidos para continuar com os experimentos. Dentre as duas espécies foi observada inicialmente uma pequena diferença de intensidade de luz com produção mais intensa em *L. (V.) braziliensis*, que também não foi estatisticamente significativa.

A proposta do trabalho foi integrar o gene *luc2* por recombinação homóloga. O cassete transfectado possuía regiões que direcionariam a integração na subunidade 18S do rDNA, mas era necessário comprovar que a integração tinha ocorrido e na localização planejada. A técnica de PCR foi utilizada para verificar o local de integração de *luc2*. Para isto, utilizamos “primers” internos e externos ao cassete, ou seja, “primers” que se anelariam ao gene *luc2* ou ao rDNA 18S. Em relação ao rDNA 18S, os oligonucleotídeos eram complementares a sequências não contidas no cassete transfectado. Os resultados provaram a integração no rDNA dos parasitas mutantes pelo tamanho dos fragmentos amplificados. A utilização dos mesmos “primers” em reações com DNA de parasitas selvagens revelou ausência de amplificação como esperado, a não ser com a reação utilizando somente os primers externos (S1 e S4). O tamanho da banda correspondente a amplificação com o S1 e S4 foram iguais para as duas linhagens, pois o 18S é repetido dezenas de vezes no genoma,

com isto ocorreu a amplificação das sequências mais abundantes. Este teste foi importante também para nos certificarmos que estávamos lidando realmente com a linhagem selvagem (sem *luc2*) e que a cultura destes parasitas não havia sido contaminada com parasitas mutantes.

Outro ponto abordado foi verificar se havia alteração da expressão da proteína luciferase nas diferentes fases de crescimento. Para verificar isto foi avaliada a intensidade de luz em promastigotas de fase logarítmica de crescimento em comparação a promastigotas de fase estacionária. Não verificamos diferenças significativas na produção de luz entre as duas fases de crescimento das duas espécies.

Como sabemos, pode haver diminuição da expressão de uma proteína que não é originalmente do genoma da leishmânia quando a cultura não é mantida sob pressão do fármaco de seleção. As culturas de leishmânias mutantes foram então mantidas sem higromicina para verificar a estabilidade de expressão de *luc2*. A expressão foi avaliada pela verificação da emissão de luz, em comparação com culturas mantidas com higromicina. Mesmo após 25 passagens na ausência de pressão de seleção, não detectamos diminuição da emissão de luz estatisticamente significativa em linhagens de *L. (V.) braziliensis* ou de *L. (L.) amazonensis*.

A luciferase é uma enzima produzida por vários organismos vivos como bactérias, dinoflagelados, peixes, insetos, etc. Ela utiliza um substrato para gerar luz que pode variar em coloração, de vermelha a azul. A luciferase de *Photinus pyralis* (FLuc) é a mais comumente utilizada no ambiente científico, sendo empregada em testes de biologia molecular, bioanalítica, determinação de ATP, gene repórter. A substituição de testes laboriosos por alternativas mais fáceis e mais sensíveis são desejáveis em laboratórios de pesquisas. Projetos que buscam selecionar compostos em larga escala, utilizando o processo conhecido como High Throughput Screening (HTS), são exemplos claros da ampla utilização da tecnologia de genes repórteres, tornando o procedimento mais rápido, mais sensível e mais simples. Além da luciferase existe outros reportes que são comumente utilizados na pesquisa, como β -galactosidase e as proteínas fluorescentes.

A β -galactosidase é uma hidrolase utilizada em Biologia Molecular para monitorar a expressão gênica. Há dois métodos de avaliação quando se utiliza esta enzima dependendo do tipo de substrato utilizado. A reação com o substrato 5-bromo-4cloro-3-indoi- β -D-galactopiranosil (X-gal) gera um precipitado azul, que é detectado por leitura da densidade óptica e a segunda reação utiliza o substrato fluoresceína- β -digalactopiranosil (FDG) por detecção fluorimétrica (Qureshi, 2007). É uma enzima com alta estabilidade, mas apresenta

como pontos negativos a baixa sensibilidade de detecção e a interferência pela expressão endógena de certas proteínas das células de mamíferos, como macrófagos (Gupta, 2011).

