

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Janaina Correia Oliveira

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO IMUNOESTIMULANTE *Parapoxvirus ovis*
(PPVOi) NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA E
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE *IN VIVO NEAR-INFRARED FLUORESCENCE*
IMAGING

RECIFE
2016

JANAINA CORREIA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO IMUNOESTIMULANTE *Parapoxvirus ovis*
(PPVOi) NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA E
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE *IN VIVO NEAR-INFRARED FLUORESCENCE*
*IMAGING***

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Biociências e
Biotecnologia em Saúde do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães da
Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção
do título de Doutora em Ciências.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Laura Helena Vega Gonzales Gil

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira Hernandes

RECIFE

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- O48a Oliveira, Janaina Correia.
Avaliação da eficácia do imunostimulante Parapoxvirus ovis inativado (PPVOi) no tratamento da leishmaniose cutânea murina e aplicação da técnica de in vivo near-infrared fluorescence imaging / Janaina Correia Oliveira. - Recife: [s.n.], 2016.
103 p. : ilus., graf., tab., mapas.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.
Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil; coorientadora: Valéria Pereira Hernandez.
1. Parapoxvirus. 2. Imunoterapia. 3. Leishmaniose. imunol. 4. Imagem molecular. I. Gil, Laura Helena Vega Gonzáles. II. Hernandez, Valéria Pereira. III. Título.

CDU 616.993.161

JANAINA CORREIA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO IMUNOESTIMULANTE *Parapoxvirus ovis*
(PPVOi) NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA E
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE *IN VIVO NEAR-INFRARED FLUORESCENCE*
*IMAGING***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

DATA DE APROVAÇÃO: 31/10/2016

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Departamento de Virologia/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dr^a. Danielle Maria Nascimento Moura
Departamento de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dr. Filipe Dantas-Torres
Departamento de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dr^a. Silvia Maria Lucena Montenegro
Departamento de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Dr^a. Joelma Rodrigues de Souza
Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB-PB

*Dedico este trabalho ao meu amado
esposo Renato, pelo seu amor, paciência
e constante presença durante a
elaboração deste trabalho;*

*À minha adorável filha Martina, pelo seu
amor e sua incansável capacidade de
trazer alegria para nossas vidas;*

*E à minha querida mãe Lourdes, pelo
incentivo e apoio na minha vida familiar.*

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) e aos meus mestres pela formação acadêmico-científica e estrutura oferecidas.

À Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde (BBS) pela oportunidade e pela contribuição em minha formação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida, que viabilizou a realização desse trabalho.

À equipe da coordenação da Pós-Graduação em BBS, pelas orientações, ajuda e profissionalismo.

À minha orientadora e amiga, Dr^a. Laura Helena Vega Gonzales Gil, pela confiança e atenção nos momentos necessários. Por ter acreditado e me apoiado no desenvolvimento da técnica de imagem e sua aplicação neste projeto. Sem seu apoio e incentivo jamais teria conseguido realizar este sonho. Muito obrigada.

À minha coorientadora e amiga, Dr^a. Valéria Pereira Hernandez, pelo suporte técnico-científico, pelo incentivo e tranquilidade passados durante todo o percurso do projeto. Muito obrigada.

Ao Professor Eduardo Flores da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS) e a Deniz Anziliero, pelo fornecimento da preparação viral inativada, que foi extensamente utilizada durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço especialmente a doutoranda e amiga Aline Caroline da Silva do Departamento de Imunologia do CPqAM, pelo apoio técnico fornecido, pelas conversas enriquecedoras e pela sua agradável companhia durante o período de elaboração deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos.

Gostaria de fazer um agradecimento às Prof. Joelma Rodrigues de Souza da Universidade Federal da Paraíba e à Prof. Caroline Simões da Universidade Federal de Pernambuco (*campus* Vitória), pelo apoio técnico/financeiro fornecidos que possibilitaram a realização dos ensaios de citometria de fluxo.

Gostaria de agradecer a equipe do Biotério Experimental que me forneceu o suporte necessário para realização dos experimentos *in vivo*, especialmente ao funcionário Eduardo, pela sua ajuda e disponibilidade. Não poderia deixar de agradecer a Aline, Eliana, Renato, Kenya e Déborah, por terem dedicado parte de seu tempo para estarem comigo no biotério. Sou muito grata.

Agradeço à equipe do Laboratório de Imunogenética e do Departamento de Imunologia pelo apoio técnico, pelos momentos de descontração e idéias trocadas durante a elaboração deste trabalho. Obrigada Aline, Lucas, Camila, Roni, Thiago, André, Renata e Rennan.

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu companheiro de vida e trabalho, Renato Oliveira, por todo incentivo e apoio na realização deste trabalho. A você o meu eterno amor, respeito e gratidão.

Não poderia deixar de agradecer às pessoas que foram minha família nesses quatro anos e meio no LaViTE: Eu me “acordei” e “dormi” com vocês na busca por um conhecimento que guiou minha vida e alimentou meus sonhos nesses últimos anos. Agradeço a todos os pesquisadores, pós-docs, técnicos, estudantes, secretária e terceirizados, pelo acolhimento, pelo bom ambiente de trabalho, por todos os momentos compartilhados e por cultivar em mim o espírito de coletividade. A toda equipe do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, o meu muito obrigada.

Por fim, aos meus queridos amigos da primeira turma de doutorado em “BBS”. Foi uma honra fazer parte desse time. Finalmente nos aproximamos da linha de chegada. Obrigada por todos os momentos de alegrias, superação e incertezas compartilhados. À Camila, Leandro, André, Pietra, Eloína, Viviane e Vanessa, o meu muito obrigada!

“O pessimista se queixa do vento, o otimista espera
que ele mude e o realista ajusta as velas”.

William George Ward

OLIVEIRA, Janaina Correia. **Avaliação da eficácia do imunestimulante *Parapoxvirus ovis* inativado (PPVOi) no tratamento da leishmaniose cutânea murina e aplicação da técnica de *in vivo near-infrared fluorescence imaging*.** 2016. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

Na leishmaniose o estudo da relação entre a resposta imunológica e o curso da doença levou ao conceito de que o balanço da resposta celular Th1/Th2 determina a susceptibilidade ou resistência à doença. Sabe-se que nas formas cutâneas existe uma forte associação entre uma eficiente resposta imune celular do tipo Th1 e a cicatrização das lesões. Nos últimos anos, a imunoterapia da leishmaniose vem sendo utilizada como alternativa de tratamento para potencializar a resposta imune específica, considerada essencial na eliminação das leishmânias. É atualmente uma estratégia promissora no tratamento e controle das formas cutâneas da doença, possibilitando a diminuição do tempo de cicatrização das lesões e favorecendo o tratamento de formas resistentes. A partir da reflexão deste fato, este projeto foi idealizado e teve como principal objetivo fazer um estudo da eficácia do imunestimulante ***Parapoxvirus ovis* inativado (PPVOi)** no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo murino. O PPVOi já vem sendo comercializado e utilizado com sucesso como imunomodulador terapêutico na clínica veterinária e amplamente explorado no tratamento de diversas doenças de origem humana e animal, infecciosas e não infecciosas. A principal característica do PPVOi é a forte estimulação da resposta imune celular do tipo Th1, que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o IFN- γ , e citocinas anti-inflamatórias. Para avaliação da eficácia de PPVOi em modelo murino desenvolvemos um método de imagem molecular *in vivo* não invasivo baseado na tecnologia de *in vivo near-Infrared fluorescence imaging*. O efeito imunestimulatório do PPVOi foi determinado por análise de citometria de fluxo, através do estudo dos perfis de citocinas Th1, Th2 e Th17 de esplenócitos estimulados *ex vivo* com o PPVOi. A utilização do PPVOi no tratamento coadjuvante da leishmaniose cutânea no modelo estudado não apresentou eficácia. O estudo dos perfis imunológicos dos grupos de animais tratados e não-tratados, por diferentes vias de inoculação, mostrou que, apesar de haver estimulação da produção de IFN- γ , este não foi suficiente para controlar a infecção.

Palavras-chave: 1. *Parapoxvirus*. 2. Imunoterapia. 3. Leishmaniose cutânea. 4. Imagem molecular.

OLIVEIRA, Janaina Correia. **Evaluation of the efficacy of immunostimulatory *Parapoxvirus ovis* inactivated (PPVOi) in the treatment of murine cutaneous leishmaniasis and application of near-infrared fluorescence *in vivo* imaging technique.** 2016. Thesis (Doctorate in Biosciences and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

In the study of Leishmaniasis, the relationship between immune response and the course of disease has led to the concept that the balance of Th1/Th2 cellular immune responses determines the resistance or susceptibility to disease. It is known that in the cutaneous forms of the disease, there is an association between an effective Th1 type cellular immune response and the clearance of *Leishmania* in the lesions. Recently, immunotherapy has been employed as an alternative treatment to potentiate the specific immune response, being regarded as essential to eliminate *Leishmania*. Currently immune therapy is a promising strategy in the treatment and control of the cutaneous forms of the disease, making possible shortening the healing time and favouring the treatment of resistant forms. From the reflection of this fact, this project was conceived and it aims to make a study of the effectiveness of inactivated ***Parapoxvirus ovis* (PPVOi)** as an immunostimulant for cutaneous leishmania treatment. PPVOi has been used successfully as a therapeutic immunomodulator in veterinary medicine and broadly exploited in the treatment of many of human or animal diseases, infectious and noninfectious. The main feature of PPVOi is the strong stimulation of the Th1 type cellular immune response, which leads to production of proinflammatory cytokines, among them IFN- γ , and anti-inflammatory cytokines. To evaluate the PPVOi efficacy in a murine model we developed a non-invasive *in vivo* molecular imaging method based on the technology *in vivo near-infrared fluorescence imaging*. The immunostimulatory effect of PPVOi was determined *in vitro* by flow cytometry analysis through the study of Th1, Th2, and Th17 cytokines profiles produced by cultured splenocytes stimulated *ex vivo* with PPVOi. The use of PPVOi as adjuvant in the treatment of cutaneous leishmaniasis, used in this model, did not show efficacy. The study of the immunological profiles of treated and untreated animal groups, inoculated by different routes, showed that, although IFN- γ production has been stimulated, it was not enough to control infection.

Key words: 1. *Parapoxvirus*. 2. Immunotherapy. 3. Cutaneous leishmaniasis. 4. Molecular imaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Mapa de distribuição da leishmaniose cutânea no mundo.....	19
Figura 2-	Resposta imune de camundongos C57BL/6 e BALB/c na infecção por <i>L. major</i>	27
Figura 3-	Mecanismo de ação do PPVOi.....	31
Figura 4-	Indução e autorregulação da resposta imune Th1 com PPVOi.....	32
Figura 5-	Características do espectro na “janela” NIR.....	34
Figura 6-	Vantagens do uso de proteínas NIR sobre proteínas derivadas de GFP.....	35
Figura 7-	Estratégia de clonagem, etapas da construção de <i>L. amazonensis</i> -iRFP e <i>screening</i> fenotípico.....	56
Figura 8-	Quantificação da fluorescência de <i>L. amazonensis</i> -iRFP <i>in vitro</i>	57
Figura 9-	Detecção de fluorescência <i>in vivo</i> e comparação das características de <i>L. amazonensis</i> -iRFP <i>versus</i> WT, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	58
Figura 10-	Progressão da infecção experimental com três diferentes inóculos de <i>L. amazonensis</i> -iRFP em BALB/c ao longo de 2 meses.....	60
Figura 11-	Quantificação da intensidade de fluorescência <i>in vivo</i> de <i>L. amazonensis</i> -iRFP ao longo do tempo.....	61
Figura 12-	Correspondência dos resultados de fluorescência e microscopia no ensaio de diluição limitante (<i>ex vivo</i>).....	62
Figura 13-	Avaliação da eficácia do PPVOi utilizando a técnica de <i>in vivo near-infrared fluorescence imaging</i>	64
Figura 14-	Gráficos da avaliação da eficácia do PPVOi, associado ou não ao Glucantime® no tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> -iRFP.....	65
Figura 15-	Gráficos da avaliação da eficácia de PPVOi pelo método de diluição limitante (método padrão) e pela detecção de fluorescência <i>in vivo</i> no dia 32.....	66
Figura 16-	Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com PPVOi: “Animais <u>não-infectados e não tratados (grupo controle)</u> ”.....	69

Figura 17-	Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com PPVOi: “Animais <u>infectados e não tratados</u> ”	70
Figura 18-	Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com PPVOi: “Animais infectados e <u>tratados com Glucantime®</u> ”	71
Figura 19-	Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos re-estimulados com PPVOi: “Animais infectados e <u>tratados com PPVOi via i.m.</u> ”	72
Figura 20-	Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos re-estimulados com PPVOi: “Animais infectados e <u>tratados com PPVOi via i.p.</u> ”	73
Figura 21-	Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos re-estimulados com PPVOi: “Animais infectados e <u>tratados com PPVOi i.p. e Glucantime®</u> ”	74
Figura 22-	Dosagem de IFN-γ após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.	75
Figura 23-	Dosagem de IL-2 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.....	76
Figura 24-	Dosagem de TNF-α após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.....	77
Figura 25-	Dosagem de IL-4 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.....	78
Figura 26-	Dosagem de IL-6 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.....	79
Figura 27.	Dosagem de IL-10 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.....	80
Figura 28.	Dosagem de IL-17A após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Imunoterapia da leishmaniose humana.....	25
Quadro 2-	Leishmaniose cutânea humana causada por diferentes espécies de <i>Leishmania</i> spp. que são frequentemente usadas em estudos experimentais.....	29
Quadro 3-	Descrição dos grupos de tratamento do estudo de eficácia.....	49
Quadro 4-	Descrição dos grupos de tratamento do estudo imunológico.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
B.O.D.	<i>Biochemical oxygen demand</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CD	<i>Cluster differentiation</i>
C3	Proteína do complemento 3
C3b	Proteína do complemento 3, fração b
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
Hb	Hemoglobina
HbO ₂	Oxiemoglobina
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
IFF- α/β	Interferon alfa e beta
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
iRFP	<i>infrared fluorescence protein</i>
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
LC	Leishmaniose cutânea
LCA	Leishmaniose cutânea americana
LB	Meio Luria-Bertani
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NIR	<i>Near-infrared</i>
NK	<i>Natural killer</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET	<i>Positron emission tomography</i>

PPVO	<i>Parapoxvirus ovis</i>
PPVOi	<i>Parapoxvirus ovis</i> inativado
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i>
Sb5+	Antimonial pentavalente
ssu	Subunidade ribossomal menor
TGF- β	Fator de crescimento e transformação- β
Th1	Célula T auxiliar tipo 1
Th2	Célula T auxiliar tipo 2
Th17	Célula T auxiliar tipo 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
T _{reg}	Célula T regulatória
WT	<i>Wild type</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	LEISHMANIOSE CUTÂNEA (LC).....	18
2.2	TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	21
2.3	A RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	25
2.4	O <i>PARAPOXVIRUS OVIS</i> INATIVADO (PPVOi).....	29
2.5	<i>IN VIVO NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IMAGING</i>	33
3	JUSTIFICATIVA	37
4	HIPÓTESE	39
5	OBJETIVOS	39
5.1	OBJETIVO GERAL.....	39
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
6	MATERIAIS E MÉTODOS	40
6.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
6.2	ANIMAIS.....	40
6.3	<i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	40
6.4	<i>PARAPOXVIRUS OVIS</i> INATIVADO (PPVOi).....	41
6.5	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IMAGEM <i>IN VIVO</i> NÃO- INVASIVO PARA A DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>L. AMAZONENSIS</i> - <i>iRFP</i> EM BALB/c.....	41
6.5.1	<i>Estratégia de clonagem e desenho dos oligonucleotídeos</i>	41
6.5.2	<i>Construção e obtenção do cassete pLEXSY-Hyg2-iRFP</i>	42
6.5.3	<i>Transfecção e recombinação homóloga</i>	43
6.5.4	<i>Seleção clonal de L. amazonensis-iRFP</i>	44
6.5.5	<i>Detecção da fluorescência de L. amazonensis-iRFP</i>	45
6.5.6	<i>Confirmação da integração do cassete de iRFP no genoma de L.</i> <i>amazonensis</i>	45
6.5.7	<i>Avaliação das características de patogenicidade e virulência de L.</i> <i>amazonensis-iRFP in vivo e obtenção de cepas infectivas</i>	46

6.6	ACOMPANHAMENTO DA LC EM BALB/c UTILIZANDO TRÊS DIFERENTES INÓCULOS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> -iRFP.....	47
6.7	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA IMUNOTERAPIA COM O PPVOi EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM <i>L. AMAZONENSIS</i> -IRFP...	48
6.7.1	<i>Aquisição das imagens</i>	50
6.8	ESTUDO PRELIMINAR DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM <i>L. AMAZONENSIS</i> -WT E TRATADOS COM PPVOi.....	51
7	RESULTADOS	54
7.1	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IMAGEM <i>IN VIVO</i> NÃO-INVASIVO PARA A DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>L. AMAZONENSIS</i> -iRFP EM CAMUNDONGOS BALB/c.....	54
7.2	ACOMPANHAMENTO DA LC EM BALB/c UTILIZANDO TRÊS DIFERENTES INÓCULOS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> -IRFP.....	59
7.3	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA IMUNOTERAPIA COM O PPVOi EM BALB/c INFECTADOS COM <i>L. AMAZONENSIS</i> -IRFP.....	63
7.4	ESTUDO PRELIMINAR DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM <i>L. AMAZONENSIS</i> -WT E TRATADOS COM PPVOi.....	67
8	DISCUSSÃO	82
9	CONCLUSÃO	89
10	PERSPECTIVAS FUTURAS	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	APÊNDICE A - ARTIGO	98

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) é um grupo de doenças relativamente benignas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De ampla distribuição no Brasil e no mundo, a LC é incluída pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na lista de Doenças Negligenciadas que afetam seres humanos. Clinicamente, a doença é caracterizada pelo aparecimento de úlceras cutâneas, única ou múltiplas, cuja principal complicação é a metástase para a mucosa da naso-faringe, levando ao desenvolvimento da forma mais grave da doença: a forma mucocutânea (DAVID; CRAFT, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A principal forma de tratamento utilizada no combate à doença no Brasil e no mundo é a administração parenteral de drogas quimioterápicas, tais como os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), anfotericina B e pentamidas, por um longo período de tempo. O tratamento da LC é considerado doloroso, caro e laborioso. Além disso, a quimioterapia apresenta várias restrições e graves efeitos colaterais. As recidivas são frequentes e a resistência das leishmânias já foi demonstrada com quase todas as drogas disponíveis no mercado (REY, 2008; ROBERTS, 2006).

Nas últimas décadas, os estudos sobre a resposta imunológica na LC levaram à determinação e à caracterização de perfis imunológicos distintos, frequentemente associados à cura ou evolução da doença em humanos e em modelos experimentais (ALEXANDER; BRYSON, 2005; ANDERSON et al., 2005). Com isso, a relação entre a resposta imune polarizada e o curso da infecção na leishmaniose levou ao conceito de que o balanço da resposta imune celular Th1/Th2 determina a susceptibilidade ou a resistência à doença. Esta descoberta, veio apontar novos horizontes para o tratamento da LC, como a possibilidade de modulação da resposta imune do próprio hospedeiro no combate à doença. Embora, atualmente, diferentes perfis da resposta imunológica venham sendo estudados na LC, como as respostas de linfócitos T_{reg} e Th17, o evento crucial para a indução da resposta imune curativa contra esse parasita intracelular é a eficiente ativação da resposta imune celular mediada por linfócitos Th1 (*T helper 1*), capazes de produzir citocinas que levam à produção de IFN- γ , a ativação de macrófagos e, conseqüentemente, à morte dos parasitas intracelulares (CASTELLANO et al., 2009; MOUGNEAU et al., 2011; KATARA et al., 2013).

As observações de que a imunoterapia adjuvante, além de diminuir o tempo de cicatrização das lesões, é efetiva para o tratamento de formas resistentes da doença tornam essa perspectiva terapêutica bastante promissora atualmente (EL-ON, 2009).

Nos últimos anos, o *Parapoxvirus ovis* inativado (PPVOi) vem sendo utilizado como imunomodulador terapêutico na clínica veterinária e vem tendo seu potencial imunoestimulante amplamente explorado no tratamento de doenças de origem humana e animal. A principal característica do PPVOi é a potencialização da resposta imune Th1, com produção de citocinas pro-inflamatórias, principalmente de IFN- γ . Sabe-se que o PPVOi exerce um forte efeito na secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8 e TNF- α por monócitos e células apresentadoras de antígenos (APCs), bem como na secreção de IL-2, interferon tipo I (IFN- α/β) e citocinas Th1 (IL-12, IL-16 e IFN- γ) por linfócitos T CD4⁺ (ANZILIERO et al., 2014; NOWATZKY et al., 2013; PAILLOT, 2013; SCHÜTZE et al., 2009). Considerando que o PPVOi tem se mostrado eficaz na estimulação e potencialização da resposta de linfócitos Th1 *in vitro* e *in vivo*, e sabendo-se que existe uma clara associação entre o controle da leishmaniose e este tipo de resposta, este projeto teve como objetivo avaliar a eficácia do PPVOi no combate à leishmaniose cutânea murina, utilizando como modelo o camundongo isogênico BALB/c.

O BALB/c é reconhecidamente um importante modelo experimental de leishmaniose cutânea e vem sendo amplamente utilizado em estudos de avaliação da resposta imune (SOUSA et al., 2014), busca de novas estratégias vacinais (MATO-GUEDES et al., 2014) e novas terapias (TRINCONI et al., 2016). A urgência na busca por novas estratégias terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, combinada com o progresso alcançado nas últimas décadas no campo de imagem *in vivo* de pequenos animais, impulsionaram a geração de várias espécies de leishmania fluorescentes e bioluminescentes de interesse médico, com a finalidade de desenvolver novos métodos de avaliação de eficácia de compostos anti-leishmania, mais eficazes e confiáveis (BOLHASSANI et al., 2011; ROCHA et al., 2013).

Nesse contexto, foi inserido nesta tese o desenvolvimento de um método de imagem *in vivo* baseado na técnica de *near-infrared fluorescence imaging*, que permitisse o acompanhamento da evolução da leishmaniose cutânea e do seu tratamento, de forma não invasiva e em tempo real, em modelo murino.

2 REVISÃO DA LITERATURA

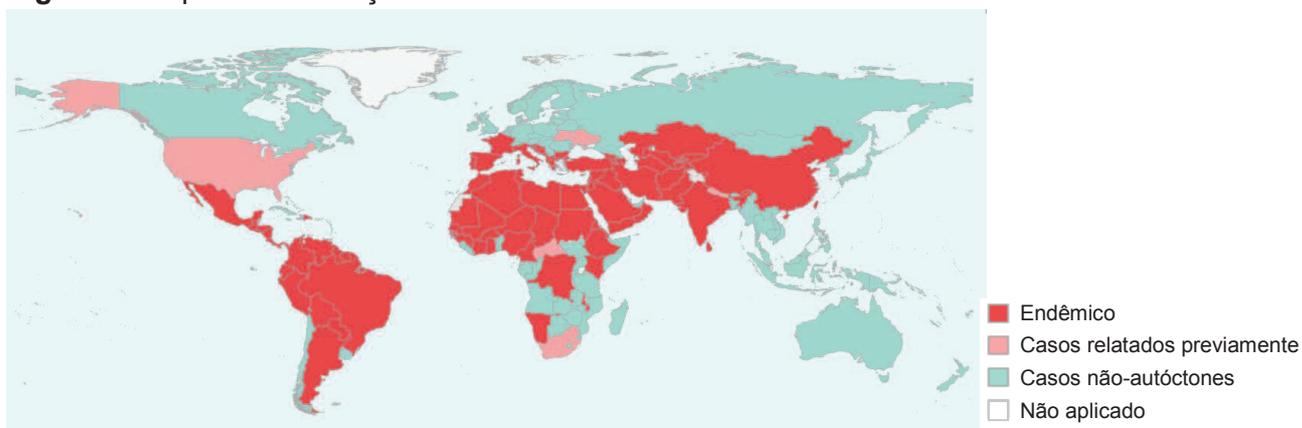
2.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA (LC)

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes à família Trypanosomatidae. De ampla distribuição no Brasil e no mundo, as leishmanioses estão incluídas pela OMS na lista de doenças negligenciadas que afetam seres humanos de todas as idades, onde a infecção e o desenvolvimento da doença estão muito associados a populações com baixos recursos, precárias condições de vida e áreas rurais pobres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). A doença é uma zoonose com caráter endêmico (**figura 1**), transmitida ao homem e a outros hospedeiros vertebrados através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Clinicamente é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas, que caracterizam duas grandes formas da doença: a leishmaniose cutânea e a leishmaniose visceral (DAWIT; GIRMAN; SIMENEW, 2013)

A LC é tipicamente caracterizada pelo aparecimento de úlceras cutâneas, única ou múltiplas, cuja principal complicação é a metástase do parasita para a mucosa da nasofaringe, levando a destruição e mutilação desse tecido, que caracteriza a forma mais grave da doença: a forma mucocutânea (DAVID; CRAFT, 2009). A LC ocorre tanto em países do Oriente (Velho Mundo), como em países do Ocidente (Novo Mundo), porém apresenta perfis clínico-epidemiológicos diferentes nestas duas grandes áreas geográficas. As espécies responsáveis pela LC no Velho Mundo são: *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica* (MASMOUDI et al., 2013). Diferentemente da leishmaniose cutânea do Velho Mundo, a leishmaniose cutânea do Novo Mundo, também denominada de leishmaniose cutânea americana (LCA), é uma doença bem mais complexa do ponto de vista eco-epidemiológico, onde diferentes animais reservatórios, diferentes espécies de vetores e múltiplas espécies de *Leishmania* podem circular numa mesma área geográfica (BRITO et al., 2012). Essa heterogeneidade de elementos se reflete diretamente nos ciclos de transmissão da LCA e, conseqüentemente, nas diferentes formas clínicas da doença cutânea e também na resposta à terapia (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). As espécies de *Leishmania* responsáveis pela LC são classificadas em dois

subgêneros distintos: *Viannia* e *Leishmania*. Até o presente, sete espécies de *Leishmania* estão implicadas na determinação da LCA no Brasil. São elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg*, and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Contudo, a principal espécie envolvida no desenvolvimento da LCA no Brasil é a *L. (Viannia) braziliensis* (BRITO et al., 2012).

Figura 1- Mapa de distribuição da leishmaniose cutânea no mundo.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2013)

As manifestações clínicas e a evolução das lesões na LCA são variadas e caracterizam três diferentes formas clínicas da doença: a forma cutânea localizada, forma mucocutânea e a forma cutâneo difusa. Na leishmaniose cutânea localizada, após a picada do inseto, ocorre a multiplicação dos parasitas no local da picada, dando origem a um nódulo avermelhado com endurecimento local que, posteriormente evolui para uma ferida (úlceras) típica de bordos elevados. Essas lesões são comumente localizadas em áreas da face e extremidades e frequentemente são acompanhadas de lesões satélites e linfadenopatia. As lesões podem permanecer por semanas ou até mesmo anos e geralmente deixam uma cicatriz permanente (BRASIL, 2010; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010).

Na leishmaniose mucocutânea, que geralmente começa a partir de uma lesão cutânea inicial, as leishmânias se disseminam para a mucosa da naso orofaringe levando à desfiguração facial com comprometimento de tecidos e cartilagem, podendo levar ao aparecimento de infecções secundárias por bactérias e

complicações mais graves. A leishmaniose mucocutânea é mais frequente em países da América Latina, onde cerca de 90% dos casos ocorrem no Brasil, na Bolívia e no Peru. Essa condição, em muitos casos, é de difícil tratamento e pode levar o paciente à morte (AMATO et al., 2008; GOTO; LINDOSO, 2010).

Além da forma cutânea localizada e mucocutânea, existe também uma forma disseminada da doença, conhecida como leishmaniose cutânea difusa (LCD), típica de pessoas imunossuprimidas, onde pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) são particularmente susceptíveis. A LCD é uma condição rara, porém séria, de evolução crônica e de difícil tratamento. Caracterizada pela presença de lesões de pele nodulares não-ulceradas e disseminadas, a LCD é resistente à maioria das estratégias terapêuticas existentes e não evolui ao longo do tempo para a cura. A principal espécie responsável pelos casos de LCD no Brasil é a *L. amazonensis*, uma das espécies responsáveis pela LCA na América do Sul (BRASIL, 2010; FRANÇA-COSTA et al., 2012).

Outro tipo menos comum de leishmaniose cutânea é a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), caracterizada pelo aparecimento de várias lesões cutâneas espalhadas pelo corpo, associadas ao tratamento de casos de leishmaniose visceral causada por *L. donovani* no Velho Mundo (ZIJLSTRA et al., 2003).

A heterogeneidade da LC é um reflexo da complexidade das interações parasita-hospedeiro, em que dois fatores são de suma importância para a determinação do curso clínico da infecção: a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imune do hospedeiro (SOONG, 2012).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas de desenvolvimento distintos: a **forma promastigota** ou flagelada (extracelular), que coloniza o trato digestivo do inseto vetor e a forma **amastigota** (intracelular), que é encontrada como parasita intracelular obrigatório das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SMF), principalmente macrófagos dos hospedeiros vertebrados. No intestino do inseto, as leishmânias passam por um processo denominado de metaciclogênese, importantíssimo para a manutenção das características de virulência e da capacidade infectiva do parasita. A transmissão para o homem ocorre pela picada e inoculação das formas promastigotas metacíclicas (infectantes) na pele durante o repasto sanguíneo do flebotômíneo, juntamente com fatores imunomodulatórios e componentes da saliva do inseto. Uma vez na pele, as promastigotas são fagocitadas por um ou vários tipos celulares possíveis, próximo

ao local da picada e sofrem um processo de transformação morfológica e bioquímica, adquirindo a forma de amastigota. Após estabelecer residência intracelular no interior de macrófagos, as amastigotas passam por vários ciclos de replicação no interior da célula, levando à ruptura desta e a infecção de outras células. Foi demonstrado que as formas amastigotas de *Leishmania* podem viver como parasitas intracelulares em vários tipos celulares de mamíferos, porém, sua célula de destino é o macrófago. O ciclo se completa quando um novo inseto se alimenta de sangue contendo amastigotas ou células infectadas com amastigotas (KAYE; SCOTT, 2011; DAWIT; GIRMAN; SIMENEW, 2013).