As proteínas fluorescentes são amplamente utilizadas nas áreas da biologia, engenharia genética e microbiologia, por possuir fácil monitoramento cinético, baixo custo e não necessitar de substrato. A mais utilizada é a proteína fluorescente verde (GFP) isolada da água-viva *Aequorea victoria*. Embora seja de fácil detecção, existem dificuldades na utilização de GFP em triagens de alta produtividade ou HTS dado as baixas intensidades de fluorescência produzidas pelas células. Além dessa limitação para testes *in vitro*, a utilização deste gene repórter em testes *in vivo* possui baixa sensibilidade por causa da autofluorescência transmitida pelo pêlo do animal utilizado como modelo experimental. Muitos estudos estão sendo realizados para produzir novas versões de proteínas com maior intensidade da fluorescência, que cubram uma faixa ampla de espectro e também possam exibir maior fotoestabilidade. Já existem descritas na literatura modificações da GFP “wild type” (wtGFP) que emitem variantes de fluorescência amarela (YFP), azul (BFP), ciano (CFP) e foi descoberto a partir de um recife de corais espectro de fluorescência vermelha (RFP) (Dube et al., 2009; Gupta, 2011; Shaner et al., 2007).

O teste de bioluminescência utilizando a enzima luciferase possui alguns desafios a serem superados, como a inibição da atividade de luciferase. Nos laboratórios que utilizam a metodologia de HTS tem sido identificados casos de falso-positivos, ou seja, em determinados casos os valores de IC_{50} são abaixo do real valor devido à interferência de compostos na atividade enzimática da luciferase. Por exemplo, em uma biblioteca com 70.000 compostos aproximadamente 3% inibem a FLuc (Auld et al., 2008). A inibição pode acontecer por competição específica com um ou mais substratos e inibição não específica, como por exemplo, por desnaturação ou atenuação do sinal de luz. A FLuc é uma enzima que é susceptível a inibição por pequenas moléculas utilizadas em testes de seleção, por causa da presença de estruturas químicas similares ao substrato luciferina. Dentre as principais substâncias que interferem na atividade da luciferase, estão compostos que contêm quinolonas, 1,2,4-oxadiazóis e benzo-diazóis, ácidos graxos, anestésicos, produtos ou intermediários da reação da luciferase (Auld et al., 2008; Leitão, Esteves da Silva, 2010).

Na inibição por anestésicos foi demonstrado que a inibição não é competitiva, mas ocorre uma inibição inespecífica quando a concentração do anestésico é aumentada (Leitão, Esteves da Silva, 2010). Foi demonstrado que reações com ácidos graxos possuem dois modos de ação na FLuc e que estes são dependentes do comprimento da cadeia de carbono, sendo que os ácidos graxos com mais de 10 carbonos possuem alta afinidade a ligação a FLuc

e os com menos de 8 carbonos possuem menor atividade com ligação inespecífica (Matsuki et al., 1999). Em casos de ácidos graxos de cadeia pequena o aumento hidrofóbico pode justificar a afinidade no centro ativo da FLuc e em ácidos graxos de cadeia longa demonstram uma inibição competitiva com a luciferina em concentrações micromolares (Leitão, Esteves da Silva, 2010). Dentre outros inibidores de Luc estão os íons inorgânicos e vários compostos químicos.

Estes dados demonstram que a utilização da luciferase de *Photinus pyralis* em seleção de novos compostos tem suas limitações, sendo que pode haver interferência de algumas substâncias, inibindo ou exacerbando a atividade da luciferase. Este problema pode ser evitado quando se conhece a estrutura do composto teste, podendo-se avaliar estruturalmente a similaridade ou não com a luciferina. É possível também evidenciar inibição através da realização do teste direto utilizando a proteína luciferase recombinante para verificar se há interferência na expressão de luz por tal composto. Contudo, essa estratégia não é viável para grande número de compostos-teste.

Poderíamos então perguntar: qual seria o melhor gene repórter para utilização na seleção de compostos ativos contra um determinado microrganismo?

Na classe das luciferases existem diversas enzimas que utilizam diferentes tipos de substratos. Em algumas situações a enzima utiliza mais de um substrato, como é o caso de Renilla o que diminui as chances de ocorrer interferência. RLuc (luciferase de Renilla) é comumente utilizada como gene repórter, não tem sequências compartilhadas com FLuc (luciferase de *Photinus*) e a produção de luz é independente de ATP. A RLuc foi pouco utilizada como gene repórter durante algum tempo porque, ao contrário de FLuc, ela apresenta baixa sensibilidade, emitindo luz dentro do espectro do azul, enquanto o espectro da FLuc está na região da luz verde. Alguns pesquisadores se propuseram a modificar a estrutura da RLuc para melhorar a intensidade de luz, já que as chances de interferência são menores, e uma das modificações foi a mudança do espectro de luz, modificando para vermelha. Loening e colaboradores desenvolveram várias modificações de RLuc pela técnica de mutações aleatórias de sítio específica, em que utilizando a técnica de PCR direcionam a mutações em pares específicos de resíduos. Bactérias foram utilizadas para fazer a primeira validação de testes de bioluminescência, com detecção do espectro de luz que está sendo emitido. Foi observado melhoria de quase duas vezes e em imagem de camundongos um aumento de 3,3 vezes no sinal, sendo que a estabilidade intracelular foi comparada à RLuc nativa (Loening et al., 2009). A mudança da coloração de luz é um fenômeno visto em certos organismos vivos, onde pequenas modificações na sequência da luciferase podem gerar diversas cores.

Outra opção inovadora é a utilização de luciferases duplas como a “Caribbean click beetle” (CBLuc) que gera duas cores (vermelha e verde). Com esta tecnologia é possível ter duas luciferases em um organismo sendo expressas em momentos diferentes, podendo assim ser escolhida a melhor alternativa dependendo do experimento a ser realizado. A detecção de CBLuc e FLuc exige a lise das células, enquanto o uso de luciferases que são naturalmente secretadas, como as “Copepod crustacean” (GLuc) ou “Ostracod crustacean” (CLuc) parece ser adequado para testes que poderiam se beneficiar de detecção não invasiva. A GLuc possui baixa taxa de inibição a compostos sendo uma das opções a ser utilizada em HTS. Avaliando os genes repórteres mais utilizados e alguns que ainda estão sendo melhorados, sugere que a melhor escolha é ainda bastante restrita ao objetivo do teste, não havendo muitas alternativas que permitam utilizar um repórter para diversas funcionalidades com a mesma sensibilidade e especificidade.

A inserção de um gene estranho no DNA de uma célula pode gerar modificações fenotípicas e a proposta de utilização de parasitas expressores de *luc2* como nova alternativa de testes para seleção de novos fármacos depende da demonstração de que a linhagem mutante não apresente tais alterações quando comparada à linhagem selvagem. O crescimento de promastigotas é um dos aspectos importantes onde podemos inicialmente verificar se a expressão de *luc2* gerou alguma modificação fenotípica. Alterações no crescimento celular indicam modificações no processo de replicação da célula, e se observadas, poderiam indicar que a integração da *luc2* interferiu em alguma das fases deste processo. Os dados obtidos das contagens demonstraram que o crescimento da linhagem mutante foi indistinguível da linhagem selvagem, confirmando que apesar da inserção da *luc2* não ocorreu alteração na replicação celular nas linhagens mutantes de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