2.2 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

O tratamento da LC pode seguir diferentes protocolos nos diferentes países atingidos pela doença. Porém, de uma maneira geral, a escolha do tratamento deve ser guiada pela análise da espécie ou subespécie de *Leishmania* envolvida na lesão, a forma clínica da doença, o número de lesões presentes e pela avaliação do sistema imunológico do paciente. As opções terapêuticas existentes, tanto em países em desenvolvimento, como em países desenvolvidos, são limitadas e, em ambos, requer um monitoramento a longo prazo do paciente, mesmo após o desaparecimento dos sintomas. Tanto nas Américas, quanto no Velho Mundo, as drogas utilizadas no tratamento padrão das leishmanioses são as drogas antiparasitárias, tais como: preparações de antimoniato de meglumina (Glucantime®) ou estibogluconato de sódio (Pentostam®), anfotericina B, anfotericina B lipossomal e pentamidas. Todas essas drogas citadas são administradas via endovenosa por longo período de tempo e podem apresentar sérios efeitos colaterais (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; RODRIGUES et al., 2006).

No Brasil, a LCA é causada por diferentes espécies de *Leishmania*. A escolha do tratamento da LCA deve ser individualizada e depende de fatores do parasita e do hospedeiro. A história natural da úlcera, o curso clínico da infecção e a resposta à quimioterapia, devem ser cuidadosamente investigadas (SOTO et al., 2014).

A terapia da LCA é indicada para diminuir o risco de disseminação para a mucosa, acelerar a cura das lesões, diminuir o risco de reativação das lesões de pele, diminuir a morbidade das lesões, principalmente das lesões de face e também diminuir o reservatório da infecção em áreas geográficas onde pessoas infectadas

servem como hospedeiros reservatórios (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

As infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* geralmente evoluem para cura dentro de 12 meses. Porém, cerca de 1-3% dos pacientes fazem metástase para a mucosa da orofaringe. Esses pacientes devem ser tratados para acelerar a cura da lesão cutânea e para prevenir a metástase para a mucosa. As infecções causadas por *L. mexicana* evoluem para a cura mais rapidamente, dentro de 3-4 meses, e não leva à metástase para as mucosas. Essas infecções podem ou não ser tratadas. Porém, isso não acontece nos lugares em que *L. mexicana* co-existe com *L. braziliensis*. Nesse caso, todos os casos de *L. mexicana* devem ser tratados. Estimase que cerca de 30% dos casos de LCA não tratados causados por *L. braziliensis* evoluem para a forma mucocutânea (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; SOTO et al., 2014).

No Brasil, o tratamento de primeira escolha das lesões cutâneas vem sendo realizado com a administração de Glucantime[®], diariamente, por via endovenosa, e é distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde. Inicialmente, todos os casos de LCA no Brasil são tratados com a terapia padrão por no mínimo 20 dias. De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, todos os pacientes com LC tratados devem ser monitorados por no mínimo 6 meses após o término do tratamento (BRASIL, 2010). Espera-se que ocorra a melhora da lesão cutânea nas duas primeiras semanas após início do tratamento. Se não houver cicatrização completa da lesão em até 3 meses após o término do tratamento, o paciente deve ser reavaliado. O tratamento das lesões de mucosas deve ser realizado preferencialmente em ambiente hospitalar. Se não houver cicatrização completa, o tratamento deve ser repetido com a mesma droga ou com uma droga de segunda escolha. Na LCA difusa, inicialmente pode haver uma resposta ao antimonial, porém são frequentes as recidivas (BRASIL, 2010; RODRIGUES et al., 2006).

A anfotericina B e as pentamidas, indicadas no Brasil apenas nos casos de resistência ao tratamento ou impossibilidade de uso do antimonial de meglumina, são drogas de segunda escolha e também apresentam uma série de efeitos colaterais, tão ou mais graves do que o antimonial, tais como: efeitos cardíacos, hepáticos, pancreáticos, renais e ocasionalmente podendo levar ao óbito. Além das drogas disponíveis para o tratamento da leishmaniose apresentarem várias restrições e graves efeitos colaterais, as recidivas são frequentes e a resistência das

leishmânias às drogas já foi demonstrada com quase todas as drogas disponíveis no mercado (ROBERTS, 2006; RODRIGUES et al., 2006; SILVA et al., 2013).

A terapia oral da leishmaniose pela administração de comprimidos de miltefosine foi aprovado há poucos anos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e vem sendo utilizada com sucesso em alguns países no tratamento da leishmaniose visceral e de formas cutâneas. Porém, um fator que preocupa, é que miltefosine induz facilmente resistência *in vitro* por um mecanismo de efluxo celular aumentado (DORLO et al., 2012). Cojean et al. (2012), estudando vários isolados clínicos de *L. donovani* obtidos de um paciente infectado com HIV e submetido a tratamento oral com miltefosine, sem sucesso, verificaram uma diminuição gradual na susceptibilidade desses isolados *in vitro* ao miltefosine e identificaram um polimorfismo no gene *Ldmt* da leishmania em questão, que codifica uma proteína transportadora da droga miltefosine, como um possível marcador genético de resistência ao miltefosine.

Além disso, existe um grupo de procedimentos terapêuticos alternativos de efeito local, tais como: crioterapia, termoterapia, fototerapia, aplicação de imiquimode de uso tópico, infiltração de pentostam diretamente na lesão, uso tópico de paramomicina (antibiótico), que vem sendo utilizados como tratamento adjuvante da leishmaniose cutânea (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; REVEIZ et al., 2013; SOTO et al., 2014).

Algumas populações de pacientes apresentam desafios no tratamento da LCA, são elas: mulheres grávidas e em período de amamentação, crianças, idosos, indivíduos com doenças crônicas e indivíduos com o sistema imune suprimido. Esses grupos são excluídos dos ensaios clínicos, devido a necessidade de homogeneizar a população de estudo. O tratamento da LCA nessas populações é limitado devido principalmente às inúmeras restrições na utilização das drogas disponíveis. Além disso, devido a sua alta toxicidade, os antimoniais pentavalentes são naturalmente contra-indicados em crianças, mulheres grávidas e em período de amamentação (FONTENELE-SILVA et al., 2013).

Com relação ao controle e tratamento de animais domésticos acometidos com a doença no Brasil, atualmente, não são recomendadas ações objetivando o controle de animais domésticos com LTA. Diferentemente dos animais que apresentam diagnóstico clínico-laboratorial de leishmaniose visceral, a eutanásia dos animais que apresentam LCA deve ser indicada somente quando os animais

doentes evoluírem para o agravamento das lesões cutâneas, após surgimento de lesões mucosas e sinais de infecções secundárias, que poderão conduzir o animal ao sofrimento. O tratamento dos animais doentes com LCA no Brasil não é uma medida aceita para o controle da doença, pois o mesmo pode conduzir ao risco de selecionar parasitos resistentes às poucas drogas disponibilizadas para o tratamento de casos humanos (BRASIL, 2010).

Nos últimos anos, a eficácia de imunoquimioterapias combinadas vem sendo exploradas no tratamento das leishmanioses. A imunoterapia vem sendo utilizada como alternativa de tratamento para potencializar a resposta imune específica, considerada essencial na eliminação das leishmânias, tanto nas formas cutâneas, quanto na forma visceral. A forte associação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenia da infecção por leishmania faz com que a modulação da resposta imune seja uma das estratégias mais estudadas para o controle e a prevenção da leishmaniose (EL-ON, 2005).

Uma série de formulações de origens diversas, tais como: parasitas atenuados e mortos, antígenos específicos purificados e antígenos recombinantes, bem como vacinas de DNA e células dendríticas, IFN- γ e, mais recentemente, o imunomodulador de uso tópico (imiquimode), vem sendo utilizado no tratamento coadjuvante da leishmaniose, em sua maioria em protocolos experimentais (**quadro 1**) (EL-ON, 2009; MAYRINK et al., 2006; MINODIER & PAROLA, 2007; RAMAN et al., 2014). As observações de que a imunoterapia adjuvante, além de diminuir o tempo de cicatrização das lesões, é efetiva para o tratamento de formas resistentes tornam essa perspectiva terapêutica a mais promissora atualmente (EL-ON, 2009).

Quadro 1- Imunoterapia da leishmaniose humana.

Imunoterapia	Quimioterapia	País (nº de pacientes estudados)	Doença	Eficácia do tratamento	Sintomas após tratamento	Respost a celular
Mistura de antígenos de <i>L. major</i>	-	Brasil (6)	Leishmaniose Mucocutânea	Alta	Melhora considerável	-
<i>L. braziliensis</i> pasteurizada + BCG	-	Venezuela (5341)	LC	Alta	95.7% de cicatrização	-
<i>L. braziliensis</i> pasteurizada + BCG	-	Venezuela (7)	Leishmaniose mucocutânea e LCD	Alta	~100% de cicatrização	Alta
<i>L. amazonensis</i> morta + BCG	Glucantime®	Brasil (47 + 405 controles)	LCA	87% vs. 88%	Efeito marginal	Efeito marginal
<i>L. amazonensis</i> morta	Glucantime®	Brasil (47 + 49 controles)	LCA	100% vs. 8.2% Glucantime®	Melhora considerável	Moderada, IFN-γ baixo
IFN-γ	Glucantime®	Brasil (17)	LV	83% cura	Melhora considerável	-
IFN-γ	Pentostan®	Índia (16 + 15 controles)	LV	Moderada 87% vs. 60%	Considerável em ambos grupos	-
IFN-γ	Pentostan®	Kenya (10 + 14 controles)	LV	Moderada	Melhora moderada	-
<i>L. major</i> morta + BCG	Pentostan®	Sudão (15 + 15 controles)	PKDL causada por <i>L. donovani</i>	87% vs 40% Pentostan®	Melhora considerável	Alta
Leukinferon (i.m.)	Antibiótico monomicina (tópico)	Uzbequistão (50 + 65 controles)	LC	Alta	Melhora considerável	-
GM-CSF	Glucantime®	Brasil (5)	LC causada por <i>L. braziliensis</i>	100% cura	Melhora considerável	Alta 83%
Imiquimod (tópico)	Glucantime®	Peru (7)	LC	100% vs 57% Glucantime®	Melhora considerável	-
Imiquimod (tópico)	Glucantime®	Irã (59 + 60 controles)	LC causada por <i>L. tropica</i>	40.1% vs. 48.3% Pentostan®	Considerável em ambos os grupos	-

(-) = Não aplicado ou não avaliado, BCG = *Bacillus Calmetti-Guerin*, GM-CSF = Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, LC = leishmaniose cutânea, LCD = leishmaniose cutâneo difusa, LV = leishmaniose visceral, PKDL = leishmaniose cutânea pós calazar.

Fonte: El-On (2009, tradução nossa).

2.3 A RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

As promastigotas, introduzidas na pele após a picada do flebotomíneo são fagocitadas por um ou vários tipos celulares possíveis, próximo ao local da picada, tais como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, onde sobrevivem neste último dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma). Um dos maiores desafios que uma promastigota se depara após entrar no hospedeiro vertebrado é estabelecer residência intracelular de longa duração em macrófagos sem deflagrar

os mecanismos antimicrobianos da imunidade inata. Dentre vários mecanismos, a literatura aponta para o papel dos neutrófilos no curso da infecção e nos mostra que a sobrevivência inicial das leishmânias no interior dos neutrófilos é importante para o estabelecimento de uma infecção produtiva no interior dos macrófagos, uma vez que os neutrófilos infectados com leishmânias, quando entram em apoptose, dão origem a corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos via receptores, não ativando com isso os mecanismos de defesa antimicrobiano (KAYE; SCOTT, 2011; MOUGNEAU et al., 2011; SIBLEY, 2011).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio de infecção logo após a picada do inseto. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos evita a ativação do macrófago permitindo uma entrada silenciosa do parasita nos macrófagos. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* de depleção de neutrófilos realizados com *L. major* comprovaram a hipótese de que os neutrófilos servem como “cavalos de Tróia” durante a infecção (CONCEIÇÃO et al., 2016; SOUSA et al., 2014).

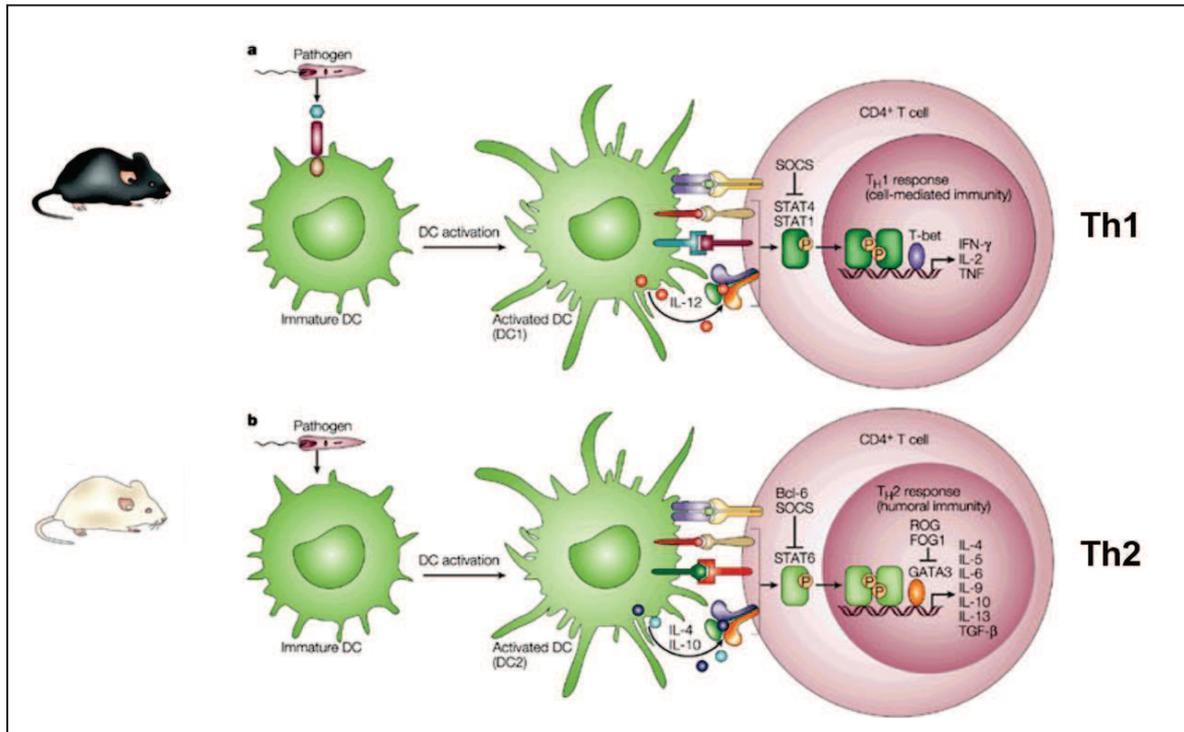
A localização intracelular das leishmânias no hospedeiro determina que o controle da infecção seja dependente da resposta imune mediada por células. As células dendríticas, principal tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), capturam e processam os antígenos de *Leishmania* e expressam na superfície ligados a moléculas de MHC-II. Essas células migram para os linfonodos regionais e apresentam os antígenos de *Leishmania* aos linfócitos T CD4⁺ virgens, onde estimulam a produção de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ específicos que são definidas pelo perfil de citocinas que secretam. Duas populações de linfócitos são de fundamental importância para a determinação do curso da infecção na leishmaniose: Th1 e Th2 (MOUGNEAU et al., 2011; ROBERTS, 2006).

A estimulação da resposta imune Th1 na leishmaniose cutânea é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , IL-12 e TNF- α . A produção de IFN- γ leva à morte intracelular das amastigotas pela ativação do macrófago, produção de óxido nítrico sintetase (iNOS) de óxido nítrico (NO). Baixos níveis de IFN- γ estão associados às lesões crônicas, bem como lesões de difícil tratamento. A inibição da resposta de IFN- γ é um resultado da estimulação da resposta Th2, caracterizada predominantemente pela produção de citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-4, e também de IL-10, citocina imunossupressora. A citocina IL-10, produzida por células T_{Reg}, é um inibidor de macrófagos ativados e de células dendríticas pela supressão das respostas IL-12 e pela diminuição da

expressão de coestimuladores e de moléculas de MHC de classe II nos macrófagos e células dendríticas. Portanto, citocinas moduladoras do perfil Th1, como a IL-4 e IL-10, inibem a ativação macrofágica contribuindo para o crescimento dos parasitas nas lesões (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; CASTELLANO et al., 2009; EZRA et al., 2010; MOUGNEAU et al., 2011; REIS et al., 2006; ROBERTS, 2006).

O estudo da relação entre a resposta imune polarizada e o curso da infecção na leishmaniose levou ao conceito de que o balanço da resposta Th1/Th2 determina a susceptibilidade ou resistência à doença (**Figura 2**). Camundongos geneticamente resistentes da linhagem C57BL/6 desenvolvem uma resposta de linfócito T CD4⁺ Th1, caracterizada pela secreção de IFN- γ , IL-12 e níveis elevados da oxido nítrico sintetase (iNOS) que levam à morte intracelular dos parasitas. Enquanto que, camundongos geneticamente susceptíveis da linhagem BALB/c desenvolvem lesões cutâneas no sítio de inoculação e falham no desenvolvimento de uma resposta imune eficaz mediada por células (REIS, 2006; ROBERTS, 2006).

Figura 2 - Resposta imune de camundongos C57BL/6 e BALB/c na infecção por *L. major*.



Fonte: Adaptado de Scott e Novais (2016).

Após a ativação, Th1 e Th2 influenciam-se mutuamente e de forma antagônica. A diferenciação do linfócito T CD4⁺ em Th1 ou Th2 é dirigida não

só pelo antígeno, mas também por moléculas co-estimulatórias e pelas citocinas produzidas no microambiente. No estudo da leishmaniose experimental cutânea, são vários os modelos atualmente utilizados na compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na relação parasita/hospedeiro. No **quadro 2**, Scott e Novais (2016), sintetizam com clareza os dois principais modelos experimentais da doença humana: o camundongo susceptível BALB/c e o resistente C57BL/6, bem como a resposta imune dominante encontrada em cada um deles em relação a diferentes espécies de leishmania. É possível ver a partir da análise do **quadro 2**, que o tipo de resposta imune desenvolvida na infecção experimental, depende não somente do modelo estudado, mas também da espécie de leishmania em questão.

Em muitos casos, o curso da leishmaniose cutânea humana evolui para a auto-cura com produção de uma imunidade duradoura contra re-infecções. Apesar do desenvolvimento de uma resposta imune robusta em camundongos resistentes e em muitos pacientes com leishmaniose cutânea, um pequeno número de parasitas pode persistir nas lesões. Assim como foi demonstrado em camundongos, a resposta Th1 com produção de IFN- γ está fortemente associada à cura clínica. Esta situação é caracterizada pela estimulação de células T CD4⁺ Th1 produtoras de IFN- γ . A falha no processo de resolução da doença também está associada a níveis elevados de IL-4 com baixa resposta de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ específicos (CASTELLANO et al., 2009; MOUGNEAU et al., 2011; ROBERTS, 2006).

Quadro 2- Leishmaniose cutânea humana causada por diferentes espécies de *Leishmania* spp. que são frequentemente usadas em estudos experimentais.

<i>Leishmania</i> spp.	Doença (humana)	Doença (camundongo)			
		C57BL/6		BALB/c	
		Tipo de doença	Resposta imune dominante	Tipo de doença	Resposta imune dominante
<i>L. major</i>	Auto-cura, Leishmaniose cutânea crônica, Usualmente presença de lesão cutânea única.	Auto-cura	Th1	Crônica	Th2
<i>L. major</i> cepa Seidman	Leishmaniose cutânea crônica.	Crônica	Th1	Crônica	Th2
<i>L. amazonensis</i>	Auto cura, Leishmaniose cutânea crônica, Usualmente presença de lesão cutânea única e associada à leishmaniose cutânea difusa.	Crônica	Th1/Th2	Crônica	Th2
<i>L. mexicana</i>	Cicatrização ou leishmaniose cutânea crônica, Usualmente presença de lesão cutânea única e associada à leishmaniose cutânea difusa.	Crônica	Th1/Th2	Crônica	Th2
<i>L. braziliensis</i>	Cicatrização ou leishmaniose cutânea crônica, Usualmente presença de lesão cutânea única e associada à leishmaniose cutânea difusa.	Auto cura	Th1	Auto cura	Th1

Fonte: Scott e Novais (2016, tradução nossa).

2.4 O PARAPOXVIRUS OVIS INATIVADO (PPVOi)

O *Parapoxvirus ovis* (PPVO) é um membro da família *Poxviridae* que causa lesões benignas de pele em caprinos (ovelhas e cabras), denominadas de ectima contagioso. O PPVO é um vírus envelopado, apresenta capsídeo cilíndrico complexo que envolve um genoma de DNA dupla-fita linear de aproximadamente 140kb. Pertencente à família *Poxviridae*, os poxvírus são considerados complexos em termos de estrutura e organização (DELHON et al., 2004).

De uma maneira geral, os vírus podem manipular a resposta imune do hospedeiro para influenciar o curso da infecção. Para isso, podem utilizar várias estratégias de modulação e evasão do sistema imune. Com o PPVO não é diferente. O genoma do PPVO codifica uma variedade de proteínas imunomodulatórias,

incluindo proteínas ortólogas de IL-10, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e do gene E3L da vaccinia que codifica um fator de resistência ao interferon, além de uma proteína anti-apoptótica e inibidores da sinalização do NF- κ B, que afetam profundamente a transcrição de genes pro-inflamatórios nas células infectadas, entre outras (FRIEBE et al., 2011).

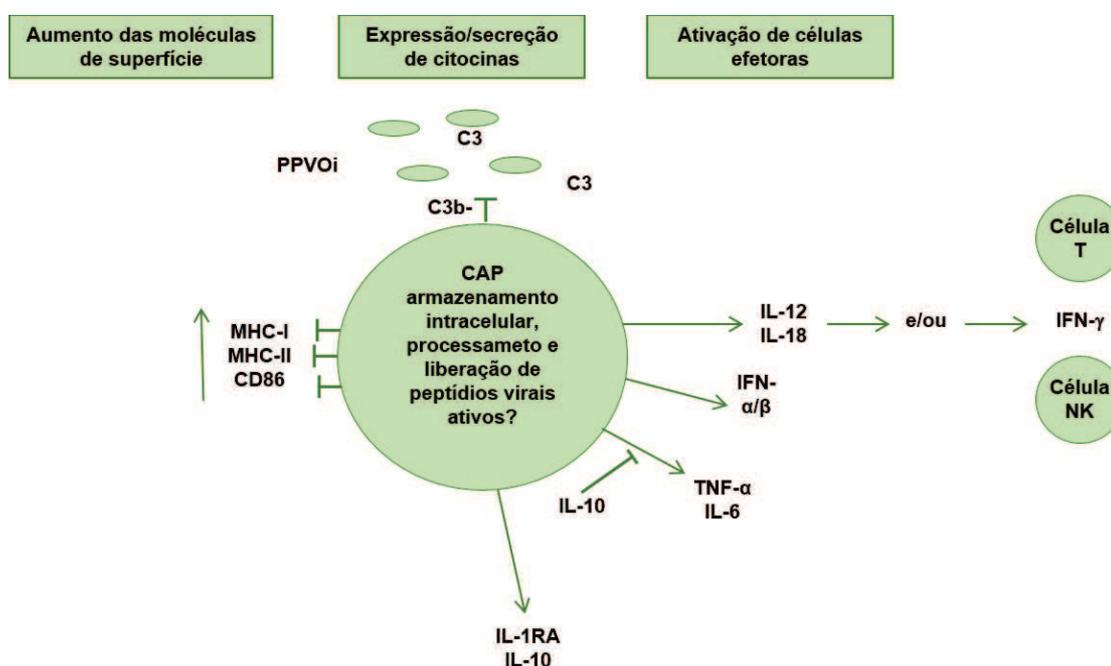
Um vírus inativado é um vírus morto que passou por um processo de inativação química ou física, sendo incapaz de se replicar e causar doença. Ao mesmo tempo que mantém a habilidade de estimular uma resposta imunológica. O método de inativação mais comumente utilizado é o método de inativação química, onde o agente químico tem a capacidade de atingir o material genético do vírus, inviabilizando a replicação da partícula viral, porém mantém conservada a estrutura de proteínas e outras moléculas biológicas importantes na indução da resposta imune. Geralmente, as preparações inativadas de vírus são mais efetivas em estimular resposta imune humoral contra antígenos de superfície, uma vez que as partículas virais inativadas são incapazes de invadir células e de se replicarem. Porém, isso não ocorre com **preparações inativadas do PPVO** (PPVOi) porque os poxvírus são estruturas grandes e complexas e podem ser facilmente reconhecidos por mecanismos da imunidade inata (NATIONAL CENTRE FOR IMMUNISATION RESEARCH & SURVEILLANCE, 2013; TURNER; MOYER, 2002; WEBER et al., 2013).

Dentre os membros da família *Poxviridae*, o PPVO é o mais amplamente estudado como imunomodulador e vem tendo seu potencial amplamente explorado por vários grupos de pesquisa, como imunomodulador profilático e terapêutico no tratamento de doenças infecciosas (WEBER et al., 2003), no combate ao câncer experimental (FIEBIG et al., 2011; RINTOL et al., 2012) e, mais recentemente, em modelo experimental de fibrose hepática (NOWATZKY et al., 2012).

O mecanismo de ação do PPVOi ainda não está completamente esclarecido. De uma maneira geral, estudos indicam que a partícula viral inativada leva ao acúmulo de células NK, neutrófilos e células dendríticas para o local de inoculação e estimule a apresentação de antígenos por múltiplas vias (**figura 3**). Foi demonstrado que o PPVOi exerce um forte efeito na estimulação inicial de citocinas: IL-6, IL-8 e TNF- α , por monócitos e APCs, bem como na secreção de IL-2, interferon tipo I (IFN- α/β) e citocinas Th1 (IL-12, IL-16 e IFN- γ) por linfócitos T CD4+. A estimulação de IFN- γ por linfócitos T e células NK é uma forte propriedade do PPVOi. Uma outra

característica importante é a estimulação da resposta Th1 seguida da liberação de citocinas regulatórias e citocinas Th2, que resulta num efeito imunoestimulante autoregulatório. O PPVOi tem a habilidade de induzir a uma resposta Th1 com liberação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de IFN- γ e, posteriormente, de citocinas anti-inflamatórias relacionadas a resposta Th2 (imunoreguladora), tais como IL4 e IL-10 (**figura 4**) (ANZILIERO et al., 2014; FRIEBE et al., 2003, 2004; SCHÜTZE et al., 2009; WEBER et al., 2013).

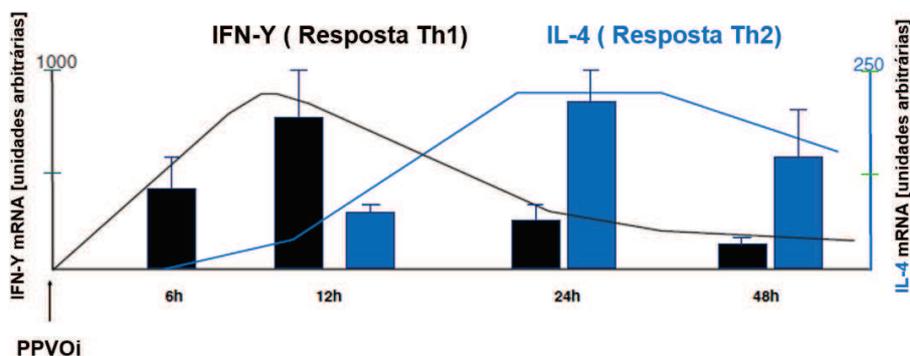
Figura 3- Mecanismos de ação do PPVOi



Fonte: WEBER et al. (2013, tradução nossa).

Foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que o PPVOi, quando utilizado como agente antiviral contra o vírus da hepatite B e o vírus herpes simples, levou a redução da replicação viral e da letalidade da doença sem causar injúria tecidual ou qualquer outro efeito colateral (WEBER et al., 2003).

Nowatzky et al. (2012), estudando o efeito do PPVOi em modelos experimentais de fibrose hepática confirmou o potencial terapêutico antifibrótico desse vírus contra essa importante patologia, através da produção de citocinas conhecidas por eliciar uma importante atividade antifibrótica: IFN- γ e IL-10.

Figura 4- Indução e autoregulação da resposta imune Th1 com PPVOi

PPVOi

Fonte: WEBER et al. (2013, tradução nossa).

Os efeitos imunomodulatórios do PPVOi têm sido por longo tempo reconhecido na pesquisa veterinária e também na indústria farmacêutica. Comercializado no passado sob o nome de PIND-ORF (Baypamun[®], Bayer) e hoje sob o nome de ZYLEXIS[®] (Pfizer Animal Health, UK), é utilizado como profilático e adjuvante no tratamento de várias doenças infecciosas em equinos (HOROHOV et al., 2008). Apenas recentemente os seus componentes moleculares responsáveis pelo efeito imunomodulador vem sendo caracterizados (FRIEBE et al., 2011; McGUIRE et al., 2012).