A verificação da sensibilidade das linhagens mutantes a alguns fármacos foi o segundo passo nos testes comparativos. Foram utilizados fármacos padronizados no laboratório sendo eles anfotericina B e tamoxifeno para promastigotas e anfotericina B para amastigotas. Os testes com promastigotas foram realizados pela técnica de MTT, sendo este um teste colorimétrico que avalia a atividade mitocondrial através da transformação de MTT em formazan pela ação de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH. Os cristais de formazan são intensamente coloridos sendo possível a leitura em leitor de placas para a determinação da D.O. Com a curva de dose resposta gerada foi observada a identidade entre as linhagens mutantes e selvagens de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) amazonensis*. Os valores de IC₅₀ para tamoxifeno em LbWT foram de $12,067 \pm 0,57 \mu\text{M}$ e $10,350 \pm 0,15 \mu\text{M}$ para LbLUC3, nas análises estatísticas revelou que essas determinações não foram considerados

significativamente diferentes. Este nível de variação é comumente observado em determinações independentes de atividade para tamoxifeno.

A forma amastigota é o principal alvo nos estudos envolvendo o tratamento de leishmaniose. Na seleção de novos fármacos a atividade dos mesmos frente à forma amastigota é avaliada em experimentos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nos testes *in vitro* uma das principais avaliações é a determinação da porcentagem de macrófagos infectados por microscopia. A contagem microscópica para determinação do número de células infectadas exige muito tempo e a proposta de construir parasitas mutantes expressores de *luc2* destinava-se a substituir esta metodologia. Para verificar se estes parasitas mutantes estavam aptos a serem utilizados em testes de seleção, nos propusemos a avaliar a sensibilidade das formas amastigotas ao fármaco anfotericina B.

Primeiramente foram realizados alguns testes para verificar a infectividade das linhagens mutantes e selvagens das duas espécies para macrófagos derivados de medula óssea. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de infecção após 48 horas com diferentes concentrações de parasitas por macrófagos e o perfil de sobrevivência dos parasitas até 120 horas de incubação.

A *L. (V.) braziliensis* não demonstrou uma correlação direta nas quatro proporções de infecção realizada, apresentando uma porcentagem de infecção igual entre as proporções 20:1 e 25:1 e também 30:1 e 35:1. Este comportamento esteve presente nas duas linhagens LbWT e LbLUC3 levando à conclusão de que esta é uma característica da espécie. Diferente da *L. (V.) braziliensis* a porcentagem de infecção de *L. (L.) amazonensis* apresentou correlação com as três proporções de infecções realizadas. Foi realizado em paralelo o teste de luminescência que detectou luz produzida pelas amastigotas intracelulares, que demonstrou correlação entre o número de parasitas adicionados por placa com a intensidade de luz emitida. Houve diferenças entre espécies também no perfil de sobrevivência de amastigotas, sendo que a porcentagem de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* permaneceu estável nas primeiras 48 horas e após este tempo tanto o número de macrófagos infectados como o número de amastigotas diminuíram. Esses dados sugerem que esta espécie é mais susceptível à ação do macrófago, mas após este tempo ela consegue modular a resposta do macrófago e se manter estável até 120 horas.

Com relação a *L. (L.) amazonensis* não houve diminuição da carga parasitária em nenhum momento durante o acompanhamento de 120 horas, ao contrário o número de parasitas aumentou. No final de 120 horas os macrófagos apresentavam enormes vacúolos e

elevado número de parasitas. Estes dados demonstraram quão divergentes são as duas espécies apresentando também *in vitro* perfis diferentes de infecção.

Com os resultados obtidos nos testes de infecção de macrófagos murinos e no perfil de sobrevivência de amastigotas foi visto que as linhagens mutantes e selvagens das duas espécies se comportam da mesma forma. A seguir foi realizado o teste de sensibilidade à anfotericina B, que mais uma vez demonstrou a identidade entre as linhagens LUC e WT. Os resultados obtidos até agora geram a segurança necessária para que os parasitas expressores de *luc2* possam ser utilizados nos testes *in vitro* de novos fármacos, pois como pode ser visto os parasitas mutantes não apresentaram alterações fenotípicas em comparação aos parasitas selvagens.

Os testes de avaliação da atividade de fármacos ou compostos *in vivo* representam o último passo antes de iniciar os testes em humanos e por isto os resultados obtidos com os experimentos de comparação realizados em modelos murinos foram fundamentais para se validar a utilização destes parasitas em testes *in vivo*. Neste experimento as patas dos animais infectados foram medidas semanalmente, sendo este o modo de avaliação da eficácia de um fármaco em modelos de leishmaniose tegumentar. Para a avaliação da carga parasitária foi utilizada a diluição limitante, sendo este um dos métodos mais laboriosos no delineamento experimental no processo de seleção de um candidato a fármaco leishmanicida. A diluição limitante apresenta muitas variáveis, como perda de amastigotas na lavagem, variação manual, probabilidade de contaminação, entre outros. A utilização de um parasita que emite luz proporciona maior agilidade nesta avaliação, elimina os erros manuais e contaminação, e um dos aspectos mais importantes é a utilização de menor número de animais nos experimentos realizados. Isto porque o mesmo animal poderá ser acompanhado durante todos os passos do experimento, não sendo necessário o sacrifício do mesmo para a avaliação da carga parasitária. As vantagens na utilização deste modelo já foram descritas pelo nosso grupo (Reimão et al., 2013; Trinconi et al., 2014) e podemos observar a melhoria nos resultados, a diminuição do uso de animais em cada experimento e o acompanhamento dos grupos durante os experimentos diminuindo as variáveis.

Camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* não apresentaram lesão até a oitava semana pós-infecção. Nesse momento foi realizado o teste de bioluminescência *in vivo* que revelou ausência de produção de luz, indicando que os animais realmente não haviam se infectado com o inóculo injetado. Para tentar estabelecer infecção com a linhagem LbLUC3 e *L. (V.) braziliensis* selvagem em modelo murino foram infectados camundongos C57BL/6 “knockout” para IFN- γ . Após 5 meses detectamos a presença de lesão em animais infectados

com LbLUC3 e em um animal inoculado com a linhagem selvagem de *L. (V.) braziliensis* (resultados não apresentados). Com estes resultados foi demonstrado que a cepa utilizada não é muito virulenta, sendo incapaz de causar infecção em camundongos BALB/c e capaz de causar uma infecção tardia em camundongos C57BL/6 “knockout”.

Já que as tentativas de infecção em camundongos pareciam falhar, tentamos também a infecção em hamsters, que é um modelo utilizado para infecção com *L. (V.) braziliensis* (Moraes-Teixeira et al., 2008). Nesse caso, o local de infecção escolhido geralmente é a superfície do nariz gerando manifestação mucocutânea, entretanto a infecção também pode ser iniciada na pata. Nós optamos por utilizar inóculos na pata para continuarmos com o mesmo método de avaliação de medição da espessura. A injeção de 2×10^6 promastigotas por pata resultou em desenvolvimento de lesão a partir da terceira semana em animais infectados com LbLUC3. Na quinta semana após a infecção o inchaço da pata é bem evidente, como pode ser observado na Figura 27. Os hamsters infectados com a linhagem selvagem desenvolveram uma pequena lesão que foi observada a partir de um mês após a infecção. Parasitas isolados desses animais foram utilizados para iniciar novas infecções de modo a comparar o padrão de evolução clínica entre infecções com a cepa selvagem e a cepa mutante de *L. (V.) braziliensis*.

Figura 27 - Infecção de hamster com *L. (V.) braziliensis*. Hamsters foram infectados na pata esquerda com 2×10^6 promastigotas na fase estacionária de *L. (V.) braziliensis*. Foto na 5ª semana após a infecção representativa de 3 animais infectados. Controle: pata direita não infectada.