O imunoestimulante ZYLEXIS[®], baseado na inativação química do PPVO, quando utilizado em leucócitos obtidos de sangue total de cães saudáveis, induz consideravelmente a atividade fagocítica de monócitos e polimorfonucleares, e aumenta profundamente a atividade proliferativa de linfócitos T CD4⁺ (SCHÜTZE et al., 2009).

Em 2001, Hirth-Dietrich e colaboradores, em nome da Bayer (Leverkusen, Alemanha) entraram com pedido de patente internacional para uso de cepas de *Parapoxvirus ovis* (D1701, orf-11, Greek orf 176, Greek orf 155, NZ2, NZ7, NZ10 e também Baypamum[®]) para o tratamento de fibroses em humanos, demonstrando com isso, por parte da indústria farmacêutica, enorme interesse no potencial terapêutico desse vírus inativado no combate a doenças em humanos.

2.5 IN VIVO NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IMAGING

Imagem molecular *in vivo* tem por definição a caracterização de eventos moleculares envolvidos em processos normais e patológicos, através da representação visual, caracterização e quantificação de processos biológicos no nível celular e subcelular em organismos vivos intactos (MASSOUD; GAMBHIR, 2003).

As técnicas de imagem molecular representam um campo multidisciplinar, em que as imagens produzidas é um reflexo direto de mecanismos moleculares e celulares de ambientes fisiologicamente autênticos. As diferentes modalidades de imagem molecular convergem das técnicas de captura de imagem e dos conhecimentos gerados nos campos da biologia molecular e celular, química, medicina, farmacologia, física médica, matemática e bioinformática (CHOY et al., 2003; FRANGIONI, 2003; MASSOUD; GAMBHIR, 2006).

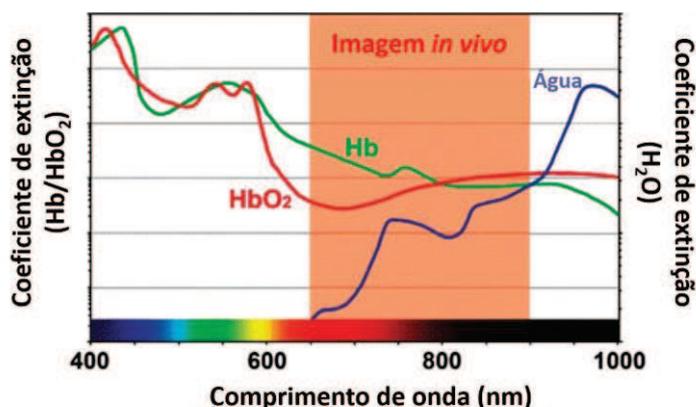
A experimentação animal ganhou novo foco com o desenvolvimento de técnicas não-invasivas que permitem de uma maneira mais rápida e robusta a avaliação do potencial de novas terapias. As técnicas de imagem mais amplamente utilizadas na pesquisa com pequenos animais são: tomografia computadorizada, PET, *single photon emission* CT (SPECT), ressonância magnética e imagem óptica (fluorescência e luminescência) (FINE et al., 2014; MASSOUD; GAMBHIR, 2003).

Como citado, as técnicas de imagem óptica são baseadas na detecção de fluorescência e bioluminescência a partir de organismos vivos. De uma maneira geral, imagem óptica por fluorescência pode ser definido como um conjunto de técnicas que usa luz do espectro UV, luz branca (visível) e luz *near-infrared* (NIR) para visualizar características ópticas de tecidos e células através da absorção e dispersão da luz, seguido de emissão de fluorescência. A compreensão da interação da luz com tecidos vivos abriu novas possibilidades de desenvolvimento de equipamentos que permitissem induzir e capturar de maneira apropriada fenômenos de fluorescência. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de *lasers* e câmeras CCD (*charge-coupled device*) impulsionaram a aplicação dessas técnicas para uso *in vivo*. Nos últimos anos, a utilização de proteínas fluorescentes obtidas da água viva e de corais, como as proteínas *GFP-like*, revolucionaram a biologia celular e molecular (CHOY et al., 2003; FILINOV et al., 2011; MASSOUD e GAMBHIR, 2003).

A maior ou menor transparência de tecidos vivos à luz é uma função da interação e absorção da luz pela matéria e depende fortemente do comprimento de onda utilizado. Quanto maior for a absorção da luz, menor será a transparência do tecido no comprimento de onda utilizado. Na “janela óptica” NIR (de 700nm a 900nm), os tecidos de mamíferos são mais transparentes à luz e a absorção da luz por componentes biológicos presentes em grande quantidade nos tecidos é mínima (**figura 5**). Isto faz com que a luz (menos absorvida) atinja máxima profundidade de penetração nos tecidos. Além disso, estes componentes moleculares presentes em grande quantidade em tecidos vivos, exibem características espectrais de autofluorescência natural na região visível do espectro (até aproximadamente 700nm). A possibilidade de usar a luz NIR para solucionar este problema, deu origem ao desenvolvimento com sucesso da técnica de *in vivo near-infrared optical imaging*. Essa técnica é atrativa porque, comparada às demais, é barata e de fácil manipulação. As sondas podem ser detectadas em baixas concentrações e a radiação utilizada (não-ionizante), não sendo nociva, pode ser aplicada repetidamente ao objeto de estudo (FILINOV et al., 2011; FRANGIONI, 2003).

Nos últimos anos, várias proteínas fluorescentes na faixa próxima ao infravermelho vêm sendo manipuladas e utilizadas em estudos de imagem, seja *in vitro* ou *in vivo*, dando origem as chamadas proteínas fluorescentes *near-infrared* (IFPs) (FILINOV et al., 2011; SCHERBO et al., 2010; SHU et al., 2009).

Figura 5- Características do espectro na “janela” NIR



Fonte: Shen et al. (2013, tradução nossa).

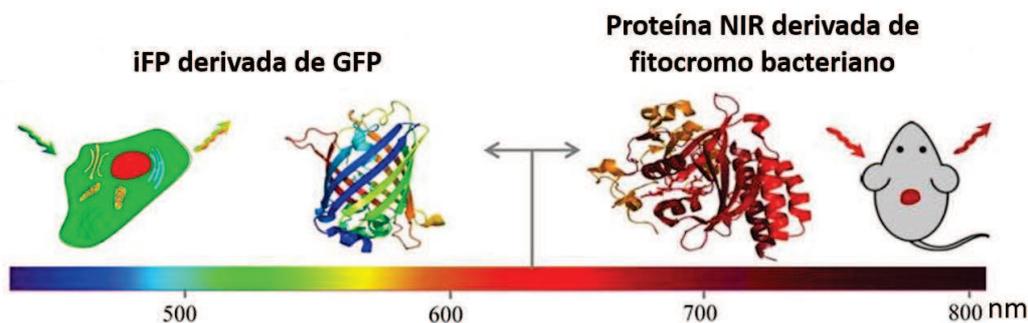
Nota: Na faixa de comprimento de onda entre aproximadamente 700 e 900nm, a absorção da luz por componentes dos tecidos é menor.

Duas dessas proteínas, a IFP1.4 de *Deinococcus radiodurans* e a proteína iRFP de *Rhodospseudomonas palustris*, são componentes de fitocromos de bactérias e apresentam uma característica particular: ambas incorporam o cromóforo biliverdina, que é um intermediário do catabolismo do grupamento heme em todos organismos aeróbicos, incluindo animais. Fitocromos de bactérias são bons candidatos para o desenho de proteínas fluorescentes *near-infrared* porque a biliverdina, um co-fator obrigatório dessas moléculas, é um intermediário do metabolismo normal do grupamento heme de mamíferos (FILINOV et al., 2011; SHU et al., 2009).

Em comparação com proteínas derivadas da GFP, as proteínas derivadas de fitocromos de bactérias possuem pico de excitação e emissão na “janela NIR” do espectro, onde tecidos de mamíferos são mais transparentes à luz e os fenômenos de dispersão e autofluorescência da luz são menores (**figura 6**) (SHCHERBAKOVA; BALOBAN; VERKHUSHA, 2015).

A proteína iRFP é uma proteína fluorescente que apresenta pico de excitação e emissão máximo de 690nm e 713nm, respectivamente. Não requer uma fonte exógena de biliverdina e apresenta características de brilho, estabilidade intracelular e fotoestabilidade superiores à proteína IFP1.4. A iRFP é estável, não-citotóxica e baixas concentrações de biliverdina endógena são suficientes para conferir fluorescência a células, tecidos e animais (FILINOV et al., 2011).

Figura 6- Vantagem do uso de proteínas NIR sobre proteínas derivadas de GFP.



Fonte: Adaptado de Shcherbakova; Baloban; Verkhusha (2015).

Nota: Comparação das características do espectro de fluorescência de proteínas derivadas da GFP e proteínas NIR, derivadas de fitocromos de bactérias. A faixa de comprimento de onda em que as proteínas NIR fluorescem permitem seu uso na técnica de *in vivo near-infrared fluorescence imaging*.

Várias espécies de *Leishmania* recombinantes fluorescentes e bioluminescentes têm sido relatadas e vêm sendo utilizadas para diversas finalidades: *L. donovani*-GFP (epissomal e integrativo), *L. donovani*-Luciferase (epissomal e integrativo), *L. amazonensis*-Luciferase/ β -lactamase (integrativo), *L. amazonensis*-GFP/EGFP/ β -galactosidase (epissomal), *L. mexicana*-GFP (epissomal e integrativo), *L. major*-Luciferase (epissomal e integrativo) (BOLHASSANI et al., 2011) e *L. tarentolae*-IFP1.4 (DORTAY; MUELLER-ROEBER, 2010), entre outras.

Nos últimos anos, uma série de leishmânias fluorescentes vem sendo construídas com diversas finalidades, tais como: compreensão da relação parasita-hospedeiro, estudo da resposta imunológica, monitoramento da infecção, *screening* de drogas anti-leishmânias, desenvolvimento de vacinas e expressão de proteínas heterólogas (MILLINGTON et al., 2010; LANG et al., 2009; DORTAY; MUELLER-ROEBER, 2010; BOLHASSANI et al., 2011; LANG et al., 2005; MICHEL et al., 2011).

Uma leishmania transgênica que expressa estavelmente uma proteína fluorescente no seu citoplasma e que mantém suas características de patogenicidade e virulência é uma excelente ferramenta para avaliação e *screening* de drogas anti-leishmânias *in vitro* e *in vivo* (LANG et al., 2009).

3 JUSTIFICATIVA

A forte associação entre uma resposta imune eficaz e a cicatrização das lesões cutâneas faz com que a modulação da resposta imune seja atualmente uma importante estratégia de tratamento da leishmaniose cutânea. A ativação ou potencialização da resposta imunológica Th1 pelo *Parapoxvirus ovis* inativado, com produção das citocinas envolvidas na resposta, pode fornecer vantagens sobre as imunoterapias existentes. O PPVOi é seguro para uso em animais e vem sendo utilizado na prática clínica veterinária no tratamento e prevenção de várias doenças de origem infecciosa e não-infecciosa. As propriedades imunoestimulantes do vírus inativado combinadas à ausência de efeitos colaterais fazem do PPVOi um candidato promissor no combate à doença. Além disso, o desenvolvimento de um sistema de imagem baseado na tecnologia de *in vivo near-infrared fluorescence imaging*, para o monitoramento *in vivo* não-invasivo e em tempo real da infecção por uma linhagem de *L. amazonensis* fluorescente, representa uma contribuição no estudo do curso da infecção em modelo murino e no avanço de estudos pré-clínicos de eficácia de drogas anti-leishmania.

4 HIPÓTESE

O PPVOi é eficaz no combate à leishmaniose cutânea em modelo murino, estimulando a resposta imune do tipo Th1, que leva à morte intracelular das leishmânias pela produção de IFN- γ e, conseqüentemente, a cura dos camundongos infectados.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da imunoterapia com o PPVOi no tratamento da leishmaniose cutânea murina, associada ou não à quimioterapia.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver um método de imagem *in vivo* não-invasivo para a detecção da infecção por *L. amazonensis*-iRFP em camundongos BALB/c;
- b) Acompanhar o desenvolvimento da leishmaniose cutânea em camundongo BALB/c utilizando um método de imagem *in vivo*;
- c) Avaliar a eficácia da imunoterapia com o PPVOi em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*-iRFP;
- d) Realizar um estudo preliminar da resposta imunológica de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*-WT e tratados com PPVOi.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para o desenvolvimento deste trabalho, os protocolos de experimentação animal, bem como de construção de uma *L. amazonensis* geneticamente modificada foram avaliados e aprovados respectivamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE (número de aprovação 64/2014) e pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) – Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação.

6.2 ANIMAIS

No protocolo experimental desta pesquisa foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem isogênica BALB/c, machos, com 6-8 semanas de idade, pesando 20 ± 2 g, provenientes do biotério da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Os animais utilizados nessa pesquisa foram divididos em grupos e mantidos na sala NB-2 do Biotério de Experimentação do CPqAM, no interior de caixas isoladoras e em rack ventilada (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), sob condições padronizadas de temperatura ($\pm 23^\circ\text{C}$) e luminosidade, recebendo água autoclavada e alimentação *ad libitum* com dieta padrão comercial para camundongos (Nuvital, Curitiba, PR). A cama dos animais foi forrada de maravalha de *Pinus elliot* e trocada duas vezes por semana em uma estação de troca classe II (Alesco).

6.3 LEISHMANIA AMAZONENSIS

A cepa MHOM/BR/77/LTB0016 de *L. amazonensis* utilizada neste trabalho foi cedida pela Dra. Valéria Pereira, do Laboratório de Imunogenética (CPqAM-FIOCRUZ). *Leishmania amazonensis* é uma das espécies responsáveis pelo desenvolvimento da leishmaniose cutânea nas Américas e é frequentemente utilizada em estudos de eficácia de drogas anti-leishmania *in vitro* e *in vivo*. Esta espécie e cepa foi preconizada pelos integrantes da *Research Initiative on Natural Products against Neglected Diseases* – (ResNetNPD) como modelo para triagem de

compostos leishmanicidas devido a sua facilidade de cultivo *in vitro*. Neste trabalho esta cepa receberá a denominação *L. amazonensis*-WT (*L. amazonensis*-wild-type).

6.4 PARAPOXVIRUS OVIS INATIVADO (PPVOI)

A cepa do *Parapoxvirus ovis* utilizada neste estudo é a cepa OV-IA82, isolada em 1982 em Iowa, Estados Unidos (DELHON et al., 2004). O PPVOi, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, foi propagado em cultivo primário de corneto nasal e titulado pela *Tissue Culture Infective Dose 50%* (TCID₅₀) em triplicata, onde o título mais elevado obtido foi 10^{8,5} TCID₅₀/ml. A suspensão viral foi concentrada através de ultracentrifugação a 20.000 rpm por 2 horas a 4°C. Em seguida, a inativação química das partículas virais foi realizada pela adição de etilenoimina binária (EBI) (1% do volume final) por 18 horas a 37°C sob agitação. Após este período foi adicionado tiosulfato de sódio 1M (1% do volume final) e deixado por 1 hora a 37°C sem agitação. A eficácia da inativação (morte) das partículas virais foi confirmada por novo ensaio de TCID₅₀ em triplicata. Após a confirmação da morte das partículas virais (inativação eficaz), a preparação viral foi liofilizada e armazenada a 4°C (ANZILIERO et al., 2014).

6.5 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IMAGEM *IN VIVO* NÃO-INVASIVO PARA A DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR *L. AMAZONENSIS*-IRFP EM BALB/c

6.5.1 Estratégia de clonagem e desenho dos oligonucleotídeos

Para inserção do gene *iRFP* no genoma de *L. amazonensis*, foi escolhido o vetor de expressão em leishmania, o pLEXSY-hyg2 (Jenabioscience, Alemanha). Para a expressão constitutiva e citosólica da ORF de *iRFP*, foi utilizado o sítio de clonagem 5'-NcoI e 3'-NotI de pLEXSY-Hyg2. A sequência de *iRFP* foi previamente analisada para a presença de sítios de restrição internos para a NcoI, NotI e SwaI e, em seguida, oligonucleotídeos *sense* e *antisense* foram desenhados contendo em suas sequências sítios de restrição para as enzimas NotI e NcoI, respectivamente. São eles: *iRFP*-F (5'- CCATGGCGGAAGGATCCGTCGCCAG-3') e *iRFP*-R (5'-

GCGGCCGCTCACTCTTCCATCACGCCG-3'). As trincas de nucleotídeos destacadas representam o *start* e *stop* códon, respectivamente. A estratégia de clonagem, bem como o desenho dos oligonucleotídeos foram realizados com auxílio do programa *ApE* - *A plasmid editor* (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

6.5.2 Construção e obtenção do cassete pLEXSY-Hyg2-iRFP

A sequência do gene da proteína *infrared fluorescence protein* (iRFP) de *Rhodopseudomonas palustris* (FILINOV et al. 2011), de 948pb (*GenBank*: JN247409), foi quimicamente sintetizada e clonada no plasmídeo pUC57 (*GenScript*, USA). O plasmídeo pUC57-iRFP foi utilizado numa reação de PCR com os oligonucleotídeos iRFP-F e iRFP-R para amplificação do gene com o kit *HotStar HiFidelity Polymerase Kit* (QIAGEN), de acordo com as orientações do fabricante. Um produto de PCR de aproximadamente 1000pb, equivalente ao tamanho do gene amplificado, foi isolado do gel de agarose a 1% e purificado com o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Helthcare).

Em seguida, o produto purificado foi ligado no vetor pDrive utilizando o *PCR Cloning Kit* (QIAGEN) e subclonado em *Escherichia coli* cepa DH10-B quimiocompetente, por choque térmico. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo ágar LB adicionado de 100 µg/ml de ampicilina, 40µl de X-Gal (20mg/ml) e 40µl de IPTG 100mM, e deixadas a 37°C por 16-18 horas. As colônias selecionadas foram cultivadas em 5 ml de meio LB com 50 µg/ml de ampicilina, a 37°C, sob agitação de 150 rpm, para realização da extração do DNA plasmidial com o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN).

O plasmídeo obtido, denominado de **pDrive-iRFP**, foi digerido com as enzimas de restrição NotI e NcoI, gerando dois fragmentos. O fragmento de interesse, de aproximadamente 1000pb, foi isolado e purificado do gel de agarose com o kit de purificação. Paralelamente, o vetor de leishmania pLEXSY-Hyg2 também foi digerido com as enzimas NcoI e NotI para liberação do fragmento *stuffer* e, em seguida, foi desfosforilado adicionando-se 1 unidade da enzima fosfatase alcalina (*calf intestinal*) (New England BioLabs), por 30 minutos a 37°C.

Após eletroforese do pLEXSY-Hyg2 digerido com NotI e NcoI, foram visualizados dois fragmentos: um de 8033pb e o outro de 1100pb. O fragmento de

interesse foi isolado do gel e purificado utilizando o kit de purificação citado previamente. Em seguida, o fragmento de aproximadamente 1000pb, obtido da digestão do pDrive-*iRFP* com NotI e NcoI foi ligado no pLEXS_Y-Hyg2 usando a T4 DNA ligase (New England BioLabs), numa mistura contendo diferentes proporções de plasmídeo e inserto, tampão 10X, enzima T4 DNA ligase e água DNase/RNase free.

O produto da ligação **pLEXS_Y-Hyg2-*iRFP*** foi inserido novamente em *E. coli* pela transformação de células de *E. coli* DH10-B quimiocompetentes, através de choque térmico. As células de *E. coli* foram cultivadas como previamente citado e deixadas por 16-18 horas a 30°C. As colônias selecionadas foram utilizadas para realização de extração de DNA plasmidial. Em seguida, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas NotI e NcoI e uma *miniprep* (clone 1) foi selecionada e enviada para Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, para sequenciamento de DNA.

6.5.3 Transfecção e recombinação homóloga

Após a confirmação da sequência, foi realizado uma extração de DNA em larga escala do clone 1 de *E. coli*-pLEXS_Y-Hyg2-*iRFP* utilizando o kit *PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante. Em seguida, o plasmídeo foi utilizado numa reação de digestão com a enzima SwaI (New England BioLabs) para liberação do fragmento de 2,9 kb que representa a parte responsável pela replicação do plasmídeo em *E. coli*.

O fragmento maior de aproximadamente 6000pb, equivalente ao cassete linearizado com o gene *iRFP*, foi purificado do gel de agarose com o kit de purificação. Em seguida, o cassete de expressão de *iRFP* foi transfectado em promastigotas de *L. amazonensis*-WT (cepa LTB0016). Brevemente, foi realizado um inóculo de *L. amazonensis*-WT diluído de 1:10 em um volume final de 10 ml de meio Schneider contendo 1% de antibiótico Pen/Strep (penicilina – 100 U/ml e estreptomicina – 100 µg/ml), 10% de soro bovino fetal (SFB) e 5µg/ml de hemina (Schneider completo), mantido a 26°C em estufa de B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), sem agitação, *overnight*. No dia seguinte, após atingir a densidade de aproximadamente 5×10^7 células/ml (fase log), a cultura foi centrifugada à temperatura ambiente, a 2000xg por 5 minutos e, em seguida, metade do

sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido no meio restante e colocado em isopor com gelo por 10 minutos juntamente com as cuvetas de eletroporação (d=2mm) e um tubo contendo 5µg de DNA (pLEXSY-Hyg2-iRFP) diluídos em 50µl de água *milli-q* estéril. Em seguida, 350µl da cultura de *L. amazonensis*-WT foram transferidos para o tubo contendo DNA. Para realização do controle negativo, 350µl da cultura de *L. amazonensis*-WT foram adicionados a 50µl de água *milli-q* estéril. As misturas contendo e não contendo DNA foram transferidas para cuvetas de eletroporação geladas e submetidas a eletroporação no *Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems* (BIO-RAD). Em seguida, as cubetas foram deixadas no gelo por 10 minutos. As células eletroporadas foram então transferidas para 10ml de meio Schneider completo e deixadas *overnight* a 26°C em estufa de B.O.D.

6.5.4 Seleção clonal de *L. amazonensis*-iRFP

Para a seleção clonal, 4 alíquotas de 2ml da cultura *overnight* foram centrifugadas a 2000xg por 5 minutos a 20°C, os sobrenadantes descartados e as células foram ressuspendidas em 50-100µl de meio residual. Para a seleção das colônias recombinantes as células foram gentilmente semeadas em placas de Petri contendo ágar Schneider completo e 100 µg/ml de higromicina (Invitrogen). Em seguida, as placas foram seladas e incubadas por 9 dias a 26°C em estufa de B.O.D. Após atingirem aproximadamente 1-2mm de diâmetro, as colônias foram transferidas com auxílio de uma ponteira estéril para placa de cultura de 96 poços contendo 200µl de Schneider completo contendo 100 µg/ml de higromicina. Os 2ml restantes da cultura transfectada e 2ml da cultura controle foram utilizados para fazer a seleção não-clonal das leishmânias recombinantes em meio Schneider completo sem antibiótico.

Assim que as culturas começaram a ficar ligeiramente turvas, aproximadamente 24 horas após a eletroporação, o antibiótico de seleção (higromicina) foi adicionado às culturas na concentração de 100µg/ml e a incubação a 26°C foi continuada. Os parasitas foram avaliados quanto a forma e a motilidade diariamente. As leishmânias do controle negativo morrem durante o período de seleção, enquanto que as recombinantes permanecem ativas no meio de cultura.

6.5.5 Detecção da fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP

A emissão da fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP foi detectada no *scanner* de fluorescência Odyssey® (Li-COR, USA) utilizando o laser de 700nm. Para isso, foi utilizada uma placa de 96 poços contendo *L. amazonensis*-iRFP cultivadas em 200µl meio Schneider completo com 5µg/ml de hemina e 50µg/ml de higromicina, bem como *L. amazonensis*-WT cultivadas em meio sem higromicina (utilizada como controle negativo) para comparação do crescimento das duas leishmânias em suspensão ao longo do tempo. Além disso, a placa de Petri contendo colônias de *L. amazonensis*-iRFP em ágar Schneider também foi escaneada para a confirmação e seleção de clones positivos pela emissão de fluorescência diretamente das colônias. Posteriormente, foi realizado uma curva de fluorescência no Odyssey® a partir de diluição seriada de uma cultura de *L. amazonensis*-iRFP na fase *log* (parasitas/ml), em placa de 96 poços, antes da centrifugação e depois da centrifugação.

6.5.6 Confirmação da integração do cassete de iRFP no genoma de *L. amazonensis*

Para isso, DNA genômico de *L. amazonensis*-iRFP e *L. amazonensis*-WT foram extraídos a partir de cultura, utilizando o kit *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen). Em seguida foi realizada uma PCR padrão com os oligonucleotídeos Hyg-F (5'- CCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCG-3') e ssu-R (5'- CTGCAGGTTACCTACAGCTAC-3') para confirmação da integração do cassete pLEXY-hyg2-iRFP no *locus ssu* do rRNA subunidade 18S.

6.5.7 Avaliação das características de patogenicidade e virulência de *L. amazonensis*-iRFP *in vivo* e obtenção de cepas infectivas

Promastigotas de *L. amazonensis*-iRFP e *L. amazonensis*-WT foram descongeladas e transferidas para tubos falcons contendo 10 ml de PBS 1X, estéril. As leishmânias foram centrifugadas a 2000xg por 5 minutos para a remoção do glicerol e o *pellet* ressuspendido em 5 ml de meio Schneider completo com e sem o antibiótico higromicina, respectivamente, em estufa de B.O.D a 26°C, até atingir a fase estacionária (ao fim do quarto dia) para obtenção das formas promastigotas

metacíclicas. Após o período de quatro dias, as leishmânias foram contadas e centrifugadas a 2000xg por 5 minutos. Os pellets resultantes foram ressuspensos em PBS 1X estéril e, em seguida, *L. amazonensis*-iRFP e *L. amazonensis*-WT foram inoculadas em dois diferentes grupos de BALB/c contendo 2 animais cada, com 1×10^7 parasitas diluídos em 30 μ L de tampão PBS 1X estéril pH 7,2, por via subcutânea no coxim plantar da pata inferior esquerda, utilizando uma seringa de insulina com agulha 26G e sob condições assépticas.

Os animais ficaram em observação inicialmente até completar 30 dias: tempo padrão para o desenvolvimento de lesão visível. A lesão foi caracterizada pela formação de um nódulo na região de inoculação das leishmânias que resultou no inchaço das patas afetadas. Após esse período, os animais inoculados com *L. amazonensis*-iRFP foram sedados e escaneados no Odyssey[®] para detecção de fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP.

Para visualização da fluorescência os animais foram escaneados conforme os procedimentos descritos no tópico “aquisição de imagens” descrito no fim desta seção. Após o período de aproximadamente 50 dias, os animais foram eutanasiados e os nódulos (lesões) foram removidos sob condições estéreis, para obtenção de cepas infectivas de *L. amazonensis*-iRFP. A amostra coletada foi transferida para um tubo Falcon de 15ml contendo 2ml de PBS 1X estéril pH 7,2 contendo 1,5% de antibiótico Pen/Strep. Em seguida, o nódulo foi macerado e homogeneizado e, após um período de tempo em repouso, o sobrenadante foi transferido para tubo Falcon e foi centrifugado a 2000xg por 5 minutos.

Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de *L. amazonensis*-iRFP e *L. amazonensis*-WT foi ressuspensado em 5 ml de meio Schneider completo com e sem 50 μ g/ml de higromicina, respectivamente. Em seguida, a suspensão foi incubada em estufa de B.O.D. a 26°C por aproximadamente uma semana. Após este período, a cultura foi transferida para um tubo Falcon de 50 ml contendo 10 ml de meio Schneider completo e, em seguida, foi cultivada em estufa de B.O.D. a 26°C por mais 5 dias.

Passado esse período, a cultura (passagem 1) foi centrifugada a 2000xg por 5 minutos para obtenção de um *pellet*. Para preparação do estoque congelado de leishmânias infectivas, o *pellet* foi ressuspensado em meio Schneider completo contendo 20% de glicerol estéril. Em seguida foi aliquoteado e congelado a -80°C.

6.6 ACOMPANHAMENTO DA LC EM BALB/c UTILIZANDO TRÊS DIFERENTES INÓCULOS DE *L. AMAZONENSIS*-IRFP

Promastigotas infectivas recém-obtidas de *L. amazonensis*-iRFP na passagem 1 foram descongeladas e transferidas para um tubo Falcon contendo PBS 1X estéril pH 7,2. Em seguida, a suspensão de leishmania foi centrifugada a 2000xg por 5 minutos para a remoção do glicerol e o *pellet* foi ressuscitado em 10ml de meio Schneider completo contendo 50 µg/ml de higromicina. Para a preparação do inóculo de *L. amazonensis*-iRFP, as leishmânias foram contadas e foi realizado um inóculo na concentração inicial de 1×10^6 células/ml em meio Schneider completo contendo 50 µg/ml de higromicina. A cultura foi deixada em estufa de B.O.D a 26°C, até atingir a fase estacionária de crescimento, por volta do quarto dia. Ao atingir a fase estacionária, as leishmânias foram contadas e centrifugadas a 2000xg por 5 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em tampão PBS 1X estéril pH 7,2.

Em seguida, camundongos BALB/c foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar da pata inferior esquerda, com diferentes quantidades de promastigotas na fase estacionária de *L. amazonensis*-iRFP (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7) diluídas em 30µL de tampão PBS 1X estéril pH 7,2, utilizando uma seringa de insulina com agulha 26G e sob condições assépticas. Após a inoculação das leishmânias, a progressão da doença foi monitorada semanalmente. Os animais inoculados foram periodicamente sedados com uma mistura de cetamina e xilasina e escaneados no Odyssey®, semanalmente, por um período de 2 meses, para quantificação da fluorescência e acompanhamento da evolução da lesão por imagem, conforme os procedimentos descritos no tópico “aquisição das imagens” descrito no fim desta seção.

O primeiro escaneamento (dia 0) foi realizado logo após a inoculação das leishmanias. Os escaneamentos seguintes foram realizados no dia 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63 após a inoculação dos parasitas. Ao fim do último escaneamento os animais foram submetidos à eutanásia.