Em contraste, animais infectados com LaLUC3 e com a cepa selvagem de *L. (L.) amazonensis* mostraram progressão da lesão a partir da terceira semana pós-inóculo. A progressão da lesão foi comparável entre os dois grupos. Oito semanas após a infecção, foi possível detectar a produção de luz nas patas de camundongos BALB/c infectados com LaLUC3 por bioimageamento. Estes resultados demonstraram também *in vivo* a identidade entre as linhagens obtidas e a emissão de luz produzida pelos parasitas mutantes, confirmando assim a possibilidade de substituição da técnica de diluição limitante pela técnica de bioluminescência.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, pudemos comprovar que as linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* expressoras de luciferase tem comportamento biológico semelhante às respectivas cepas selvagens. Estes dados geram a segurança necessária para substituir os principais testes realizados em um laboratório de seleção de fármacos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* pela técnica de luminescência. Dessa forma, acreditamos que novos trabalhos surgirão e estes contribuirão para o avanço na descoberta de novas alternativas para o tratamento de leishmaniose cutânea.

6 CONCLUSÕES

- A expressão de luciferase em LbLUC3 e LaLUC3 ocorreu nos diferentes estágios de vida do parasita.
- Promastigotas das linhagens mutantes de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram perfil de crescimento e de sensibilidade aos fármacos anfotericina B e tamoxifeno semelhantes às cepas selvagens.
- Amastigotas das linhagens mutantes de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram sensibilidade ao fármaco anfotericina B, porcentagem de infecção em macrófagos e perfil de sobrevivência de amastigotas semelhantes às cepas selvagens.
- Observamos o mesmo perfil de desenvolvimento da lesão em camundongos BALB/c infectados com as linhagens mutante e selvagem de *L. (L.) amazonensis*.
- Não foi possível estabelecer um perfil comparativo entre a linhagem mutante e a cepa selvagem de *L. (V.) braziliensis* em modelos murinos até o momento.

REFERÊNCIAS*

- Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2006;61:223-74.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5):e35671.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1269-81.
- Ashutosh, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3776-83.
- Auld DS, Thorne N, Nguyen DT, Inglese J. A specific mechanism for nonspecific activation in reporter-gene assays. *ACS Chem Biol.* 2008;15;3(8):463-70.
- Auld DS, Southall NT, Jadhav A, Johnson RL, Diller DJ, Simeonov A, et al. Characterization of chemical libraries for luciferase inhibitory activity. *J Med Chem.* 2008;24;51(8):2372-86.
- Balmer O, Tostado C. New fluorescence markers to distinguish co-infecting *Trypanosoma brucei* strains in experimental multiple infections. *Acta Trop.* 2006;97(1):94-101.
- Basano SA CL. Leishmaniose tegumentar Americana, epidemiologia e perspectiva de controle. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7:328 – 37.
- Beverley SM. Protozoomics: Trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat Rev Genet.* 2003;4:11 - 9.
- Bhandari V, Kulshrestha A, Deep DK, Stark O, Prajapati VK, Ramesh V, et al. Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1657.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;24;7(6):1513-23.
- Bitler B, Mc EW. The preparation and properties of crystalline firefly luciferin. *Arch Biochem Biophys.* 1957;72(2):358-68.
- Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral. Brasília - DF; 2006. 120 p.
- Brasil. Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. 2 ed. Brasília -DF; 2010. 180 p.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [International]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biochemical journals. [2008 Out. 13]. Available from: http://www.icmje.org/recommendations/archives/2008_urm.pdf.

Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, Wilson ME. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. Mol Biochem Parasitol. 2001;15;112(1):51-9.

Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40(11):2592-7.

Chan MM, Bulinski JC, Chang KP, Fong D. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. Parasitol Res. 2003 Mar;89(4):266-71.

Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol. 2007;156(2):93-101.

Costa JM, Viana GM, Saldanha AC, Nascimento MD, Alvim AC, Burattini MN, et al. [Visceral leishmaniasis in the State of Maranhao, Brazil: evolution of an epidemic]. Cad Saude Publica. 1995;11(2):321-4.

Costa Sdos S, de Assis Golim M, Rossi-Bergmann B, Costa FT, Giorgio S. Use of in vivo and in vitro systems to select *Leishmania amazonensis* expressing green fluorescent protein. Korean J Parasitol. 2012;49(4):357-64.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):111-26.

DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. Parasitol Res. 2004;92(2):113-20.

Datasus. [internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2012 [citado 2014 jul. 29]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2011/d0204.def>.

Datasus. [internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2012 [citado 2014 jul. 29]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2010/d0205.def>

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):305-18.

Dube A, Gupta R, Singh N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. Trends Parasitol. 2009;25(9):432-9.

El Fadili A, Kundig C, Ouellette M. Characterization of the folylpolyglutamate synthetase gene and polyglutamylation of folates in the protozoan parasite *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 2002;124(1-2):63-71.

- Franke-Fayard B, Waters AP, Janse CJ. Real-time in vivo imaging of transgenic bioluminescent blood stages of rodent malaria parasites in mice. *Nat Protoc.* 2006;1(1):476-85.
- Frezard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules.* 2009;14(7):2317-36.
- Green AA, McElroy WD. Crystalline firefly luciferase. *Biochim Biophys Acta.* 1956;20(1):170-6.
- Grimaldi G, Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(6):687-725.
- Gubbels MJ, Li C, Striepen B. High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):309-16.
- Gupta S. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res.* 2011;133:27-39.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;2;354(9185):1191-9.
- Hoare CA. Early discoveries regarding the parasite of oriental sore. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1938;32(1):67 - 86.
- Jarvis JN, Lockwood DN. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;26(1):1-9.
- Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 1999; 9;341(24):1795-800.
- Kapler GM, Beverley SM. Transcriptional mapping of the amplified region encoding the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major* reveals a high density of transcripts, including overlapping and antisense RNAs. *Mol Cell Biol.* 1989;9(9):3959-72.
- Khandelwal K, Bumb RA, Mehta RD, Kaushal H, Lezama-Davila C, Salotra P, et al. A patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(1):64-5.
- Kolev NG, Tschudi C, Ullu E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryot Cell.* 2011;10(9):1156-63.
- Lafuse WP, Story R, Mahylis J, Gupta G, Varikuti S, Steinkamp H, et al. *Leishmania donovani* infection induces anemia in hamsters by differentially altering erythropoiesis in bone marrow and spleen. *PLoS One.* 2013;8(3):e59509.
- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 1993;7(6):996-1007.

- Leitao JM, Esteves da Silva JC. Firefly luciferase inhibition. *J Photochem Photobiol B*. 2010;5;101(1):1-8.
- Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today*. 1997;13(2):80-2.
- Loening AM, Dragulescu-Andrasi A, Gambhir SS. A red-shifted Renilla luciferase for transient reporter-gene expression. *Nat Methods*. 2009;7(1):5-6.
- Luque-Ortega JR, Rivero-Lezcano OM, Croft SL, Rivas L. In vivo monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1121-5.
- Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, et al. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001161.
- Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*. 2008;24(12):2941-7.
- Matsuki H, Suzuki A, Kamaya H, Ueda I. Specific and non-specific binding of long-chain fatty acids to firefly luciferase: cutoff at octanoate. *Biochim Biophys Acta*. 1999;4;1426(1):143-50.
- McFadden DC, Seeber F, Boothroyd JC. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(9):1849-53.
- Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;59(2):327-9.
- Mehta SR, Huang R, Yang M, Zhang XQ, Kolli B, Chang KP, et al. Real-time in vivo green fluorescent protein imaging of a murine leishmaniasis model as a new tool for *Leishmania* vaccine and drug discovery. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(12):1764-70.
- Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Andreoli WK, Mortara RA, Uliana SR. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(3):526-34.
- Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(6):e249.
- Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbieri CL, Uliana SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(2):365-8.
- Misslitz A, Mottram JC, Overath P, Aebischer T. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;15;107(2):251-61.