6.7 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA IMUNOTERAPIA COM O PPVOi EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS*-IRFP

Para realização deste objetivo, promastigotas infectivas recém-obtidas de *L. amazonensis*-iRFP na passagem 1 foram descongeladas e transferidas para um tubo Falcon contendo PBS 1X estéril pH 7,2. Em seguida, a suspensão de leishmania foi centrifugada a 2000xg por 5 minutos para a remoção do glicerol e o *pellet* foi ressuscitado em meio 10ml de meio Schneider completo contendo 50 µg/ml de higromicina. Para a preparação do inóculo de *L. amazonensis*-iRFP, as leishmânias foram contadas em câmara de Neubeur e foi realizado um inóculo na concentração inicial de 1×10^6 células/ml em meio Schneider completo contendo 50µg/ml de higromicina. A cultura foi deixada em estufa de B.O.D a 26°C, até atingir a fase estacionária de crescimento, por volta do quarto dia. Ao atingir a fase estacionária, as leishmânias foram contadas e centrifugadas a 2000xg por 5 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em tampão PBS 1X estéril pH 7,2.

Em seguida, camundongos BALB/c foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar da pata inferior esquerda, com 1×10^7 promastigotas na fase estacionária de *L. amazonensis*-iRFP, diluídas em 30µL de tampão PBS 1X estéril pH 7,2, utilizando uma seringa de insulina com agulha 26G, sob condições assépticas. Os animais foram mantidos em observação por cerca de 45 dias até o surgimento das lesões.

Os animais foram distribuídos em 7 grupos experimentais, totalizando 3 animais por grupo (**quadro 3**):

Quadro 3- Descrição dos grupos de tratamento do estudo de eficácia.

GRUPO	Descrição	“n” amostral
I	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀), administrados por via intraperitoneal , com um intervalo de 3 dias, por 25 dias.	3
II	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀), administrados por via intramuscular , com um intervalo de 3 dias, por 25 dias	3
III	Animais infectados e submetidos ao tratamento com a droga de referência Glucantime® (Aventis, França) por via intramuscular na dose de 100mg/Kg/dia por 25 dias.	3
IV	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀) administrado por via intraperitoneal com um intervalo de 3 dias e Glucantime® administrado por via intramuscular na dose de 100mg/Kg/dia por 25 dias.	3
V	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀) administrado via intramuscular com um intervalo de 3 dias e Glucantime® administrado por via intramuscular na dose de 100mg/Kg/dia por 25 dias.	3
VI	Animais infectados e não submetidos a tratamento.	3
VII	Animais não infectados, não submetidos a tratamento e com mesma idade e faixa de peso que os animais infectados.	3

Fonte: a autora.

Para avaliação da eficácia dos tratamentos nos diferentes grupos de animais, foram utilizados como parâmetros a medida do tamanho da lesão através do uso do paquímetro e a intensidade de fluorescência, em todos animais dos grupos. Os animais foram acompanhados antes, durante e depois dos tratamentos utilizando a

metodologia de imagem *in vivo*. Além disso, a carga parasitária nas lesões também foi determinada por meio de ensaio de diluição quantitativo, de acordo com Carneiro et al. (2012). Após o desenvolvimento da lesão, aproximadamente 45 dias após a inoculação das leishmânias e antes do início dos tratamentos, foi realizado o primeiro escaneamento dos grupos com exceção do grupo VII (animais não-infectados). A eficácia dos tratamentos foi avaliada semanalmente através da detecção de fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP no Odyssey®, nos dias 0 (antes do tratamento), 8, 15 e 32. Eventualmente, nos dias em que foi necessária a realização de ambos os procedimentos: administração da terapia (injetável) e escaneamento dos animais; estes foram realizados em turnos diferentes.

Para a aquisição das imagens, os grupos de animais foram levemente anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina, escaneados e monitorados conforme os procedimentos descritos no tópico “aquisição da imagem”. Além disso, a progressão da doença também foi monitorada semanalmente pela medida do diâmetro das lesões através da utilização do paquímetro.

Após o período de observação e eutanásia dos grupos, a carga parasitária dos animais foi analisada por meio de ensaio quantitativo de diluição de acordo com Carneiro et al. (2012). Para isso, fragmentos de lesões foram removidas sob condições assépticas, maceradas e homogeneizadas. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada na base 2 do material homogeneizado em placa de 96 poços contendo 200µl de meio Schneider completo, em triplicata. As placas foram mantidas por 7 dias em estufa de B.O.D a 26°C e ao final desse período a quantidade de parasitas/mg de lesão foi calculada com base no peso (em mg) do fragmento de lesão coletado e do último título positivo na placa para a presença de leishmânias viáveis.

6.7.1 Aquisição das imagens

Grupos de até 3 (três) animais foram anestasiados via intraperitoneal com uma mistura de cetamina-xilazina administrada na dose de 115mg/Kg de cloridrato de cetamina a 10% e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina a 2%. Uma gota de solução fisiológica estéril foi pingada nos olhos a fim de evitar o ressecamento da córnea. Em seguida, os animais foram posicionados na superfície aquecida a 37°C do MousePOD® (Li-COR), na posição decúbito dorsal. Suas patas (saudáveis e

doentes) foram posicionadas contra a superfície do *scanner* e fixadas com auxílio de uma fita micropore. De acordo com a necessidade, foi realizado 1 (um) ou mais escaneamentos, ajustando-se a intensidade do laser, bem como de outros parâmetros. Concluída a aquisição da imagem, os animais foram alojados em suas caixas e cobertos com maravalha até completa recuperação anestésica. Em seguida, foram transferidos para suas caixas. A quantificação pela detecção da intensidade de fluorescência emitida por *L. amazonensis*-iRFP, foi determinada pela média no número de *pixels* utilizando o *Odyssey Application Software Version 3.0*.

6.8 ESTUDO PRELIMINAR DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS*-WT E TRATADOS COM PPVOi

Para realização deste objetivo, promastigotas infectivas de *L. amazonensis*-WT na passagem 1 foram descongeladas e transferidas para um tubo Falcon contendo PBS 1X estéril pH 7,2. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2000xg por 5 minutos para a remoção do glicerol e o *pellet* foi ressuspenso em 10ml de meio Schneider. Para a preparação do inóculo, as leishmânias foram contadas em câmara de Neubeur e foi realizado um cultivo na concentração inicial de 1×10^6 células/ml em meio Schneider completo. A cultura foi deixada em estufa de B.O.D a 26°C, até atingir a fase estacionária de crescimento, por volta do quarto dia. Então, as leishmânias foram contadas e centrifugadas a 2000xg por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspenso em tampão PBS 1X estéril pH 7,2. Em seguida, camundongos BALB/c foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar da pata inferior esquerda com 10^7 promastigotas de *L. amazonensis*-WT diluídas em 30µL de tampão PBS 1X estéril pH 7,2, utilizando uma seringa de insulina com agulha 26G e sob condições assépticas. Os animais foram mantidos em observação por cerca de 30-45 dias até o surgimento das lesões. Em seguida, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais, totalizando 3 animais por grupo (**quadro 4**):

Quadro 4- Descrição dos grupos de tratamento do estudo imunológico.

GRUPO	Descrição	“n” amostral
I	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀), administrado por via intraperitoneal com um intervalo de 3 dias, por 25 dias.	3
II	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀), administrado via intramuscular com um intervalo de 3 dias, por 25 dias	3
III	Animais infectados e submetidos ao tratamento com a droga de referência Glucantime® por via intramuscular na dose de 100mg/Kg/dia por 25 dias.	3
IV	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀) administrado por via intraperitoneal com um intervalo de 3 dias e Glucantime® administrado por via intramuscular na dose de 100mg/Kg/dia por 25 dias.	3
V	Animais infectados e submetidos ao tratamento com 100µl do PPVO inativado (5×10^6 TCID ₅₀) administrado via intramuscular com um intervalo de 3 dias e Glucantime® administrado por via intramuscular na dose de 100mg/Kg/dia por 25 dias.	3
VI	Animais infectados e não submetidos a tratamento.	3
VII	Animais não infectados, não submetidos a tratamento e com mesma idade e faixa de peso que os animais infectados.	3

Fonte: a autora.

Ao fim dos tratamentos, os animais foram eutanasiados para a coleta do baço. As células esplênicas de BALB/c foram obtidas de acordo com Pereira et al. (2004). Brevemente, após eutanásia, os baços foram removidos em condições assépticas e colocados (em *pools*) em tubos Falcon contendo meio RPMI 1640

contendo 1,5% de Pen/Strep sem SFB. Em seguida, a amostra foi macerada a fim de obter uma suspensão celular homogênea. Essa suspensão celular foi centrifugada para remoção dos debris, quantificada excluindo-se as hemácias e transferidas para placas de cultura de 48 poços na quantidade 1×10^6 esplenócitos/poço contendo 1 ml de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, 1% de Pen/Strep, 1% de L-glutamina 200mM, 1% de piruvato de sódio 100mM e 26,8 ml de bicarbonato de sódio a 7,5%. Em seguida, as células foram estimuladas ou re-estimuladas com 2 diferentes concentrações de PPVOi (1×10^7 e 5×10^6 TCID₅₀/ml), Concanavalina A (ConA), por 48h, 72h, 96h e 6 dias. Após os períodos de estímulos, os sobrenadantes das culturas foram coletados e congelados para quantificação das citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A com o *BD™* CBA Mouse Th1/Th2/Th17 *Cytokine* Kit, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas no BD FACSCalibur (BD Biosciences).

7 RESULTADOS

7.1 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IMAGEM *IN VIVO* NÃO-INVASIVO PARA A DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR *L. AMAZONENSIS*-iRFP EM CAMUNDONGOS BALB/c

Com a finalidade de obter uma *L. amazonensis* fluorescente na 'janela NIR', a ORF do gene *iRFP* (λ 690nm/713nm) de *Rhodopseudomonas palustres* foi clonada em um vetor de expressão de *Leishmania* e transfectada em um isolado brasileiro de referência de *L. amazonensis*. O cassete de expressão contendo o gene *iRFP* e o gene de resistência a higromicina são intercalados por regiões não-traduzidas (Utr1, Utr2 e Utr3), que flanqueiam os genes e fornecem o sinal de *splicing* para o processamento pós-transcricional do RNAm. As suas extremidades são compostas das regiões 5'ssu e 3'ssu que permite a recombinação homóloga no cromossomo da leishmania. A **figura 7A** mostra um esquema simplificado do cassete de *iRFP* e sua integração ao genoma da leishmania.

Para expressar constitutivamente a proteína *iRFP* no citosol da célula, o gene foi clonado nos sítios de clonagem 5'-Nocl e 3'-NotI do pLEXSY-Hyg2. Inicialmente, o gene foi amplificado com um par de *oligonucleotídeos* (*iRFP*-F e *iRFP*-R) gerando um produto de ~1000pb, que foi subclonado em *E. coli* usando o pDrive (vetor TA). O produto pDrive-*iRFP* foi digerido com as enzimas NotI e Nocl para liberação do gene contendo agora os sítios de restrição. **A figura 7B** mostra o resultado da digestão de pDrive-*iRFP* e a liberação do fragmento de interesse (~1000pb). Em seguida, o gene *iRFP* contendo os sítios NotI e Nocl foi clonado no sítio 5'-NotI/3'-Nocl do pLEXSY (vetor de leishmania), que foi novamente subclonado em *E. coli*. **A figura 7C** mostra o resultado de uma PCR diagnóstica realizada com alguns clones de *E.coli*-pLEXSY-*iRFP* selecionados da placa. Posteriormente, o vetor pLEXSY-*iRFP* contendo dois sítios para SwaI foi digerido com esta enzima. **A figura 7E** mostra o resultado da digestão com SwaI e a liberação do cassete de expressão de *iRFP* (~6000pb) que foi em seguida transfectado em *L. amazonensis*.

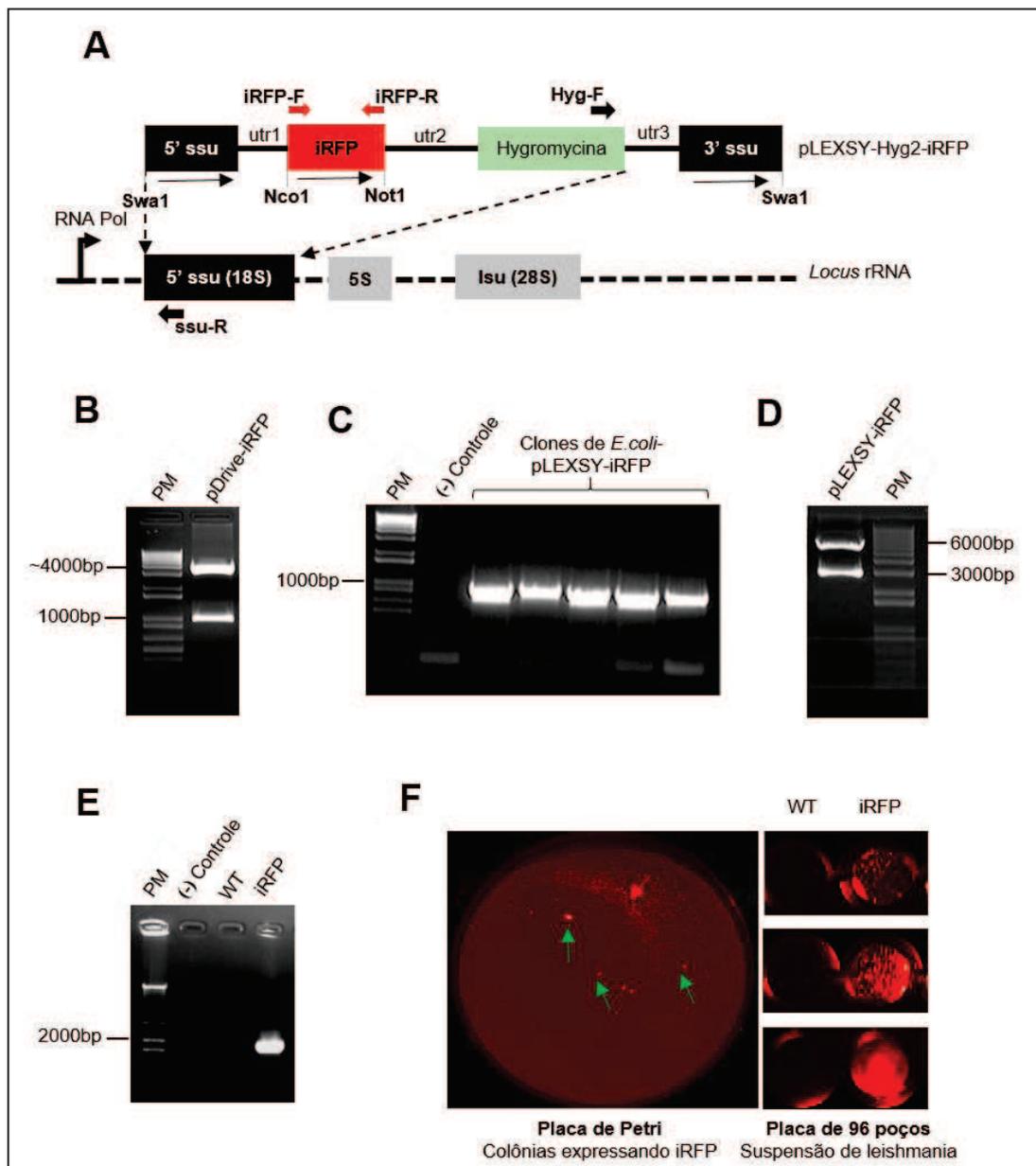
Após a seleção clonal e não clonal dos parasitas recombinantes com o antibiótico higromicina, a integração do cassete de expressão de *iRFP* no *locus* ssu da leishmania foi confirmada por *standard* PCR usando DNA genômico de *L. amazonensis*-*iRFP* e *L. amazonensis*-WT (**figura 7E**). Um produto de PCR único de

1823pb foi amplificado apenas quando DNA de *L. amazonensis*-iRFP foi usado como molde. A integração no genoma também foi confirmada por seleção fenotípica de *L. amazonensis*-iRFP, através da detecção da fluorescência emitida em cultivo em meio sólido e líquido (**figura 7F**). Na placa de Petri, a maioria das colônias recombinantes estavam pequenas demais para serem detectadas a “olho nu”, mas quando passadas no *scanner* de fluorescência, elas puderam ser facilmente detectadas em grande número. Além disso, comparando-se o crescimento das duas leishmânias em suspensão ao longo do tempo em placa de 96 poços para visualização de alguma fluorescência de *background* da leishmania selvagem, observamos que apenas os parasitas iRFP exibiram fluorescência.

Com o objetivo de estabelecer a correlação entre concentração de parasitas e intensidade de fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP, foi realizada uma diluição seriada de base 2 de uma cultura de promastigotas de *L. amazonensis*-iRFP na fase log em placa de 96 poços. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi determinada no Odyssey[®], subtraindo-se a fluorescência do *background*. Como é possível observar, as **figuras 8A e 8B** mostram uma clara correlação entre intensidade de fluorescência e concentração de promastigotas na placa. O limite mínimo de detecção foi de $2,8 \times 10^4$ parasites/ml (sem centrifugação prévia). Após a centrifugação da placa e sedimentação das promastigotas em um único plano, o limite mínimo de detecção caiu para $3,5 \times 10^3$ parasitas/ml (dado não mostrado).

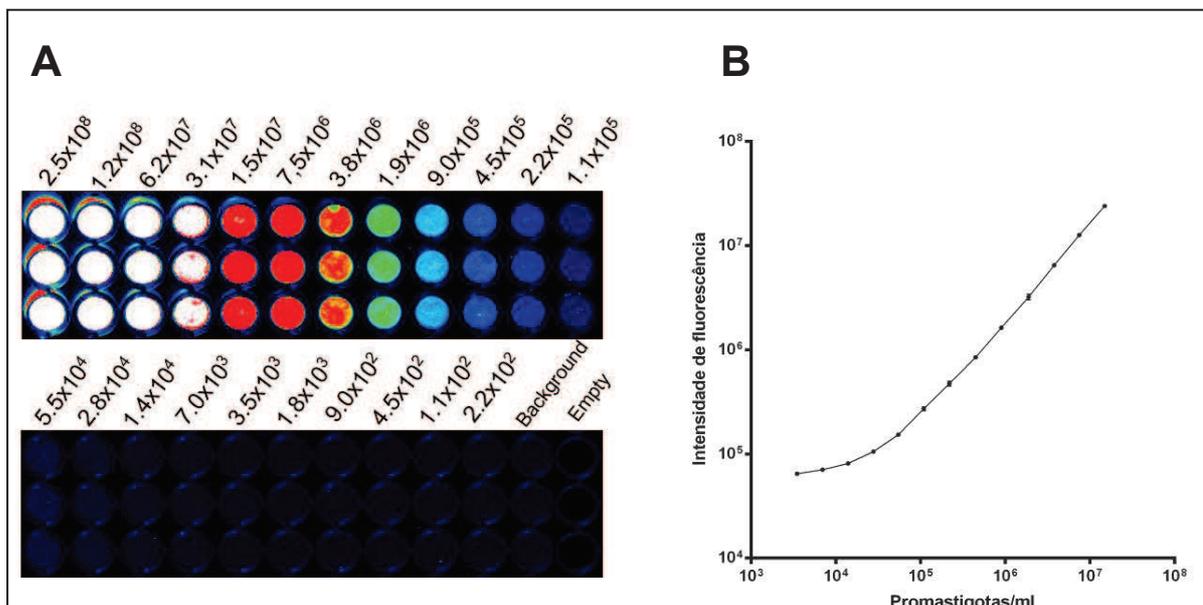
Com a finalidade de determinar se a construção gerada resultou ou não em uma possível desvantagem metabólica para *L. amazonensis*-iRFP, foi realizado uma cinética de crescimento de uma cultura axênica e acompanhamento das características morfológicas e de motilidade de ambas (iRFP e WT), através da contagem do número de parasitas na cultura ao longo do tempo e por análise de microscopia. É possível observar no gráfico da **figura 9A** uma diferença na curva de crescimento de *L. amazonensis*-iRFP em relação a *L. amazonensis*-WT. Contudo, esta diferença não se mostrou estatisticamente relevante e não trouxe nenhuma influência nas características gerais morfológicas e de motilidade de *L. amazonensis*-iRFP em cultura.

Figura 7- Estratégia de clonagem, etapas da construção de *L. amazonensis*-iRFP e *screening* fenotípico.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Esquema do cassete de *iRFP* e sua integração ao genoma no *locus* *ssu*. (B) Dupla digestão de *pDrive-iRFP* com *NotI* e *NcoI*. (C) PCR das colônias (*E. coli*_DH10B-*pLEXSY-iRFP*) com oligonucleotídeos *iRFP-F* e *iRFP-R*. (D) Digestão de *pLEXSY-iRFP* com *SwaI*. (E) Fragmento específico de 1823pb amplificado com os *oligonucleotídeos* *ssu-R* e *Hyg-F* para confirmação da integração no genoma apenas na *L. amazonensis*-*iRFP*. (F) Uso do *scanner* de fluorescência (*Odyssey*[®]) na seleção clonal das leishmânias recombinantes. *L. amazonensis*-*iRFP* e *L. amazonensis*-WT foram cultivadas em meio Schneider contendo 10% de SBF, 5µg/ml de hemina, com e sem higromicina (100µg/ml). A placa de Petri contém ágar Schneider com poucas colônias grandes (→) e várias colônias pequenas que ainda não podem ser vistas a olho nu (→), enquanto que a placa de 96 poços contém suspensão de parasitas *iRFP* e WT. Apenas os parasitas *iRFP* exibem fluorescência ao longo do tempo. PM é marcador de peso molecular 1Kb *Plus* (Invitrogen).

Figura 8- Quantificação da fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP *in vitro*.

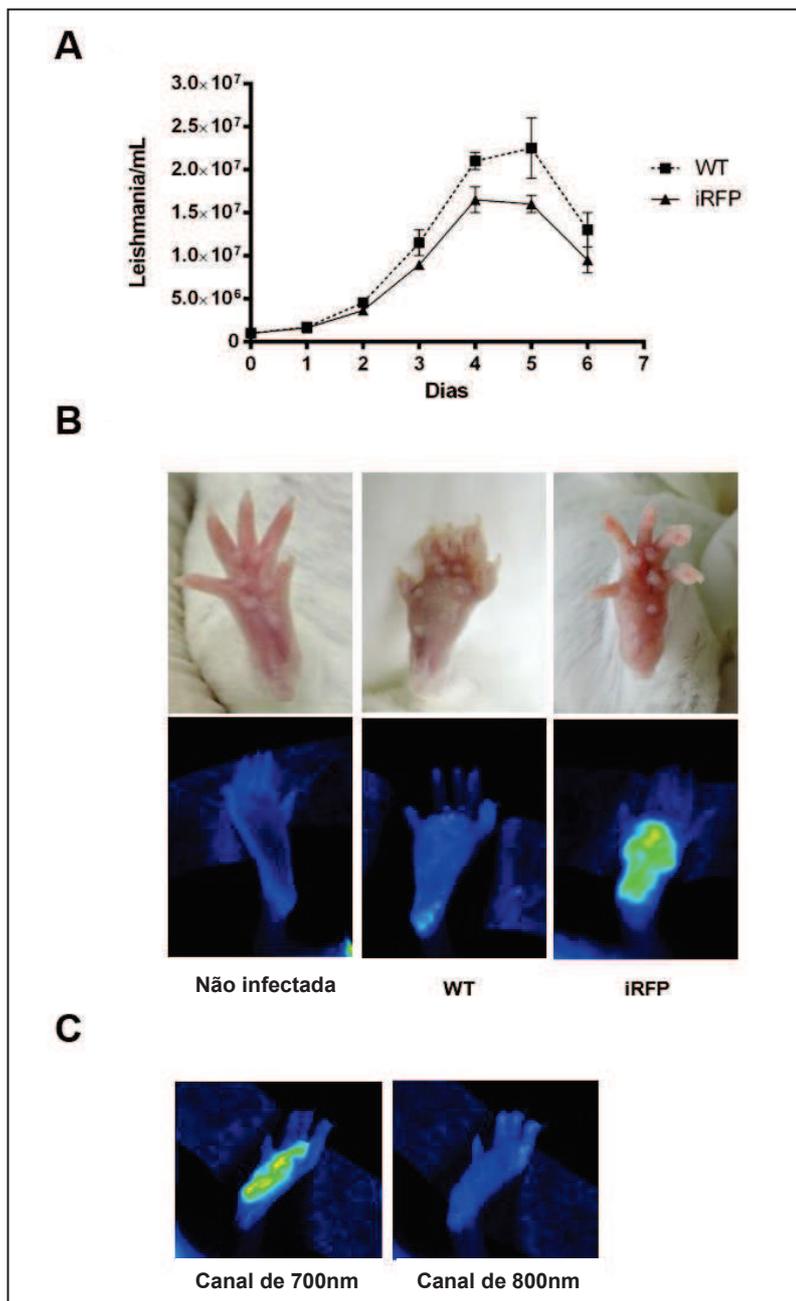
Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Quantificação de fluorescência no Odyssey[®] de uma diluição seriada de uma cultura de *L. amazonensis*-iRFP na fase *log* (parasitas/mL), em placa de 96 poços (antes da centrifugação). (B) Gráfico mostrando a relação entre concentração de *L. amazonensis*-iRFP e a intensidade de fluorescência em cada poço. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão.

Com o objetivo de avaliar a manutenção das características de patogenicidade e virulência da cepa transgênica em relação à cepa selvagem, inicialmente foi inoculado 10⁷ promastigotas de *L. amazonensis*-iRFP e WT na fase estacionária de crescimento, no dorso da pata traseira de camundongos BALB/c. É possível observar na **figura 9B**, após 40 dias da inoculação, a presença de uma lesão na pata caracterizada por um inchaço típico, tanto na pata inoculada com *L. amazonensis*-WT, quanto com a *L. amazonensis*-iRFP. Este experimento indicou que ambos parasitas (WT e iRFP) levaram ao desenvolvimento de uma lesão característica e igualmente progressiva neste modelo susceptível de infecção. A **figura 9B** também mostra o resultado da detecção de fluorescência dos dois animais, após passagem no *scanner*. Podemos observar que apenas os animais que foram infectados com *L. amazonensis*-iRFP emitiram fluorescência no *scanner* no canal de 700nm. Uma vez que o aparelho possui dois canais de fluorescência distintos, porém próximos, a especificidade da fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP para o canal de 700nm também foi avaliada *in vivo*. A **figura 9C** mostra que a

fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP é específica para o canal de 700nm, não sendo detectada no canal de 800nm.

Figure 9- Detecção de fluorescência *in vivo* e comparação das características de *L. amazonensis*-iRFP versus WT, *in vitro* e *in vivo*.



Fonte: Elaborado pela autora

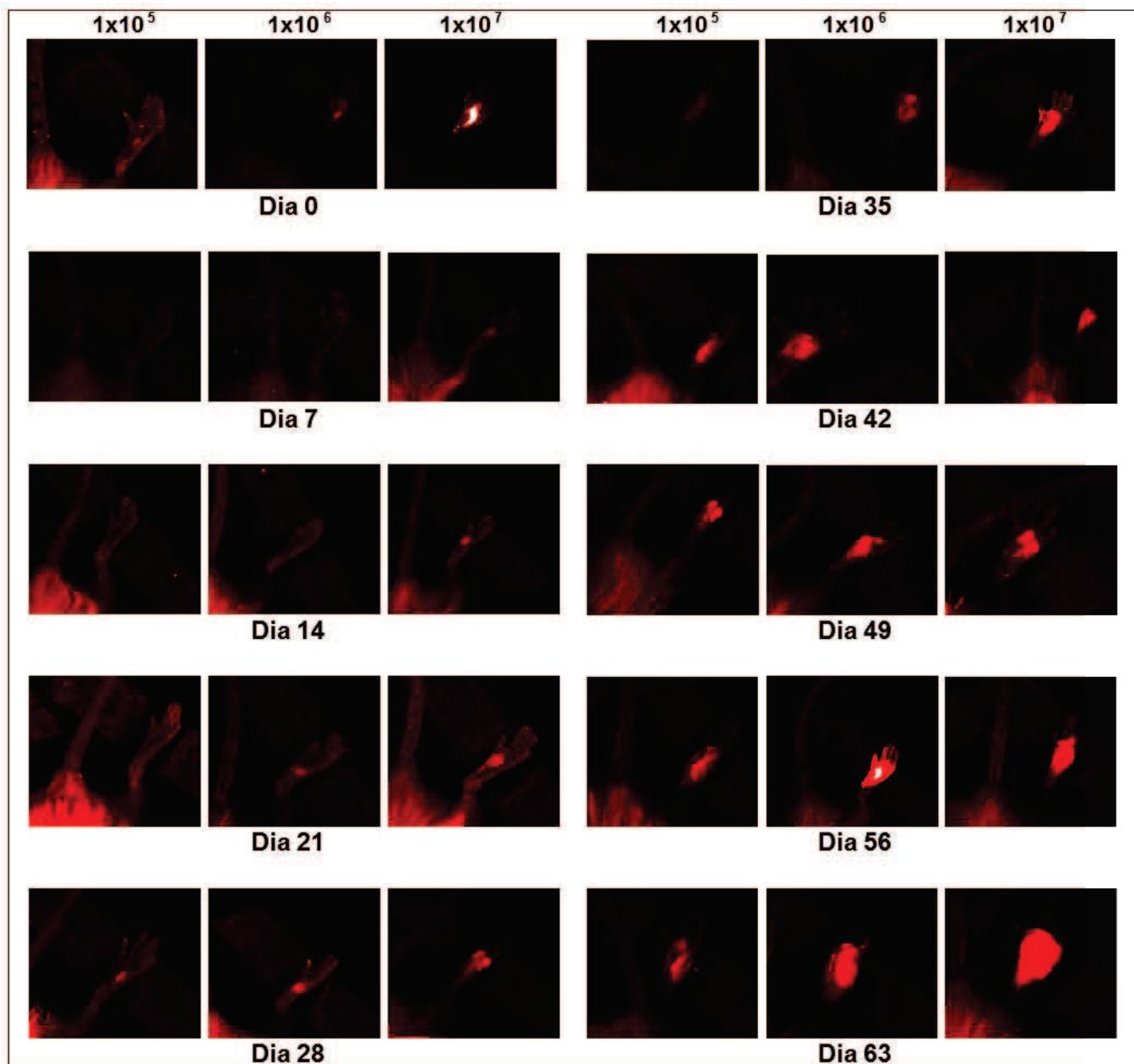
Legenda: (A) Cinética de crescimento de 7 dias. O experimento foi realizado com inóculo inicial de 10⁶ parasitas/mL na fase *log*, em duplicata. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão. A análise estatística das curvas não mostrou significância. (B) Fotografia de pata saudável e inoculadas com 10⁷ promastigotas de *L. amazonensis*-iRFP e WT após 40 dias de infecção e a detecção de fluorescência no Odyssey®. (C) Especificidade da fluorescência para o canal de 700nm (filtro *pseudocolor*).