Morais-Teixeira E, Carvalho AS, Costa JC, Duarte SL, Mendonca JS, Boechat N, et al. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L (Infantum.) chagasi* and *L (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(4):358-62.

Okuno T, Goto Y, Matsumoto Y, Otsuka H. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. Exp Anim. 2003;52(2):109-18.

Plock A, Sokolowska-Kohler W, Presber W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania Spp*. Exp Parasitol. 2001;97(3):141-53.

Qureshi SA. Beta-lactamase: an ideal reporter system for monitoring gene expression in live eukaryotic cells. Biotechniques. 2007;42(1):91-6.

Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97 Suppl 1:17-28.

Rath S TL, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC, Andrade Júnior HF, Tempone AG. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química nova. 2003;26:550 - 3.

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014;6:147-54.

Reimao JQ, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Kalil SP, Uliana SR. Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. J Microbiol Methods. 2013;93(2):95-101.

Rey L. Bases de Parasitologia Médica. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 856 p.

Roberts SC, Kline C, Liu W, Ullman B. Generating knock-in parasites: integration of an ornithine decarboxylase transgene into its chromosomal locus in *Leishmania donovani*. Exp Parasitol. 2011;128(2):166-9.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature. 2004;22;430(6998):463-7.

Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania spp.* infections in macrophages and in animal models. Mol Biochem Parasitol. 2000;110(2):195-206.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001;55:453-83.

Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. Infect Immun. 2005;73(2):695-702.

- Sanchez BA, Varotti FP, Rodrigues FG, Carvalho LH. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. *J Microbiol Meth.* 2007;69(3):518-22.
- Sanchez BA, Mota MM, Sultan AA, Carvalho LH. *Plasmodium berghei* parasite transformed with green fluorescent protein for screening blood schizontocidal agents. *Int J Parasitol.* 2004;29;34(4):485-90.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
- Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(6):342-9.
- Sereno D, Roy G, Lemesre JL, Papadopoulou B, Ouellette M. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1168-73.
- Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouasssi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int.* 2007;56(1):3-50.
- Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci.* 2007;15;120(Pt 24):4247-60.
- Singh N, Dube A. Short report: fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(4):400-2.
- Singh N, Gupta R, Jaiswal AK, Sundar S, Dube A. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(2):370-4.
- Soltys DT, Rocha CR, Lerner LK, de Souza TA, Munford V, Cabral F, et al. Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. *Hum Mutat.* 2012;34(3):481-9.
- Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J, et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis.* 2001;1;33(7):E57-61.
- Sundar S, Makharia A, More DK, Agrawal G, Voss A, Fischer C, et al. Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2000;31(4):1110-3.
- Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2001;6(11):849-54.
- Tarun AS, Baer K, Dumpit RF, Gray S, Lejarcegui N, Frevert U, et al. Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. *Int J Parasitol.* 2006;36(12):1283-93.
- Trinconi CT, Reimao JQ, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Uliana SR. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2608-13.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. J Eukaryot Microbiol. 1994;41(4):324-30.

Uliana SR, Fischer W, Stempliuk VA, Floeter-Winter LM. Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. Mol Biochem Parasitol. 1996;76(1-2):245-55.

Uliana S.R.B. RJC, Cruz A. K. . Leishmania Genomics: Where Do We Stand? Bioinformatics in Tropical Disease Research: A Practical and Case-Study Approach. Bethesda; 2007.

Velez I, Lopez L, Sanchez X, Mestra L, Rojas C, Rodriguez E. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(2):351-6.

WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases; 2014 Contract No.: Document Number|.

Woodruff AW. Mechanisms involved in anaemia associated with infection and splenomegaly in the tropics. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1973;67(3):313-28.