7.2 ACOMPANHAMENTO DA LC EM BALB/C UTILIZANDO TRÊS DIFERENTES INÓCULOS DE *L. AMAZONENSIS*-IRFP

Inicialmente, para acompanhamento da leishmaniose cutânea em camundongo BALB/c e com o objetivo de investigar a sensibilidade da detecção de fluorescência *in vivo* logo após a inoculação do parasita e ao longo do tempo, três diferentes inóculos de *L. amazonensis*-iRFP (10^5 , 10^6 e 10^7 parasitas) foram inoculados em diferentes grupos de animais e acompanhados ao longo de 63 dias de infecção. É possível detectar um claro sinal de fluorescência nos animais inoculados com 10^6 e 10^7 *L. amazonensis*-iRFP, porém, não foi possível detectar sinal satisfatório nos animais inoculados com 10^5 parasitas usando a configuração *standard* (**figura 10 e 11A**). Também é possível observar na **figura 10 e 11B**, logo após a inoculação de parasitas, um forte sinal de fluorescência (Dia 0), seguido de uma diminuição do sinal (Dia 7), para só então aumentar gradativamente no decorrer das semanas, isto é, a fluorescência inicialmente diminuiu, para depois aumentar até o dia 63. Apesar da ausência inicial de um sinal de fluorescência nos animais inoculados com 10^5 parasitas, houve o desenvolvimento nestes de lesão, bem como detecção satisfatória de fluorescência com o passar do tempo.

Para determinação da carga parasitária relativa à intensidade de fluorescência, do número de parasitas/mg de tecido na lesão e do acompanhamento do tamanho da lesão com um paquímetro, foi escolhido o grupo de animais inoculados com 10^7 parasitas. Os gráficos das **figuras 11C e 11D** mostram a quantificação da fluorescência e o diâmetro das lesões em diferentes intervalos de tempo a partir do dia 28 (após o aparecimento dos sinais clínicos). Como esperado, existiu um aumento proporcional em ambos: fluorescência e diâmetro da lesão. Todos os animais foram acompanhados por pouco mais de 2 meses.

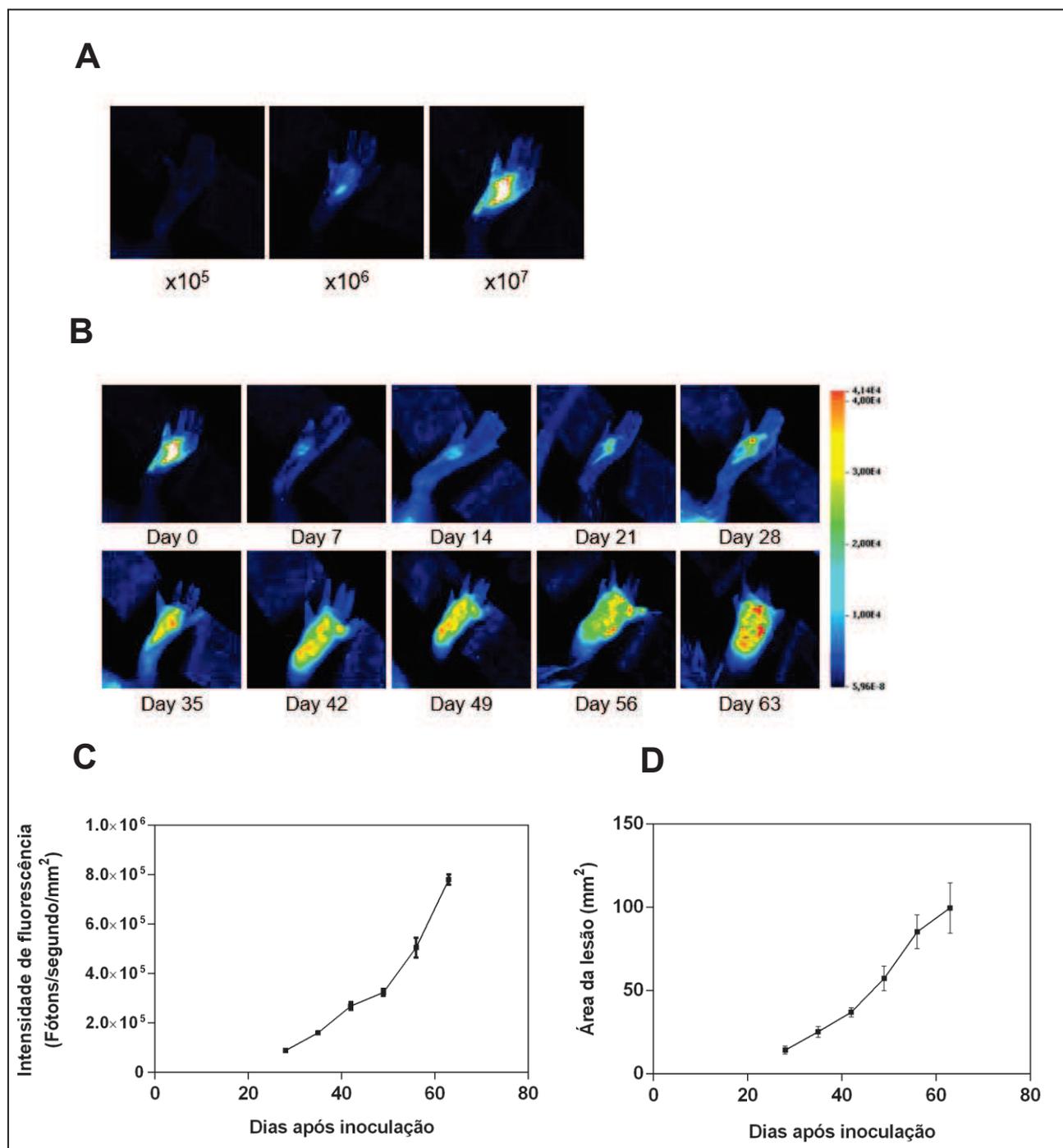
Figura 10- Progressão da infecção experimental com três diferentes inóculos de *L. amazonensis*-iRFP em camundongos BALB/c ao longo de 2 meses.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: As imagens mostram a fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP de diferentes animais inoculados com quantidades diferentes de parasitas (10^5 , 10^6 e 10^7). Quando comparamos a fluorescência detectada logo após inoculação (Dia 0), com as fluorescências detectadas nos dias 7 e 14, é possível ver que inicialmente ocorre uma diminuição da fluorescência no local do inóculo, mas que gradativamente aumenta em todos os grupos. As imagens foram obtidas semanalmente no canal de 700nm do ODYSSEY® (filtro vermelho).

Figure 11- Quantificação da intensidade de fluorescência relativa de *L. amazonensis*-iRFP (inóculo de 1×10^7 parasitas) *in vivo* ao longo do tempo.

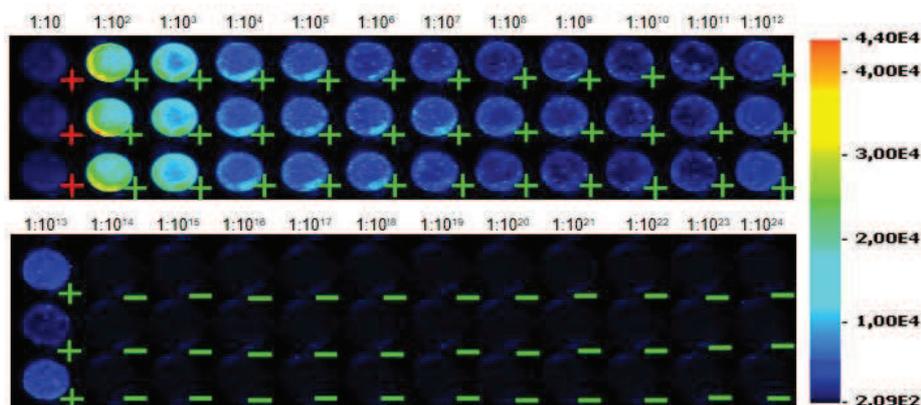


Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Detecção de fluorescência emitida por diferentes inóculos de *L. amazonensis*-iRFP (10^5 , 10^6 e 10^7), logo após a inoculação de parasitas. (B) Imagem de BALB/c inoculado com 10^7 promastigotas de *L. amazonensis*-iRFP na fase estacionária (do dia 0 ao 63). (C) Gráfico da média da intensidade de fluorescência (n=3). (D) Gráfico da média do diâmetro da lesão ao longo do curso da infecção. Barras representam o desvio padrão (n=3).

Subsequentemente, a carga parasitária (número de parasitas/mg de tecido) do grupo de animais inoculados com 10^7 parasitas, foi determinada através de ensaio de diluição limitante em placa de 96 poços. Após a determinação do título, isto é, do último poço positivo na microscopia para a presença de leishmania viáveis, as placas também foram escaneadas no Odyssey[®], com o objetivo de verificar a sensibilidade da técnica em comparação à microscopia. A **figura 12** é um exemplo do ensaio de diluição limitante realizado com fragmento de lesão e mostra a correspondência ou não dos resultados (fluorescência *versus* microscopia). Como é possível observar, todos os poços positivos na microscopia, também foram positivos quando analisados por fluorescência, confirmando a boa sensibilidade da técnica de *near-infrared fluorescence imaging*. Com relação ao resultado da carga parasitária do grupo referente à última diluição positiva ($1:10^{13}$), o número de parasitas alcançou valores de 1×10^8 parasites/mg de tecido. Os poços da placa com título inicial de 1:10 (diluição mais concentrada), ao final do período de incubação do ensaio (7 dias), apresentaram intensidade de fluorescência quase inexistente em relação às demais diluições. Ao microscópio, apesar da presença de grande quantidade de parasitas, estes não estavam viáveis.

Figura 12- Correspondência dos resultados de fluorescência e microscopia no ensaio de diluição limitante *ex vivo*.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Os sinais de mais e menos verdes (+/-) significam, respectivamente, poços positivos e negativos para a presença de leishmania detectada no microscópio óptico. Enquanto que, o sinal de mais vermelho (+) significa que o poço foi positivo na microscopia, mas não teve fluorescência detectada. Acima está uma representação de uma diluição seriada em triplicata, cujo título (último poço positivo para a presença de leishmânias viáveis) foi na ordem de $1:10^{13}$ e quantidade de parasitas/mg foi de 1×10^8 parasites/mg de tecido.

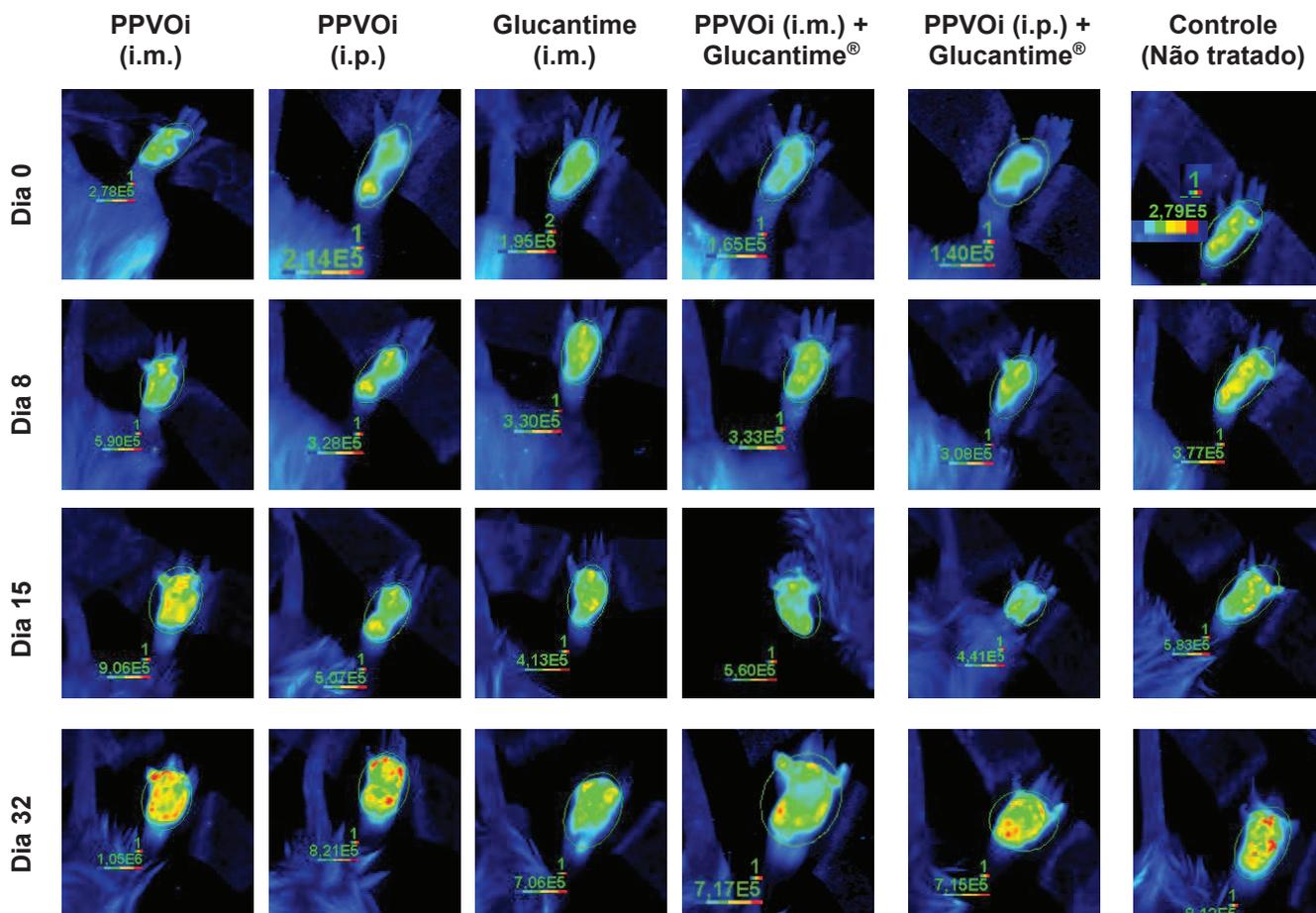
7.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA IMUNOTERAPIA COM O PPVOi EM BALB/C INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS-IRFP*

O estudo da eficácia da imunoterapia com o PPVOi sozinho ou associado à quimioterapia padrão com Glucantime[®], foi realizado em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis-iRFP*, por duas vias de inoculação diferentes: intraperitoneal (i.p.) e intramuscular (i.m.), sendo esta última administrada na coxa da perna afetada, próximo ao local da lesão. Após a divisão dos grupos, com exceção do grupo controle (animais não-infectados), todos os animais foram inoculados com 1×10^7 parasitas. O tratamento dos animais com PPVOi sozinho ou associado ao Glucantime[®], teve início 45 dias após a infecção e durou 25 dias. A avaliação da eficácia da terapia foi realizada diariamente em todos os animais dos grupos por medição da área da lesão e semanalmente por quantificação de fluorescência no Odyssey[®]. Ao final do estudo, também foi realizado o teste de diluição limitante para determinação da carga parasitária dos grupos por metodologia padrão.

A **figura 13** mostra a fluorescência da pata afetada de representantes dos diferentes grupos, antes (Dia 0) e após o início dos tratamentos (Dias 8, 15 e 32). A partir da análise da quantificação da fluorescência emitida por *L. amazonensis-iRFP* durante o período de tratamento, é possível observar que a imunoterapia com PPVOi, associado ou não à quimioterapia, inoculado por via intraperitoneal ou intramuscular, não foi eficaz para nenhum dos grupos de tratamento, quando comparado ao grupo controle (animais infectados e não tratados). A intensidade de fluorescência dos grupos no Dia 0 (antes do início dos tratamentos) apresentou uma pequena variação entre eles, mesmo que a quantidade de inóculo tenha sido “igual” para todos. Essa pequena diferença já era esperada, uma vez que a inoculação de parasitas no dorso da pata é um procedimento extremamente delicado.

Como pode ser visto nas **figuras 14A e 14B**, as intensidades de fluorescência dos diferentes grupos de tratamento aumentaram com o passar do tempo e foram maiores do que a fluorescência do grupo controle. Além disso, inesperadamente, a análise estatística dos grupos mostrou que o grupo de animais tratados apenas com PPVOi (i.m.) apresentou aumento de fluorescência estatisticamente significativo em relação ao aumento do grupo controle (** $p \leq 0.01$), isto é, para esse grupo, a terapia com o PPVOi apresentou um efeito contrário ao esperado.

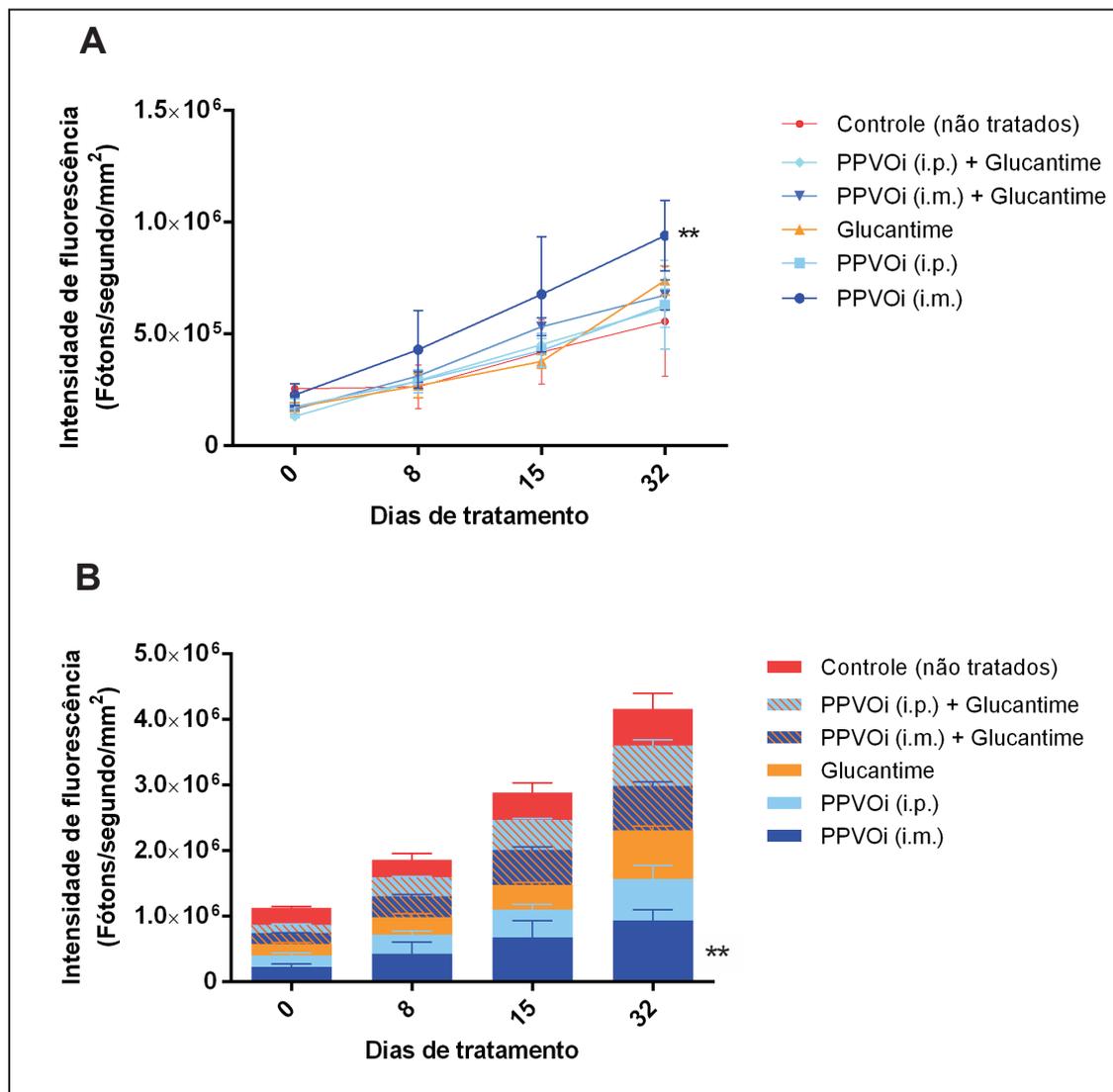
Figura 13- Avaliação da eficácia do PPVOi utilizando a técnica de *in vivo near-infrared fluorescence imaging*.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Imagens obtidas no Odyssey® após escaneamento da pata de camundongos BALB/c inoculados com *L. amazonensis*-iRFP durante o período de tratamento com PPVOi inoculado por via i.p. ou i.m., associado ou não ao Glucantime®. Todos os animais dos grupos foram escaneados para avaliação da carga parasitária, porém apenas um de cada grupo está representado aqui. As imagens foram feitas com intervalo de aproximadamente 8 dias, sendo a última feita com um intervalo de 15 dias. As imagens obtidas no Dia 0 mostram a fluorescência pouco antes do início dos tratamentos. A dosagem de PPVOi administrada nos diferentes grupos de tratamento foi de 5×10^5 TCID₅₀, em intervalos de 3 dias. Enquanto que, a administração de Glucantime® nos grupos que receberam a droga foi diária, ao longo de 25 dias. Estão indicados nas imagens os valores de fluorescência detectados, associados ao ROI (*region of interest*). Para determinação da fluorescência de *background*, a pata saudável de cada animal foi escaneada e o valores da fluorescência de *background* foi subtraído.

Figura 14- Gráficos da avaliação da eficácia do PPVOi associado ou não ao Glucantime® no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*-iRFP.



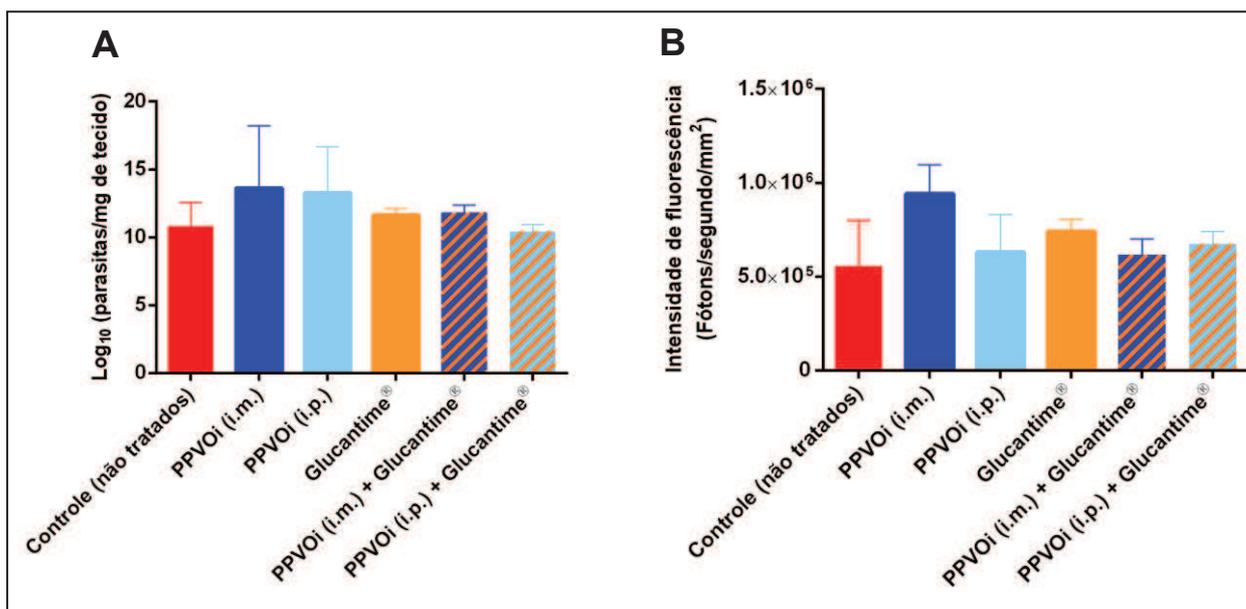
Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) O gráfico de linha e (B) gráfico de barras empilhadas mostram os valores de fluorescência (eixo y) dos diferentes grupos de tratamento, obtidos ao longo do tempo (eixo x). Em B, as barras são divididas por categorias (grupos de tratamento) e cada categoria tem sua fluorescência representada por uma área nos intervalos de tempo em questão. A dosagem de PPVOi administrada nos diferentes grupos de tratamento foi de 5×10^5 TCID₅₀, em intervalos de 3 dias. Enquanto que, a administração de Glucantime® nos grupos que receberam a droga foi diária, ao longo de 25 dias. Resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. A análise estatística foi feita por análise de variância usando One-way ANOVA e teste de Bonferroni como teste de comparação múltipla. (* $p \leq 0.05$).

Além da quantificação de fluorescência, a eficácia dos tratamentos também foi avaliada ao final do estudo por método da diluição limitante, para determinação do número de parasitas/mg de tecido. Como pode ser visto no gráfico da **figura 15A**, a quantificação da carga parasitária por ensaio de diluição limitante, mostrou que não

houve diminuição na carga parasitária dos grupos. A análise estatística dos grupos mostrou que não houve diferença entre os grupos de tratamento e o grupo controle. Por ter havido discordância entre os resultados das duas metodologias utilizadas quanto ao resultado da estimulação do PPVOi (i.m.), foi feito uma análise da intensidade de fluorescência dos grupos apenas no tempo “32 dias” (**figura 15B**), quando foi realizado o último *scanning* e apenas 1 dia antes da eutanásia e coleta de material de lesão para o ensaio de titulação, mas também foi não significativa. Porém, olhando para o desvio padrão do grupo PPVOi (**gráfico 15A**) e do grupo controle (**gráfico 13B**), fica claro que a análise (não paramétrica) foi fortemente influenciada pelo alto desvio padrão dos grupos.

Figura 15- Gráficos da determinação da carga parasitária pelo método de diluição limitante para avaliação da eficácia de PPVOi por método padrão e comparação com a detecção de fluorescência no dia 32.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: (A) Determinação da carga parasitária dos diferentes grupos de tratamento pelo método de diluição limitante em placa de 96 poços. O número de parasitas/mg de tecido é determinado ao final do estudo por processamento de um fragmento da lesão. (B) Intensidade de fluorescência dos grupos 32 após o início dos tratamentos. Resultados foram expressos pela média ± desvio padrão. A análise estatística foi feita usando um teste não paramétrico One-way ANOVA e teste de Bonferroni como teste de comparação múltipla.

7.4 ESTUDO PRELIMINAR DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS*-WT E TRATADOS COM PPVOi

Após o estudo de eficácia da partícula viral inativada, foi feito um estudo preliminar da resposta imunológica dos grupos experimentais frente ao PPVOi. Para isto, foi utilizado a metodologia de re-estimulação antigênica de células esplênicas cultivadas *in vitro* dos grupos tratados com PPVOi. Após o procedimento de eutanásia, os baços foram coletados e processados em *pool* para obtenção de uma suspensão de células esplênicas de cada grupo. As células foram então cultivadas em placas de 48 poços na presença do PPVOi por 6 dias. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi coletado em diferentes tempos (2, 3, 4 e 6 dias) e utilizado para a dosagem das seguintes citocinas: IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17.

As **figuras 16-21** mostram a cinética da expressão dessas citocinas de cada grupo experimental, estimulados ou re-estimulados com 2 concentrações de PPVOi (1×10^7 e 5×10^6 TCID₅₀/ml) e também estimulados com ConA (controle positivo interno). Para comparação dos valores, foram levados em consideração a expressão basal interna em cada de cada tempo, isto é, esplenócitos do mesmo grupo cultivados sem estímulos.

As **figuras 24-30** mostram a análise do perfil de expressão de citocinas dos grupos. A análise dos grupos “PPVOi (i.m.)”, “PPVOi (i.p.)” e “PPVOi (i.p.)+Glucantime[®]” re-estimulados com PPVOi *in vitro* (segundo estímulo), e dos grupos “infectados e não tratados” e “apenas Glucantime[®]” também estimulados com PPVOi (primeiro estímulo), foi feita com base nos resultados da expressão dessas citocinas dos animais do **grupo controle** (animais não infectados e não estimulados *in vivo*).

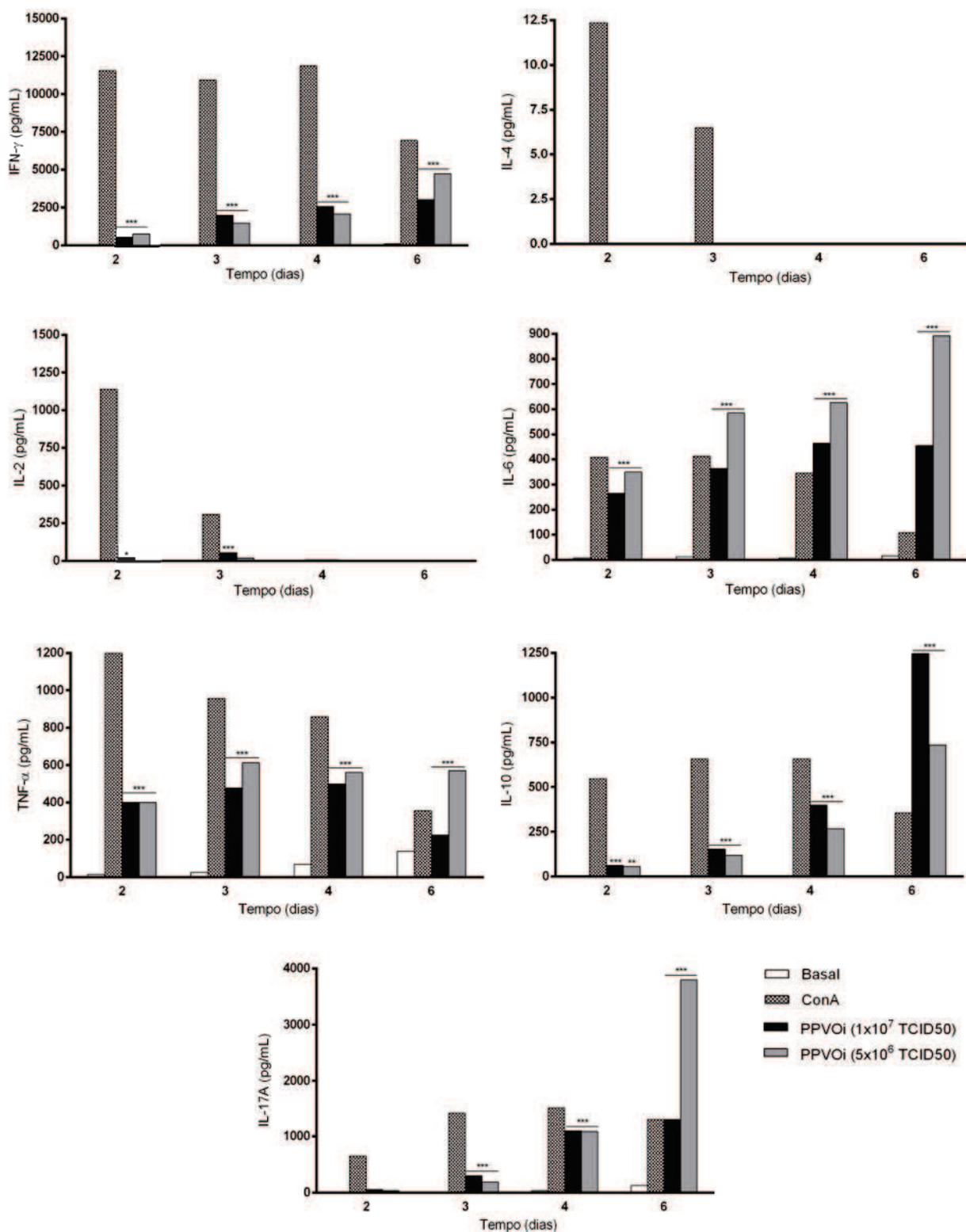
Com relação à cinética de expressão de citocinas do grupo controle (**figura 18**), foi visto que o PPVOi aumentou a expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-17A, enquanto que os níveis de expressão de IL-2 e IL-4 foram quase inexistentes, nas duas duas concentrações de vírus utilizadas, nos tempos estudados. Para este grupo, a concentração de PPVOi de 5×10^6 TCID₅₀/ml mostrou-se mais eficiente que a concentração 1×10^7 TCID₅₀/ml na indução dessas citocinas, com exceção de IL-10.

A expressão de IL-17A nos poços estimulados com PPVOi também foi significativa, apresentando seu pico de expressão no tempo de 6 dias.

Como era esperado, por não ter havido uma estimulação prévia de PPVOi, o perfil da cinética de expressão de citocinas do grupo de animais infectados e não tratados (**gráfico 19**) e do grupo de animais tratados apenas com glucantime® (**gráfico 120**) é semelhante ao perfil de expressão do grupo controle. Porém, é possível observar que os valores de IFN- γ e TNF- α , do grupo de animais tratado apenas com glucantime®, mesmo não havendo estimulação antigênica prévia, mostraram-se aumentados em relação ao grupo controle (**figura 18**). Igualmente, não houve estimulação na produção de IL-2 e IL-4 nesses grupos.

Com relação à cinética da expressão de citocinas dos grupos de animais que receberam PPVOi *in vivo* (“PPVOi i.m.”, “PPVOi i.p.” e “PPVOi i.p.+Glucantime®”) pode-se observar a partir da análise das **figuras 21, 22 e 23**, que a terapia com PPVOi influenciou fortemente a expressão de todas as citocinas, tanto as do perfil Th1, quanto as do perfil Th2 e Th17, quando comparados ao grupo controle (**figura 18**). Diferentemente dos grupos de animais não estimulados com PPVOi, houve aumento significativo nos níveis de expressão absolutos de IL-2, IL-4 e IL-10 desses grupos. Porém, também é possível observar que, especialmente para IL4 e IL-10, a expressão basal desses grupos, isto é, esplenócitos sem qualquer estímulo na placa, também foi bastante elevada. Além disso, para a IL-4, foi visto que apesar do aumento dessa citocina nesses grupos, este aumento foi fortemente inibido com o passar do tempo pela presença de ConA e de PPVOi na placa. Quando comparamos as duas vias de administração do PPVOi utilizadas neste estudo (intraperitoneal e intramuscular), é possível observar que houve uma maior estimulação na produção de IFN- γ , IL-10 e IL-17A do grupo tratado por via intraperitoneal, em relação ao grupo tratado por via intramuscular.

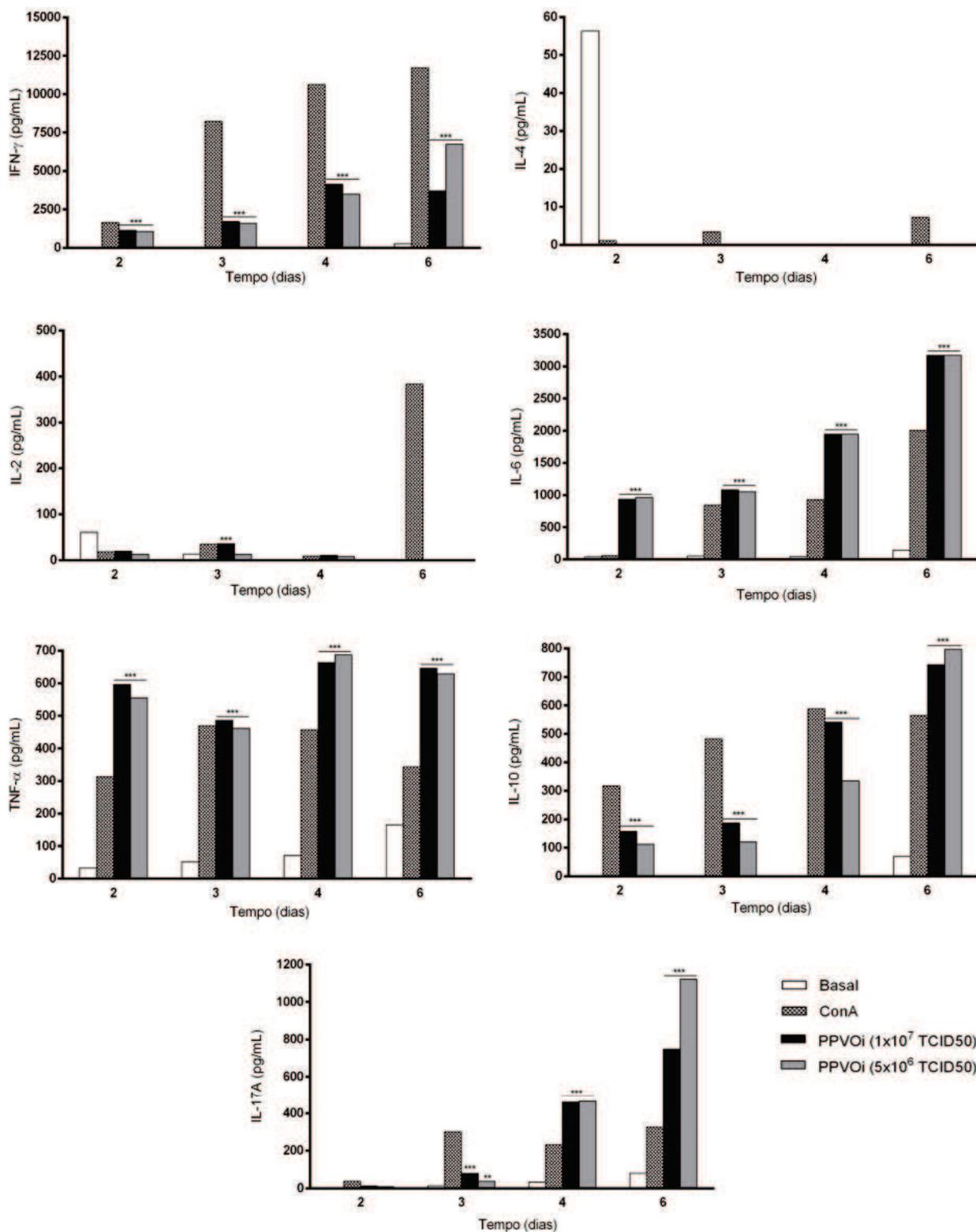
Figura 16- Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com PPVOi: “Animais não-infectados e não tratados (grupo controle)”



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por *one-way analysis of variance* (ANOVA) baseado nos valores da mediana da intensidade de fluorescência (IMF) do teste. Teste de Bonferroni foi usado para determinar a diferença entre os poços estimulados e não estimulados. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

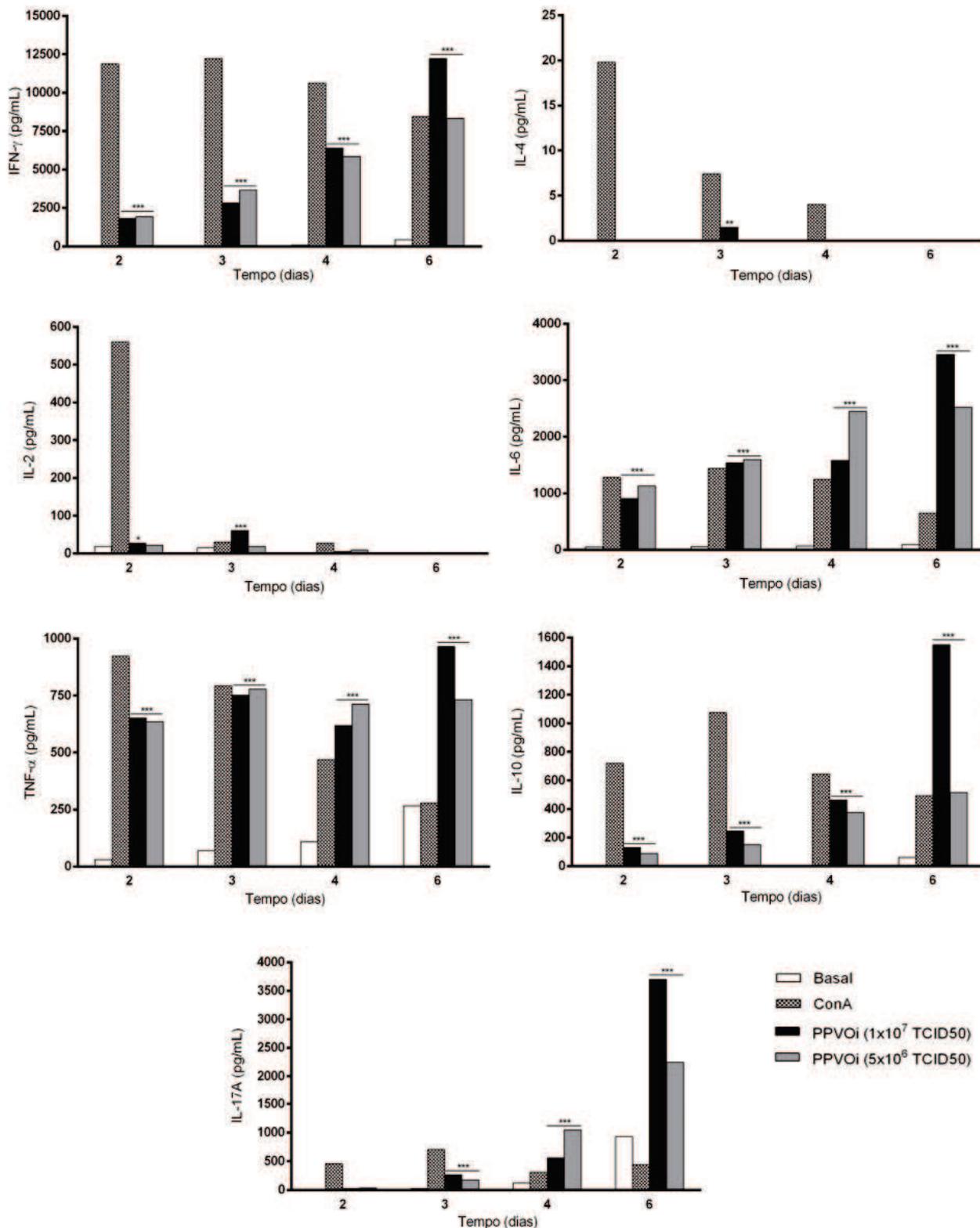
Figura 17- Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com PPVOi: “Animais infectados e não tratados”.



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por *one-way analysis of variance* (ANOVA) baseado nos valores da mediana da intensidade de fluorescência (IMF) do teste. Teste de Bonferroni foi usado para determinar a diferença entre os poços estimulados e não estimulados. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

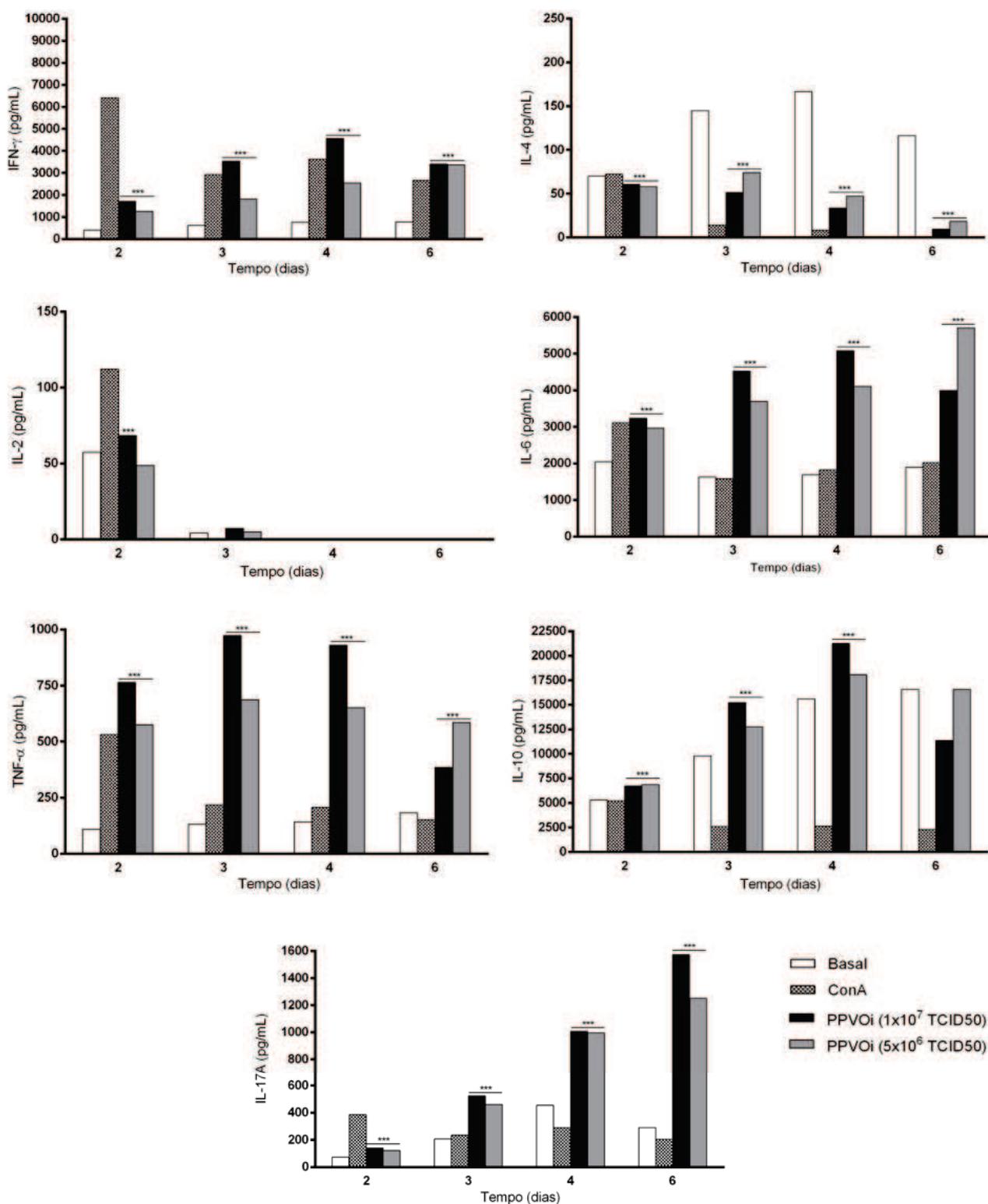
Figura 18- Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com PPVOi: “Animais infectados e tratados com Glucantime®”



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por *one-way analysis of variance* (ANOVA) baseado nos valores da mediana da intensidade de fluorescência (IMF) do teste. Teste de Bonferroni foi usado para determinar a diferença entre os grupos. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

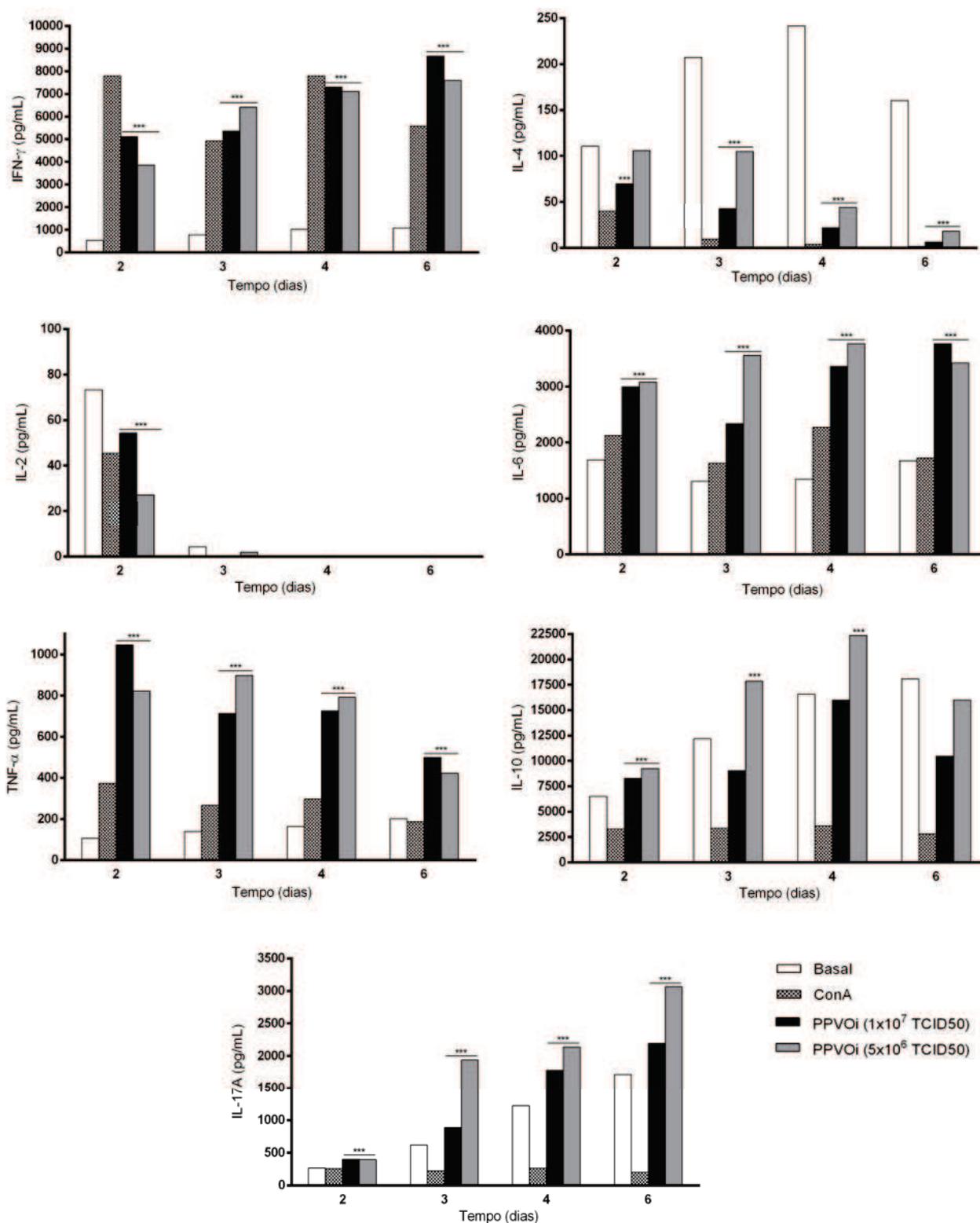
Figura 19- Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos re-estimulados com PPVOi: “Animais infectados e tratados com PPVOi via i.m”.



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por *one-way analysis of variance* (ANOVA) baseado nos valores da mediana da intensidade de fluorescência (IMF) do teste. Teste de Bonferroni foi usado para determinar a diferença entre os grupos. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

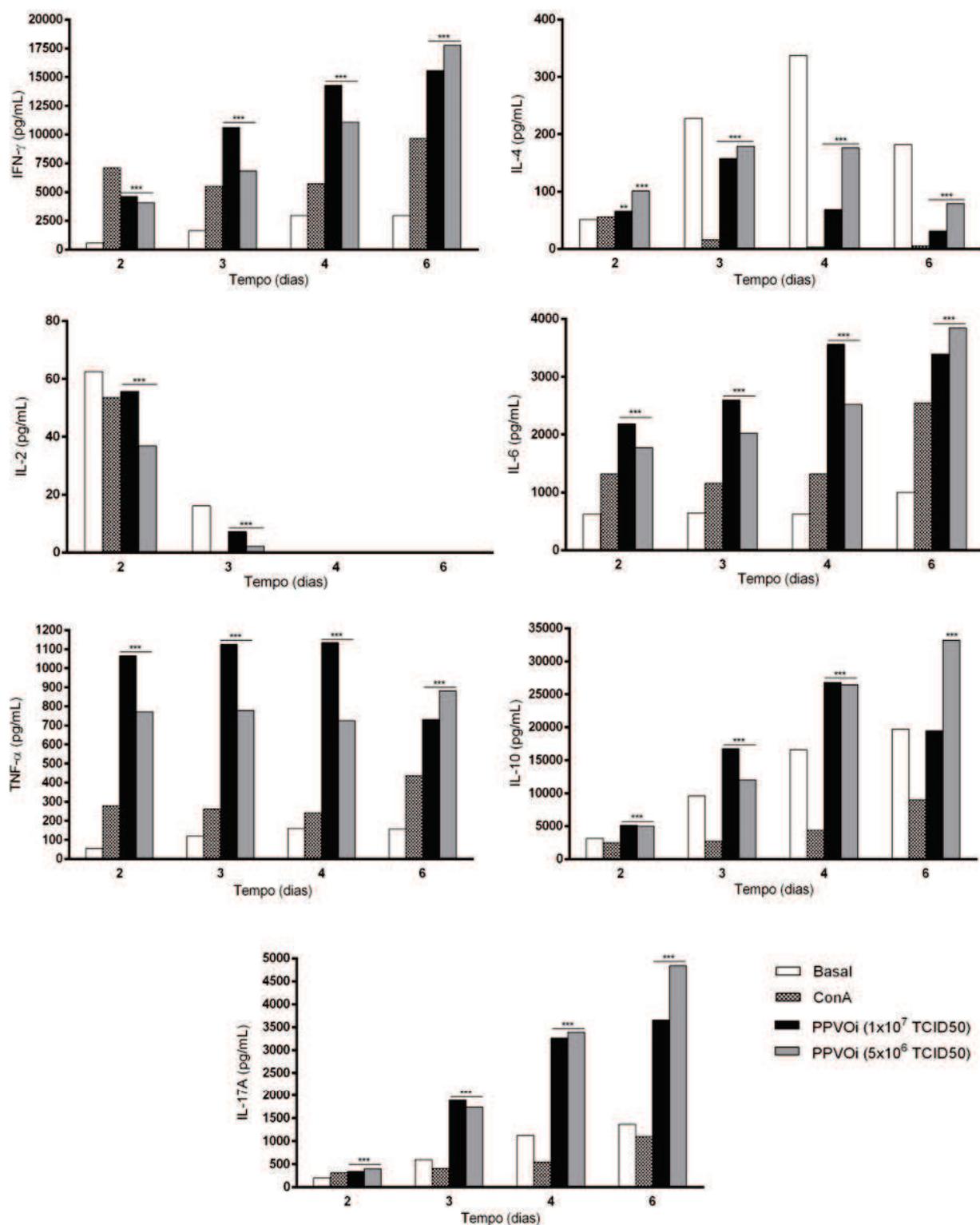
Figura 20- Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos re-estimulados com PPVOi: “Animais infectados e tratados com PPVOi via i.p.”



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Resultados foram expressos pela média ± desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por *one-way analysis of variance* (ANOVA) baseado nos valores da mediana da intensidade de fluorescência (IMF) do teste. Teste de Bonferroni foi usado para determinar a diferença entre os grupos. (** = p ≤ 0.01; *** = p ≤ 0.001).

Figura 21- Gráficos da dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos re-estimulados (*ex vivo*) com PPVOi: “Animais infectados e tratados com PPVOi i.p. e Glucantime®”



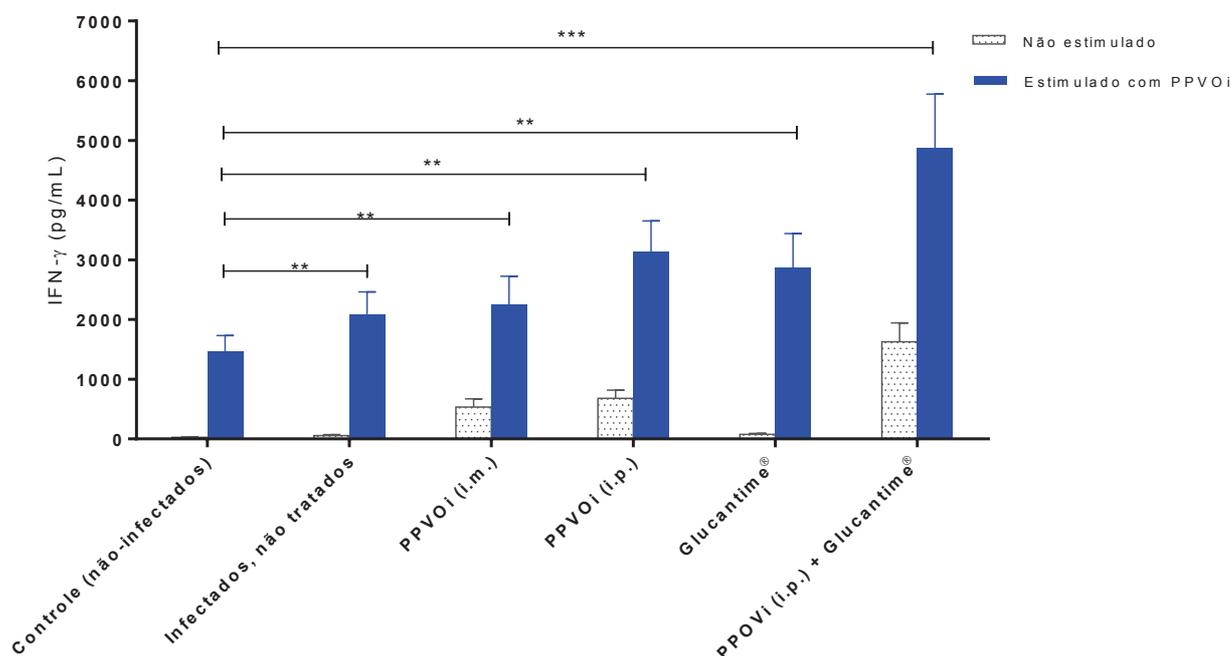
Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por *one-way analysis of variance* (ANOVA) baseado nos valores da mediana da intensidade de fluorescência (IMF) do teste. Teste de Bonferroni foi usado para determinar a diferença entre os grupos. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

Para uma melhor compreensão dos perfis de expressão das citocinas de cada grupo experimental, foi feita uma avaliação individual nos níveis absolutos de cada citocina, isto é, levando-se em consideração os níveis do grupo controle igualmente estimulados com PPVOi. A comparação dos grupos foi realizada separadamente para cada citocina, escolhendo-se o tempo (2, 4, 6 ou 8 dias) em que houve os melhores níveis de expressão da citocina em questão e apenas uma concentração viral (1×10^7 TCID₅₀/ml) (**figuras 21-27**).

Abaixo estão os níveis de expressão absoluta de INF- γ nos diferentes grupos juntamente com a estimulação basal da citocina. Este ponto reflete os níveis de expressão após seis dias de estímulo com PPVOi. Podemos observar que o PPVOi foi capaz de estimular a expressão do INF- γ em níveis significativos em todos os grupos, quando comparados ao grupo controle.

Figura 22- Dosagem de INF- γ após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.

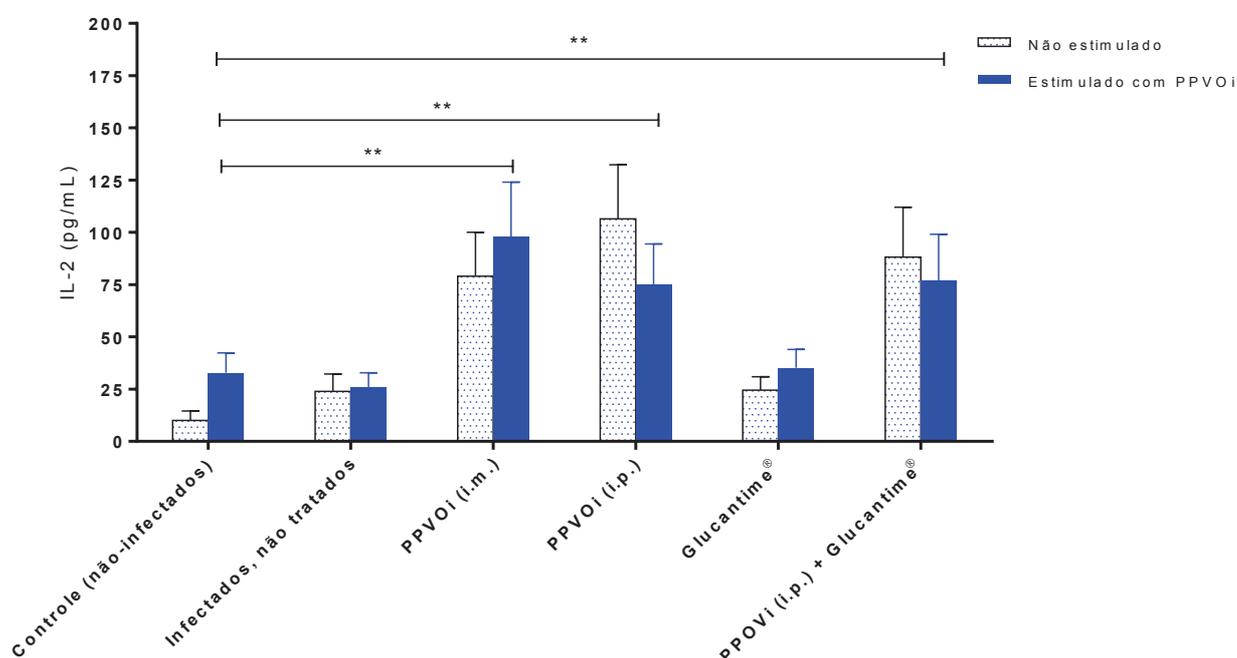


Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Células esplênicas foram obtidas de macerado de pool de baços dos diferentes grupos de tratamento e, em seguida, foram estimuladas *in vitro* por até 6 dias com PPVOi. Para comparação dos grupos, foram levados em consideração os valores de INF- γ dos poços estimulados com PPVOi na concentração de 1×10^7 TCID₅₀/ml no tempo “4 dias”. A dosagem da citocina foi realizada no sobrenadante da cultura usando o kit *BD™ CBA mouse* e análise de citometria de fluxo. Os grupos foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

A expressão da IL-2, representada na **figura 22**, mostra que o estímulo com o PPVOi foi capaz de aumentar significativamente os níveis desta citocina para os grupos estimulados *in vivo*, em relação a estimulação com PPVOi do grupo controle. A expressão de IL-2 basal desses grupos também está bastante aumentada. Quando comparados aos seus respectivos níveis de expressão basal.

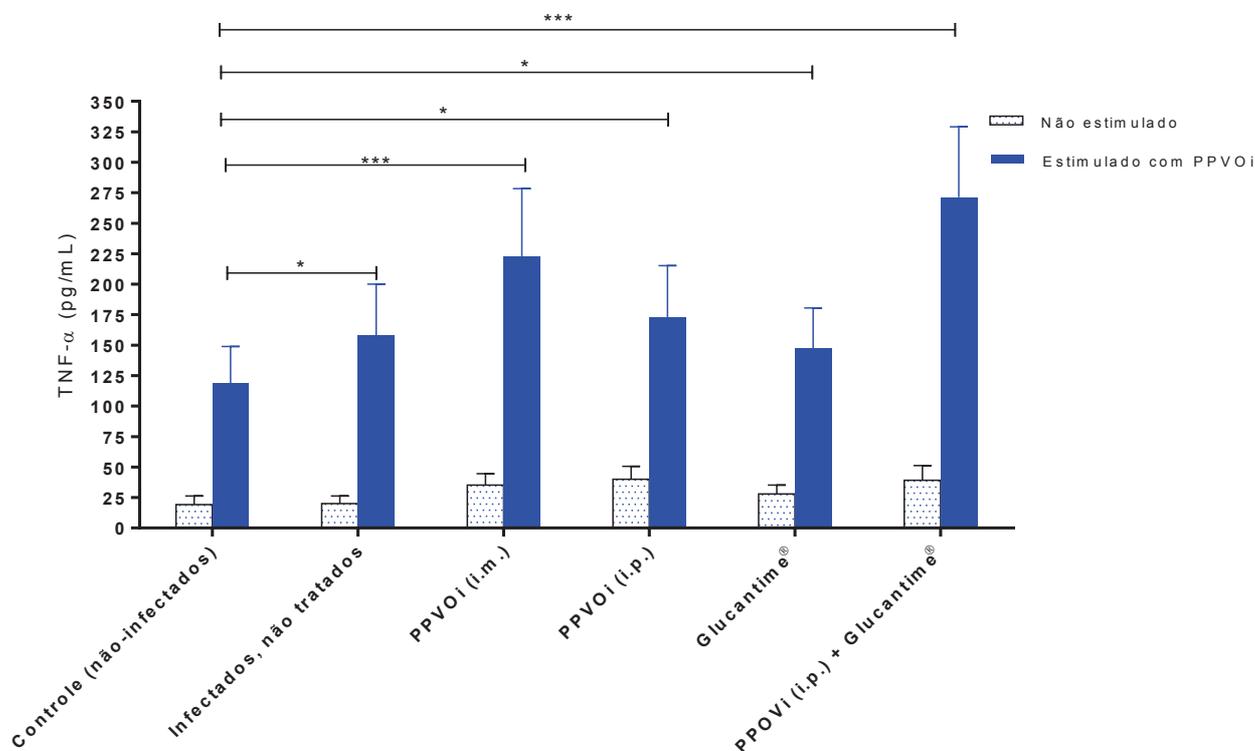
Figura 23- Dosagem de IL-2 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Células esplênicas foram obtidas de macerado de pool de baços dos diferentes grupos de tratamento e, em seguida, foram estimuladas *in vitro* por até 6 dias com PPVOi. Para comparação dos grupos, foram levados em consideração os valores de IL-2 dos poços estimulados com PPVOi na concentração de 1×10^7 TCID₅₀/ml no tempo "2 dias". A dosagem da citocina foi realizada no sobrenadante da cultura usando o kit *BD™ CBA mouse* e análise de citometria de fluxo. Os grupos foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

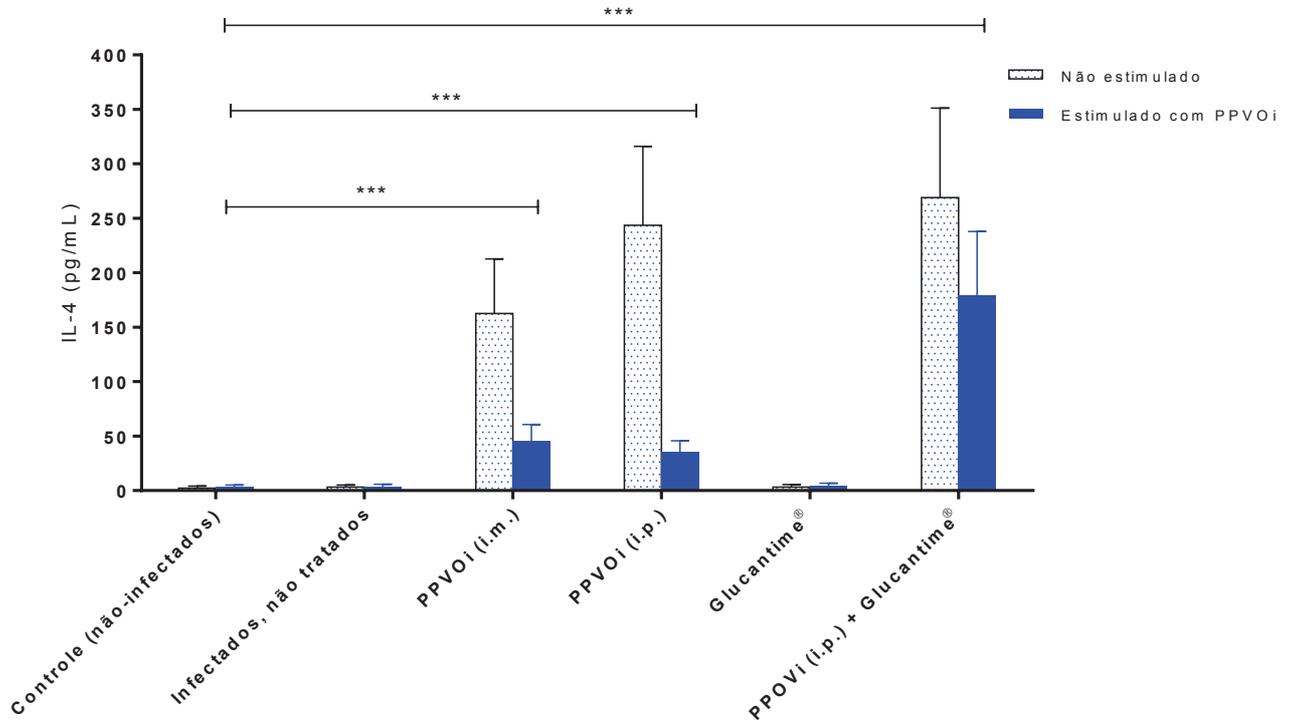
Outra citocina de perfil Th1, o TNF- α , apresentou seu pico máximo de expressão após 4 dias de estímulo com PPVOi. O gráfico abaixo mostra que o estímulo viral elevou os níveis de expressão do TNF- α em todos os grupos testados e que os maiores níveis foram detectados nos grupos que foram estimulados *in vivo*.

Figura 24- Dosagem de TNF- α após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Células esplênicas foram obtidas de maceração de pool de baços dos diferentes grupos de tratamento e, em seguida, foram estimuladas *in vitro* por até 6 dias com PPVOi. Para comparação dos grupos, foram levados em consideração os valores de TNF- α dos poços estimulados com PPVOi na concentração de 1×10^7 TCID₅₀/ml no tempo “4 dias”. A dosagem da citocina foi realizada no sobrenadante da cultura usando o kit *BD™ CBA mouse* e análise de citometria de fluxo. Os grupos foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

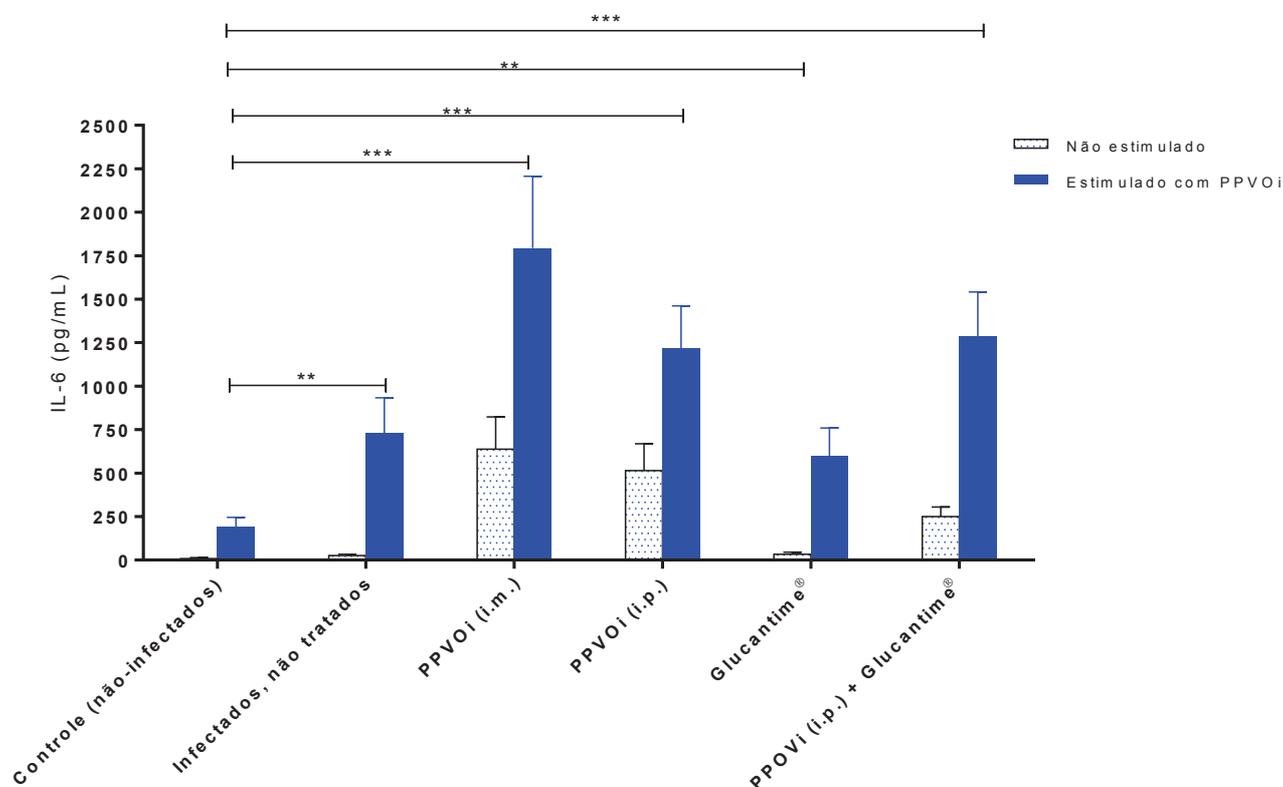
Dentre as citocinas de perfil Th2, foram quantificados os níveis de IL-4, IL-6 e IL-10. Assim como observado nos níveis das citocinas dos grupos estimulados com PPVOi *in vivo*, os grupos “PPVOi (i.m.)”, “PPVOi (i.p)” e “PPVOi+Glucantime®”, também apresentaram um aumento no perfil destas citocinas quando comparados ao grupo controle. Este fato é observado com IL-4, porém, quando observamos a estimulação basal de cada grupo, vemos que os níveis de IL-4 dos grupos tratados com PPVOi *in vivo* estão diminuídos em relação ao basal (**figura 24**).

Figura 25- Dosagem de IL-4 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Células esplênicas foram obtidas de macerado de pool de baços dos diferentes grupos de tratamento e, em seguida, foram estimuladas *in vitro* por até 6 dias com PPVOi. Para comparação dos grupos, foram levados em consideração os valores de IL-4 dos poços estimulados com PPVOi na concentração de 1×10^7 TCID₅₀/ml no tempo "3 dias". A dosagem da citocina foi realizada no sobrenadante da cultura usando o kit *BD™ CBA mouse* e análise de citometria de fluxo. Os grupos foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

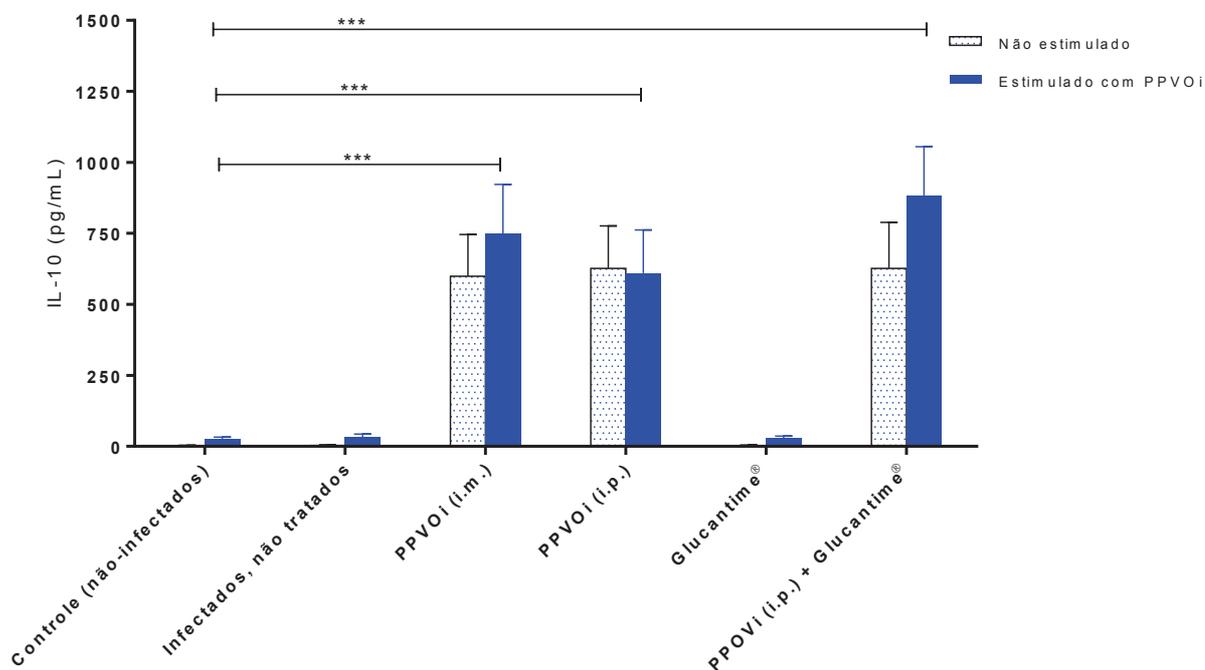
A figura abaixo mostra a expressão de IL-6. Como observado, houve estimulação na produção de IL-6 em todos os grupos testados. Aqui a expressão também foi maior nos grupos estimulados com PPVOi *in vivo*. Também, nestes grupos, a expressão basal de IL-6 no tempo estudado estava aumentada em relação aos grupos não-estimulados.

Figura 26- Dosagem de IL-6 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Células esplênicas foram obtidas de macerado de pool de baços dos diferentes grupos de tratamento e, em seguida, foram estimuladas *in vitro* por até 6 dias com PPVOi. Para comparação dos grupos, foram levados em consideração os valores de IL-6 dos poços estimulados com PPVOi na concentração de 1×10^7 TCID₅₀/ml no tempo “4 dias”. A dosagem da citocina foi realizada no sobrenadante da cultura usando o kit *BD™ CBA mouse* e análise de citometria de fluxo. Os grupos foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

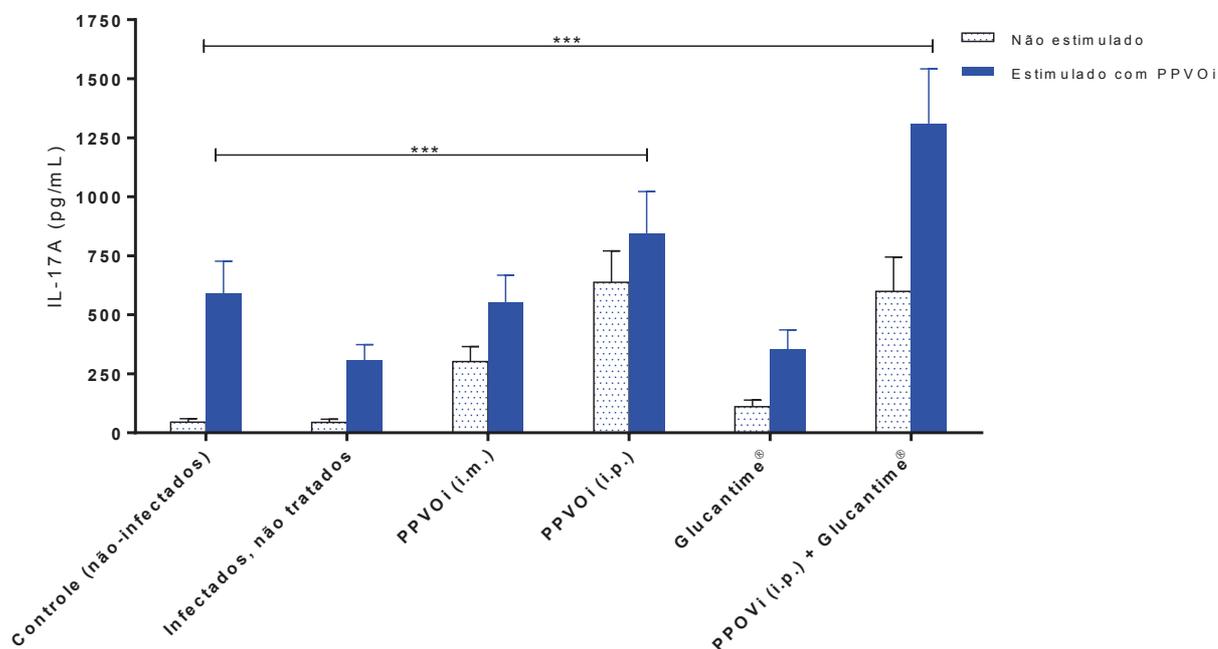
A **figura 27** mostra a expressão de IL-10 após 4 dias de estímulo *in vitro* com PPVOi. Também aqui, os níveis de expressão de IL-10 foram maiores nos grupos “PPVOi (i.m.)”, “PPVOi (i.p)” e “PPVOi + Glucantime®”, apresentando níveis significativamente mais elevados do que o grupo controle.

Figura 27- Dosagem de IL-10 após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Células esplênicas foram obtidas de macerado de pool de baços dos diferentes grupos de tratamento e, em seguida, foram estimuladas *in vitro* por até 6 dias com PPVOi. Para comparação dos grupos, foram levados em consideração os valores de IL-10 dos poços estimulados com PPVOi na concentração de 1×10^7 TCID₅₀/ml no tempo “4 dias”. A dosagem da citocina foi realizada no sobrenadante da cultura usando o kit *BD™ CBA mouse* e análise de citometria de fluxo. Os grupos foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

Com relação ao perfil da citocina IL-17, é possível observar que houve a expressão da citocina em todos os grupos estudados e que esta expressão estava aumentado com relação aos controles basais. No entanto, apenas os grupos “PPVOi (i.p.)” e “PPVOi+Glucantime®” tiveram sua expressão aumentada em relação ao grupo de tratamento controle. Os grupos tratados *in vivo* com a partícula viral inativada, apresentaram níveis de expressão maiores quando re-estimulados, do que o grupo não tratado e tratado apenas com Glucantime®. Também, os níveis basais desta citocina nesses grupos também estavam aumentados.

Figura 28- Dosagem de IL-17A após estimulação ou re-estimulação de células esplênicas com PPVOi.

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Células esplênicas foram obtidas de macerado de pool de baços dos diferentes grupos de tratamento e, em seguida, foram estimuladas *in vitro* por até 6 dias com PPVOi. Para comparação dos grupos, foram levados em consideração os valores de IL-17A dos poços estimulados com PPVOi na concentração de 1×10^7 TCID₅₀/ml no tempo "6 dias". A dosagem da citocina foi realizada no sobrenadante da cultura usando o kit *BD™ CBA mouse* e análise de citometria de fluxo. Os grupos foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. (** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

8 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a eficácia de um imunomodulador, o PPVOi, no tratamento da leishmaniose cutânea experimental. Como foi mencionado, o PPVOi vem sendo utilizado com sucesso, como imunoestimulante inespecífico no tratamento e prevenção de doenças em animais de interesse veterinário. Além disso, a eficácia do vírus também vem sendo testada e confirmada, experimentalmente, no tratamento de várias doenças de origem humana. Apesar dos mecanismos de ação do vírus não estarem completamente elucidados, sabe-se que a característica mais forte dele é a indução de uma potente resposta do tipo Th1. O conhecimento de que uma resposta Th1 eficaz é essencial para o controle da leishmaniose cutânea em humanos e em modelo murino, abre portas para a utilização do PPVOi no tratamento desta doença. Para isso, foi escolhido um modelo bastante susceptível à infecção: o camundongo BALB/c infectado com *L. amazonensis* na pata.

O BALB/c infectado com *L. amazonensis* é considerado um excelente modelo para estudo da leishmaniose cutânea, principalmente pelo fato de ser, ao contrário do C57BL/6, bastante susceptível ao desenvolvimento da doença por apresentar, entre outras características, uma deficiência na resposta Th1 favorecendo o estabelecimento da infecção. Além disso, *L. amazonensis* é uma espécie de fácil crescimento em laboratório e também estabelece infecção progressiva no tempo no modelo em questão (SOUSA et al., 2014; MATO-GUEDES et al., 2014; TRINCONI et al., 2016).

Inicialmente, após a análise de estudos de imagens para a detecção *in vivo* de espécies de leishmania, também foi idealizado e realizado neste projeto o desenvolvimento de um método de imagem *in vivo* não-invasivo e eficaz, baseado na tecnologia de *near-infrared fluorescence imaging*, para observação da eficácia do PPVOi no tratamento da LC. De todas as modalidades de imagem *in vivo* de pequenos animais, baseadas na detecção de fluorescência ou bioluminescência, a técnica de *near-infrared fluorescence imaging* apresenta algumas vantagens importantes sobre as demais. Entre as proteínas NIR existentes e testadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, a proteína iRFP foi escolhida para a realização desse trabalho por apresentar características de brilho e foto-estabilidade superiores às demais (FILINOV et al., 2011).

A utilização de proteínas repórteres NIR já tinha sido testada com sucesso, usando o mesmo *scanner* de fluorescência utilizado para realização desse trabalho, para detecção de fluorescência *in vitro* de uma *L. tarentolae*, frequentemente utilizada como sistema eucarioto de expressão de genes heterólogos (DORTAY et al. 2010). Isso nos deu uma maior confiança para aplicação da técnica usando *L. amazonensis*. Além da aplicação da técnica utilizando a espécie *L. tarentolae*, recentemente, a técnica de *near-infrared fluorescence imaging* também foi utilizada para detecção *in vitro* e *in vivo* de uma *L. infantum*-iRFP no acompanhamento da leishmaniose visceral experimental (CALVO-ALVARÉZ et al., 2015).

Os resultados obtidos através da detecção de fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP *in vitro* na ordem de $3,5 \times 10^3$ parasitas/ml (após centrifugação) mostra uma boa sensibilidade da técnica e seu potencial para ser aplicada em ensaios *high-throughput screening* (HTS) para avaliação de drogas anti-leishmania. A diferença observada na curva de crescimento de *L. amazonensis*-iRFP comparada à cepa WT, embora não significativa, é explicado pelo fato de que para cada cassete de expressão integrado no genoma da leishmania, ocorre a inativação de um sítio *ssu* no genoma da leishmania. Contudo, como o *locus ssu* está presente em múltiplas cópias por genoma, sua inativação não influencia de maneira significativa a fisiologia do organismo.

Os resultados do acompanhamento da intensidade de fluorescência detectada *in vivo* e do tamanho da lesão causada por *L. amazonensis*-iRFP mostraram uma relação direta entre tamanho e intensidade de fluorescência. O acompanhamento da medida da área da lesão em modelos de LC é uma prática incorporada nos estudos de eficácia de avaliação de compostos anti-leishmania. Contudo, apesar de ser utilizado como medida indireta de avaliação da carga parasitária, a medida do tamanho da lesão por si só, pode não ser proporcional à carga parasitária, principalmente em modelos de infecção, onde os parasitas são inoculados na pata, como é o caso do BALB/c infectado com *L. amazonensis*, em que o tamanho da lesão é resultado não apenas da multiplicação local de parasitas, mas também de um processo inflamatório progressivo que se instala e que não regride espontaneamente para a cura, mesmo quando é observado a diminuição da carga parasitária.

Com relação a sensibilidade de fluorescência *in vivo* de apenas 10^5 parasitas, avaliada logo após inoculação dos parasitas nas patas, esta sensibilidade pode ser

melhorada ajustando-se os parâmetros do *scanner*, tais como intensidade do laser e *foccus off-set* (profundidade de penetração do laser).

Após a infecção *in vivo*, ocorreu inicialmente uma diminuição da fluorescência emitida nas primeiras semanas após a inoculação dos parasitas. É sabido que apenas as formas promastigotas metacíclicas de leishmania têm capacidade de estabelecer infecção no interior de macrófagos *in vivo*. O simples cultivo axênico de promastigotas de leishmania, não pode garantir que todas as leishmânias atinjam a forma metacíclica (infectiva) na fase estacionária de crescimento. Portanto, essa diminuição inicial da fluorescência ocorreu, provavelmente, porque de fato, são poucas as leishmânias verdadeiramente metacíclicas presentes numa cultura na fase estacionária de crescimento (utilizada para a infecção dos animais deste trabalho). Independente disso, ocorreu o estabelecimento e progressão da doença no modelo estudado.

O ensaio de diluição limitante é um método padrão útil e ainda necessário para avaliação da carga parasitária (*ex vivo*) em modelos de LC, principalmente porque lesões fracamente parasitadas podem passar despercebidas nos métodos de imagens. Por outro lado, o risco de contaminação das culturas no ensaio de diluição limitante, seja por manipulação inadequada ou por bactérias presentes na lesão, impossibilita a análise e qualquer conclusão sobre o estudo em questão. Neste sentido, a quantificação relativa de fluorescência de *L. amazonensis*-iRFP *in vivo* é uma ferramenta extremamente útil e uma medida direta para o acompanhamento da carga parasitária e também para avaliação precoce da eficácia de drogas anti-leishmania em modelo murino.

Com relação aos resultados do estudo de eficácia da terapia da leishmaniose cutânea com o PPVOi, foi visto que a terapia isoladamente ou associada ao Glucantime®, por diferentes vias, não foi eficaz no tratamento da doença em BALB/c, fato visto tanto pelo método de diluição limitante, quanto pelo método de imagem. Além disso, o grupo de animais tratados com PPVOi por via intramuscular próximo apresentou um desenvolvimento maior e significativo da lesão em relação ao grupo controle. Isto pode ter sido ao fato de que a injeção de PPVOi por essa via, tenha estimulado os mecanismos do sistema imune inato próximo ao local da lesão e a leishmania ter se favorecido dessa estimulação.

L. amazonensis apresenta características únicas que a distingue das demais. Deve-se levar em consideração que todos os camundongos *inbred* (isogênicos) são

susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*. A resposta imunológica de camundongos isogênicos a esta espécie ainda é complexa e não completamente compreendida. Dados da literatura apontam que *L. amazonensis*, de uma maneira geral, tira vantagem da maquinaria do sistema imune inato do hospedeiro, principalmente neutrófilos e macrófagos, mas também do ambiente de citocinas, para controlar e progredir com a infecção. Esta espécie leva ao desenvolvimento progressivo da lesão, que tem a característica particular de sobreviver no interior de macrófagos em enormes vacúolos parasitóforos, intensamente parasitados (SOONG, 2012; SOUZA et al., 2012).

Xin et al. (2008), apontam que a susceptibilidade de camundongos isogênicos com relação à infecção por *L. amazonensis* não está ligada apenas à expansão polarizada de IL-4 por células Th2, e sim pela ativação de linfócitos T CD4+ que produzem baixos níveis de citocinas. Souza et al. (2012), também afirma que a infecção murina por *L. amazonensis* não está estritamente associada ao desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 e que outros fatores estão associados com a susceptibilidade ao parasita.

São vários os mecanismos imunológicos pelos quais *L. amazonensis* estabelece infecção em modelo murino. Foi visto inclusive que IFN- γ , dependendo da sua concentração, pode causar a morte ou favorecer à infecção do parasita. O IFN- γ (citocina pró-inflamatória) pode ter um papel na autofagia da célula hospedeira e no metabolismo de lipídeos, criando um microambiente que favorece a entrada do parasita na célula. Também foi visto que *L. amazonensis* é capaz de inibir a maturação de células dendríticas e a produção de IL-12 por estas células, “segurando” uma resposta do tipo Th1 (SOONG, 2012; SOUZA et al., 2012). Pinheiro et al. (2004), demonstraram que *L. amazonensis* (e não *L. braziliensis*) também inibe a proliferação de linfócitos T e que essa anergia não pode ser revertida por citocinas exógenas. XIN et al. (2010), mostraram que as infecções por *L. amazonensis* e *L. guyanensis* são exacerbadas pela produção de IFN do tipo I (IFN-I), diferentemente do que ocorre com a espécie *L. braziliensis*, onde o IFN-I exerce um papel protetor. Além disso, os neutrófilos apoptóticos parecem ter um importante papel na manutenção da LC neste modelo, levando à exacerbação da doença.

Após a reflexão deste fato, é possível compreender porque a utilização do PPVOi em BALB/c infectado com *L. amazonensis* não apresentou o efeito esperado. Um dos mecanismos pelos quais a partícula viral inativada exerce seu efeito é pela

estimulação inicial da resposta imune inata, que se dá pela ativação de múltiplas vias de apresentação de antígenos via monócitos e células dendríticas (APCs), com posterior estimulação da resposta Th1, que leva a produção aumentada de IFN- γ (WEBER et al., 2013). Sendo que, os dados da literatura aqui expostos apontam para uma forte subversão do sistema imune inato do BALB/c por esta espécie de leishmania.

Porém, apesar de nos últimos anos a literatura apontar para diversos e novos mecanismos imunológicos importantes que estão na base da relação parasita-hospedeiro da infecção por *L. amazonensis*, o modelo BALB/c infectado com *L. amazonensis* ainda é bastante utilizado como modelo de infecção de LC no Brasil e no mundo e continua sendo utilizado no estudo de estratégias vacinais (MATOS GUEDES et al., 2014) e na busca por novas terapias (FONSECA-SILVA et al., 2016; TRINCONI et al., 2016). Além disso, o BALB/c infectado com *L. amazonensis* vem sendo reconhecido como um excelente modelo para estudo da leishmaniose cutânea difusa, uma condição rara, porém de difícil tratamento, que tem como principal agente etiológico a *L. amazonensis*.

Um dos objetivos deste projeto foi realizar um estudo imunológico preliminar da estimulação do PPVOi *in vivo* nos diferentes grupos experimentais. Apesar da cinética de expressão ter sido realizada com duas concentrações de PPVOi diferentes, a diferença de expressão entre elas não foi valorizada, uma vez que foi visto anteriormente que concentrações mais altas de PPVOi levou a uma superestimulação de macrófagos em cultura (resultado não mostrado) e, por isso, preventivamente, duas diferentes concentrações da partícula viral inativada foram utilizadas.

A não detecção ou baixíssimos níveis de IL-2 e IL-4 dos grupos não-estimulados *in vivo* com PPVOi (“controle”, “infectados e não tratados” e “apenas glucantime[®]”) é explicada pelo fato de que a produção de IL-2 é rápida e transitória, começando dentro de 2 a 3 horas da ativação da célula T, atingindo um pico dentro de 8 a 12 horas e declinando em 24 horas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; GAFFEN; LIU, 2004). Com relação aos resultados de IL-4 encontrados nesses grupos, sabe-se que o IFN- γ age na produção de IL-4 de forma antagônica. A literatura informa que outros tipos celulares, tais como: mastócitos, basófilos e eosinófilos, também podem produzir IL-4 (GESSNER; MOHRS; MOHRS, 2016), porém a presença e quantidade dessas células na amostra estudada (baço) é

questionável. Era esperado que os níveis de expressão de citocinas desses dois grupos fossem bem parecidos aos resultados do grupo controle, visto que todos os 3 grupos não foram previamente estimulados com PPVOi *in vivo*. No entanto, os resultados de IFN- γ e TNF- α mostraram que tanto a infecção por *L. amazonensis*, como a quimioterapia, por si só, exercem um efeito na estimulação do sistema imunológico do animal e estes foram mais responsivos ao estímulo com PPVOi do que o grupo controle. Ghosh et al. (2013), estudaram o potencial imunomodulador de drogas anti-leishmania em BALB/c e verificou que as drogas anti-leishmania utilizadas no combate ao parasita também exercem um efeito imunomodulatório *in vivo*. Com relação ao grupo de animais infectados e não tratados, já foi demonstrado que *L. amazonensis*, por si só, modula o sistema imune de camundongos BALB/c no estabelecimento da infecção (SOONG, 2012). Além disso, é possível que o estresse da administração diária de Glucantime[®] e da infecção por si só, podem ter influenciado nos níveis de expressão dessas citocinas.

Era esperado que os grupos de animais tratados com PPVOi *in vivo*, apresentassem níveis mais elevados de citocinas em comparação aos grupos não tratados. Os níveis de citocinas basais aumentados nestes grupos estimulados com o vírus é um reflexo da forte estimulação da partícula viral inativada *in vivo*. Nesses grupos, o PPVOi induziu a uma expressão significativa de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , mas também induziu a expressão de IL-4, IL-6 e IL10. A expressão basal diminuída de IL-4 nesses grupos é um reflexo da produção de IFN- γ , que tem uma ação antagônica sobre essa citocina. Quando comparamos as cinéticas de expressão das duas citocinas (IL-4 e IFN- γ) dos grupos tratados com PPVOi *in vivo*, vemos que a medida que o IFN- γ aumenta, ocorre a diminuição nos níveis de IL-4 na cultura.

Quando comparamos os resultados do estudo de eficácia do PPVOi com os resultados do estudo imunológico, é possível observar que, apesar da estimulação de uma resposta com perfil Th1, os grupos tratados com PPVOi *in vivo* e que foram mais estimulados para a produção de citocinas *in vitro*, também foram aqueles que apresentaram maiores lesões e carga parasitária.

Deve-se ter em mente que a resposta imunológica nos diferentes modelos murinos de LC é variada e depende não só do *background* genético e imunológico do animal, mas também da espécie de leishmania estudada. Desde a descoberta dos linfócitos Th1Th2, há 30 anos atrás, os estudos da LC em modelo murino vêm respondendo questões básicas sobre o desenvolvimento e a manutenção de

subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e suas funções no controle ou progressão da doença. A polarização Th1/Th2 da produção de IFN- γ /IL-4 observada com a espécie *L. major*, respectivamente, em C57BL/6 e BALB/c, é uma informação sem dúvida valiosa e nos fornece uma base para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência ou susceptibilidade à doença. Contudo, este dogma gerado com *L. major*, não pode ser aplicado para todas as espécies de leishmânias no contexto experimental.

9 CONCLUSÕES

- a) O método de imagem *in vivo* desenvolvido neste projeto, baseado na técnica de *near-infrared fluorescence imaging*, pode ser utilizado com eficácia para acompanhamento da leishmaniose cutânea experimental em animais infectados com *L. amazonensis*-iRFP;
- b) O acompanhamento da carga parasitária *in vivo* por análise de fluorescência em tempo-real e ao longo do tempo, fornece dados mais precisos e confiáveis para avaliação da infecção;
- c) O PPVOi não foi eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea em BALB/c infectado com *L. amazonensis*.

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

Por causa das características intrínsecas da relação parasita/hospedeiro do BALB/c infectado com *L. amazonensis* e em se tratando de um imunoestimulante da resposta Th1, a eficácia do PPVOi no tratamento da LC experimental deve ser analisada em um modelo de leishmaniose cutânea mais adequado, isto é, menos deficiente na resposta Th1, e utilizando outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. major* ou *L. braziliensis*,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)T1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology letters*, Amsterdã, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2005.

AMATO, V. S. *et al.* Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta tropica*, Amsterdã, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.

ANDERSON, C. F. *et al.* Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *Journal of immunology*, Baltimore, v. 174, n. 5, p. 2934-2941, 2005.

ANZILIERO, D. *et al.* Inactivated *Parapoxvirus ovis* induces a transient increase in the expression of proinflammatory, Th1-related, and autoregulatory cytokines in mice. *Brazilian journal of medical and biological research*, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 110-118, 2014.

BOLHASSANI, A. *et al.* Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental parasitology*, Nova York, v. 127, n. 3, p. 637-645, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília, 180p., 2010.

BRITO, M. E. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

CALVO-ALVAREZ, E. *et al.* Infrared fluorescent imaging as a potent tool for in vitro, ex vivo and in vivo models of visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, São Francisco, v. 9, n. 3, 2015. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003666>. Acesso em: 10 Jul 2015.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Human immunology*, Nova York v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). *Resources for health professionals*. Disponível em: http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html#tx> Acesso em: 4 Set 2016.

CHOY, G. *et al.* Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. *Molecular imaging*, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 303-312, 2003.

COJEAN, S. *et al.* Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerging infectious diseases*, Atlanta, v. 18, n. 4, p. 704-706, 2012.

CONCEICAO, J. *et al.* Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS neglected tropical diseases*, São Francisco, v. 10, n. 5, 2016. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371%2Fjournal.pntd.0004715>. Acesso em: 10 Ago 2016.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DAWIT G.; GIRMAN G.; SIMENEW K. A review on biology, epidemiology and public health significance of leishmaniasis. *Journal of bacteriology & parasitology*, Sunnyvale, v.4, n.2, 2013. Disponível em: <http://www.omicsonline.org/a-review-on-biology-epidemiology-and-public-health-significance-of-leishmaniasis-2155-9597.1000166.php?aid=12399>. Acesso em: 10 Abr 2014.

DELHON, G. *et al.* Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *Journal of virology*, Baltimore, v. 78, n. 1, p. 168-177, 2004.

DORLO, T. P. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, Londres, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DORTAY, H.; MUELLER-ROEBER, B. A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. *Microbial cell factories*, Londres, v. 9, n. 29, 2010. Disponível em: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-9-29>. Acesso em: 10 Mai 2012.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *The Israel Medical Association journal*, Ramat Gan, v. 11, n. 10, p. 623-628, 2009.

EZRA, N. *et al.* Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, Mumbai, v. 2, n. 3, p. 248-257, 2010.

FIEBIG, H. H. *et al.* Inactivated orf virus (*Parapoxvirus ovis*) induces antitumoral activity in transplantable tumor models. *Anticancer research*, Atenas, v. 31, n. 12, p. 4185-4190, 2011.

FILONOV, G. S. *et al.* Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nature biotechnology*, Nova York, v. 29, n. 8, p. 757-761, 2011.

FONTENELE-SILVA, J. S. *et al.* Treatment of American tegumentary leishmaniasis in special populations: a summary of evidence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 46, n. 6, p. 669-677, 2013.

FONSECA-SILVA, F. *et al.* Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *PLoS neglected tropical diseases*, São Francisco, v. 10, n. 2, 2016. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004442>>.

Acesso em: 15 Ago 2016.

FRANÇA-COSTA J. *et al.*, Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PloS one*, São Francisco, v. 7, n. 5, 2012. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036595>. Acesso em: 10 Jul 2013.

FRANGIONI, J. V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current opinion in chemical biology*, Londres, v. 7, n. 5, p. 626-634, 2003.

FRIEBE, A. *et al.* Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *Journal of virology*, Baltimore, v. 78, n. 17, p. 9400-9411, 2004.

FRIEBE, A. *et al.* Characterization of immunostimulatory components of ORF virus. *The journal of general virology*, Londres, v. 92, n. 7, p. 1571-1584, 2011

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, Filadélfia, v. 28, n. 3, p. 109-123, 2004.

GESSNER, A. *et al.* Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *Journal of immunology*, Baltimore, v. 174, n. 2, p. 1063-1072, 2005.

GHOSH, M. *et al.* Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, Londres, v. 68, n. 12, p. 2834-2838, 2013.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, Londres, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

HOROHOV, D. W. *et al.* In vitro and in vivo modulation of the equine immune response by parapoxvirus ovis. *Equine veterinary journal*, Newmarket/Suffolk, v. 40, n. 5, p. 468-472, 2008.

KATARA, G. K. *et al.* Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC immunology*, Londres, v. 14, n. 52, 2013. Disponível em: <http://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2172-14-52>. Acesso em: 10 Mar 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, Londres, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

LANG, T. *et al.* Bioluminescent Leishmania expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cellular microbiology*, Oxford, v. 7, n. 3, p. 383-392, 2005.

LANG, T. *et al.* Imaging Leishmania development in their host cells. *Trends in parasitology*, Oxford, v. 25, n. 10, p. 464-473, 2009.

LOPES, M. F. *et al.* Innate immunity to Leishmania infection: within phagocytes. *Mediators of inflammation*, Oxford, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/754965/>. Acesso em 10 Fev 2015.

MASMOUDI, A. *et al.* Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *Journal of dermatological case reports*, Warsaw, v. 7, n. 2, p. 31-41, 2013.

MASSOUD, T. F.; GAMBHIR, S. S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & development*, Cold Spring Harbor, v. 17, n. 5, p. 545-580, 2003.

MATOS GUEDES, H. L. *et al.* Intranasal vaccination with extracellular serine proteases of Leishmania amazonensis confers protective immunity to BALB/c mice against infection. *Parasites & vectors*, Londres, v. 7, 2014. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-448>. Acesso em: 20 Mai 2014.

MAYRINK, W. *et al.* Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 14-21, 2006.

McGUIRE, M. J. *et al.* Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the *Parapoxvirus ovis* (Orf virus) genome. *Proteome science*, Londres, v. 10, n. 1, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3283511/>. Acesso em: 20 Jun 2013.

MICHEL, G. *et al.* Luciferase-expressing Leishmania infantum allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. *PLoS neglected tropical diseases*, São Francisco, v. 5, n. 9, 2011. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001323>. Acesso em: 15 Mai 2015.

MILLINGTON, O. R. *et al.* Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology*, Nova York, v. 126, n. 3, p. 310-317, 2010.

MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*, Nova York, v. 73, n. 17, p. 1889-1920, 2013.

MOUGNEAU, E. *et al.* Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunological reviews*, Copenhagen, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.

NATIONAL CENTRE FOR IMMUNISATION RESEARCH & SURVEILLANCE (Austrália). *Vaccine components. NCIRS Fact sheet: May 2013*. Disponível em: <http://www.ncirs.edu.au/assets/provider_resources/fact-sheets/vaccine-components-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 10 Ago 2016.

NOWATZKY, J. *et al.* Inactivated Orf virus (*Parapoxvirus ovis*) elicits antifibrotic activity in models of liver fibrosis. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*, Amsterdã, v. 43, n. 5, p. 535-456, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 2010.

PAILLOT, R. A systematic review of the immune-modulators *Parapoxvirus ovis* and *Propionibacterium acnes* for the prevention of respiratory disease and other infections in the horse. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdã, v. 153, n. 1-2, p. 1-9, 2013.

PINHEIRO, O. R. *et al.* The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 76, n. 3, p. 519-527, 2004.

RAMAN, V. S. *et al.* Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis. *The journal of immunology*, Baltimore, v. 185, n. 3, p. 1701-1710, 2010.

REVEIZ, L. *et al.* Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PloS one*, São Francisco, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061843>> Acesso em: 15 Mar 2014.

REY, Luís. *Parasitologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

RINTOUL, J. L. *et al.* ORFV: a novel oncolytic and immune stimulating parapoxvirus therapeutic. *Molecular therapy: the journal of the american society of gene therapy*, São Diego, v. 20, n. 6, p. 1148-1157, 2012.

ROBERTS, M. T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British medical bulletin*, Londres, v. 75-76, p. 115-130, 2005.

ROCHA, M. N. *et al.* An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, Nova York, v. 75, n. 3, p. 282-291, 2013.

RODRIGUES, F. M. *et al.* Expression of Foxp3, TGF-beta and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Archives of dermatological research*, Berlim, v. 306, n. 2, p. 163-71, 2014.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature reviews. Immunology*, Londres, v. 16, n. 9, p. 581-92, 2016.

SHCHERBAKOVA, D. M. *et al.* Near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Current opinion in chemical biology*, Londres, v. 27, p. 52-63, 2015.

SHCHERBO, D. *et al.* Near-infrared fluorescent proteins. *Nature methods*, Nova York, v. 7, n. 10, p. 827-829, 2010.

SHU, X. *et al.* Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science*, Nova York, v. 324, n. 5928, p. 804-807, 2009.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunological reviews*, Copenhagen, v. 240, n. 1, p. 72-91, 2011.

SOONG, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonensis*. *Frontiers in immunology*, Lausana, v. 3, p. 58, 2012.

SOTO, J. *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, Chicago, v. 38, n. 9, p. 1266-1272, 2004.

SOUSA, L. M. *et al.* Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite immunology*, Oxford, v. 36, n. 1, p. 13-31, 2014.

TACCHINI-COTTIER, F. *et al.* An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Journal of immunology*, Baltimore, v. 165, n. 5, p. 2628-2636, 2000.

THALHOFER, C. J. *et al.* In vivo imaging of transgenic *Leishmania* parasites in a live host. *Journal of visualized experiments: JoVE*, Boston, n. 41, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156083/>>. Acesso em: 20 Mai 2012.

TRINCONI, C.T. *et al.* Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, Londres, v. 71, n. 5, 2016. Disponível em:

<<http://jac.oxfordjournals.org.libezproxy.open.ac.uk/content/71/5/1314.full>>. Acesso em: 10 Jul 2016.

TURNER, P. C.; MOYER, R. W. Poxvirus immune modulators: functional insights from animal models. *Virus research*, Amsterdã, v. 88, n. 1-2, p. 35-53, 2002.

UENO, N. *et al.* Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum*

chagasi promastigotes. *Cellular microbiology*, Oxford, v. 11, n. 12, p. 1827-1841, 2009.

WATANABE, H. *et al.* Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, Augusta, v. 22, n. 5, p. 460-466, 2004.

WEBER, O. *et al.* Therapeutic immunomodulation using a virus--the potential of inactivated orf virus. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, Wiesbaden, v. 32, n. 4, p. 451-460, 2013.

WEBER, O. *et al.* Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *The Journal of general virology*, Londres, v. 84, p. 7, p. 1843-1852, 2003.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Molecular Immunology*, Oxford, v. 45, p. 3371-3382, 2008.

XIN, L. *et al.* Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. *Journal of immunology*, Baltimore, v. 184, n.12, p. 7047-7056, 2010.

ZIJLSTRA, E. E. *et al.* Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet: Infectious diseases*, Nova York, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.

APÊNDICE A – ARTIGO



In vivo near-infrared fluorescence imaging of *Leishmania amazonensis* expressing infrared fluorescence protein (iRFP) for real-time monitoring of cutaneous leishmaniasis in mice

Janaina Correia Oliveira^a, Aline Caroline da Silva^b, Renato Antonio dos Santos Oliveira^a, Valéria Rêgo Alves Pereira^b, Laura Helena Vega Gonzales Gil^{a,*}

^a Department of Virology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, - 50.740-465 Recife, PE, Brazil

^b Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, - 50.740-465 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2016

Received in revised form 18 July 2016

Accepted 2 August 2016

Available online 4 August 2016

Keywords:

Leishmania amazonensis

iRFP

BALB/c mouse

Cutaneous leishmaniasis

Near-infrared molecular imaging

ABSTRACT

The use of *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice is an important model for the study of experimental cutaneous leishmaniasis. Here we report the development of a non-invasive method to directly evaluate and measure parasite burden during the course of the infection, based on the near-infrared fluorescence detection of a recombinant *L. amazonensis* strain. So, we generated a *L. amazonensis* strain that stably expresses the near-infrared protein (iRFP) gene and compared the maintenance of its *in vitro* and *in vivo* characteristics, such as fitness, pathogenicity and fluorescence emission. After that, we followed the disease development, as well as the parasite burden in BALB/c mice footpads infected with *L. amazonensis*-iRFP, by using an *in vivo* near-infrared fluorescence scanner. *In vitro* results showed a linear correlation between the fluorescence emission and the number of parasites. The *in vivo* study showed that the use of iRFP-transfected *L. amazonensis* enables the monitoring of parasite burden by measuring fluorescence signals. Therefore, this technique can be confidently used to directly monitor parasitic load and infection overtime and could be an excellent tool for *in vitro* and *in vivo* screening of anti-leishmanial drugs and vaccine efficiency. This is the first report of the use of the near-infrared fluorescence imaging technique for monitoring *in vivo* cutaneous leishmaniasis.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a parasitic infection widely distributed throughout much of the tropical and underdeveloped parts of the world, caused by different species of flagellate protozoans belonging to the genus *Leishmania*. These protozoans are obligatory intracellular parasites in mammalian hosts, where they differentiate into amastigotes from flagellated extracellular promastigotes, which is able to multiply inside macrophages and disseminate the disease (Kaye and Scott 2011). In general, the disease is characterized by the presence of single or multiple ulcers on the skin that, in some cases, can reach mucosal regions, leading to the development of a more severe form (Handler et al. 2015). In the Americas, also called American cutaneous leishmaniasis (ACL), the disease is considered more complex from an eco-epidemiological point of view (de Brito et al. 2012). Difficult and complex to

treat with existing drugs, the diseases caused by *Leishmania* species are still an important global health problem, with a growing number of cases in many countries (Kevric et al. 2015).

Leishmania amazonensis is one of the species responsible for the development of ACL in South America and was primarily found in the Amazonia forest region. Widely distributed in Brazil, the *L. amazonensis* infection can lead to the development of two different clinical forms: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) (Marlow et al. 2013). *L. amazonensis* is the most important agent of DCL, a serious condition with chronic evolution, difficult to treat, characterized by the presence of disseminated non-ulcerated nodular skin lesions, is resistant to most therapeutic strategies and proliferates in an uncontrolled way (Franca-Costa et al. 2012; Zerpa et al. 2007). The *L. amazonensis*-infected BALB/c mouse model is very useful for studying murine cutaneous leishmaniasis that has been widely used to evaluate immune responses (Sousa et al. 2014), vaccine strategies (de Matos Guedes et al. 2014) and new therapies (Fonseca-Silva et al. 2016; Trinconi et al. 2016).

The urgency of finding new anti-leishmania drugs and vaccines, combined with the progress made in the last few decades in the field of small animal optical imaging, have boosted the successful generation

* Corresponding author.

E-mail addresses: janacoliveira@hotmail.com (J.C. Oliveira), aline.caroline.bm@gmail.com (A.C. da Silva), renatoasoliveira@hotmail.com (R.A.S. Oliveira), valeria@cpqam.fiocruz.br (V.R.A. Pereira), laura@cpqam.fiocruz.br (L.H.V.G. Gil).

of several bioluminescent and fluorescent *Leishmania* species for the development of more effective and reliable new methods of *in vivo* studies (Bolhassani et al. 2011; Calvo-Alvarez et al. 2012; Mehta et al. 2008; Michel et al. 2011; Millington et al. 2010; Reimao et al. 2013; Rocha et al. 2013).

Optical imaging techniques for the assessment of tissue anatomy, physiology, metabolic and molecular function have emerged with tremendous force in the past years. Fluorescence imaging, particularly near-infrared (NIR) fluorescence imaging, has emerged as a safe, low cost, real-time, and widely available technique, providing an attractive approach for detection of *in vivo* fluorescence and imaging of deep-tissues and whole-body of small animals (Tong et al. 2015). In mammals, deep tissue visualization of the conventional fluorescent proteins derived from the green fluorescent protein family (GFP-like fluorescent proteins) is hindered by the high absorbance of hemoglobin and skin melanin. In the last few years, the discovery and engineering of some NIR fluorescent proteins has expanded the range of application of this imaging technique (Shcherbakova et al. 2015; Shcherbo et al. 2010; Shu et al. 2009). One of them, the infrared fluorescent protein (iRFP), was originally isolated from the phytochrome of the bacteria *Rhodospseudomonas palustris* (Filonov et al. 2011). Recently, a *L. infantum* strain expressing iRFP was successfully generated and used as a tool for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* model of visceral leishmaniasis (Calvo-Alvarez et al. 2015).

Here we report the development of a non-invasive *in vivo* method based on near-infrared fluorescence imaging technique that measured the emitted fluorescence of iRFP-expressing *L. amazonensis* in footpad lesions of infected BALB/c mice. This technique allows for monitoring over time of the parasite burden in this well-established animal model of cutaneous leishmaniasis, involving *L. amazonensis*-infected BALB/c mice.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

The *in vivo* experimental protocol used in this study was evaluated and approved (approval number 62/2014) by the Ethics Committee on Animal Use of Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Brazil), and was performed according to the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Ministry of Science and Technology, Brazil).

2.2. Animals

Male BALB/c mice, 6–8 weeks old, weighing 20 ± 2 g, were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. The animals were kept in mini-isolators containing *Pinus elliot* wood shavings, *ad libitum* autoclaved water and food (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) in a ventilated rack (Alesco, Monte Mor, SP, Brazil) under controlled conditions of temperature (± 23 °C) and luminosity. Twice a week the animals were transferred to clean mini-isolators in a laminar flow (class II biological safety cabinet) cage change station (Alesco).

2.3. Parasite cultivation

LTB0016), kindly provided by Dr. Valéria Pereira (Aggeu Magalhães Research Center/FIOCRUZ, Recife, Brazil), were routinely cultivated in 50 mL centrifuge tubes (Corning, Steuben, NY, USA) or T-25 flasks (TPP, Trasadingen, SH, Switzerland), containing 10 mL of complete Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (LCG Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil) and 1% of antibiotic solution containing 10,000 µg/mL penicillin and 10,000 IU/mL streptomycin (Sigma-Aldrich), at 26 °C in a B.O.D. incubator, without agitation. For transgenic *L. amazonensis*-iRFP cultivation, the complete Schneider's medium was also supplemented with 5 µg/mL

hemin (Sigma-Aldrich) and 50 µg/mL hygromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Successive passages were made twice a week. The infectivity of *L. amazonensis*-WT and *L. amazonensis*-iRFP was maintained by regular passage through BALB/c mice. The estimation of parasites number, as well as the observation of morphological characteristics and motility (wild-type and transgenic) were carried out in a Neubauer chamber using a light microscope (Leica, Wetzlar, HE, Germany) with 400× magnification. In order to determine the number of parasites, the culture was diluted in 2% formalin solution and then the parasites were counted. To estimate parasite viability, we diluted the parasite culture in sterile phosphate buffered saline (PBS-1×) pH 7.2, and observed the promastigotes morphology and motility.

2.4. Generation of *L. amazonensis*-iRFP

The sequence of the *iRFP* gene (GenBank: JN247409), was synthesized commercially and cloned into a pUC57 plasmid (GenScript, Piscataway, NJ, USA). To express the *iRFP* gene in *L. amazonensis*, the gene was cloned into the 5'-Nco1 and 3'-Not1 pLEXSY-Hyg2 (Jena Bioscience, Jena, TH, Germany) cloning sites, according to the manufacturer's instructions. The *iRFP* coding region was initially analyzed for the presence of Nco1, Not1 and Sma1 restriction sites; a pair of oligonucleotides was designed with Nco1 and Not1 restriction sites (underlined): iRFP-F forward, 5'-CCATGGCGGAAGGATCCGTCGCCAG-3' and iRFP-R reverse, 5'-GCGGCCGCTCACTCTCCATCAGCCG-3'. The primers iRFP-F and iRFP-R were used in a high-fidelity PCR with the HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) to amplify the *iRFP* gene using as template the pUC57-*iRFP* plasmid. After *iRFP* amplification with specific primers, an electrophoresis of the digested plasmid was performed in 1% agarose (Invitrogen) gel in 1× TAE (tris-acetate-EDTA) in the presence of ethidium bromide (0.5 µg/mL) for 60 min at 100 V. The expected PCR product (961 bp) was then excised from the agarose gel, purified with Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, BKM, UK) and cloned into the pDrive cloning vector with Qiagen® PCR Cloning Kit, according to the manufacturers instructions. Then, the plasmid was used to transform chemically competent *Escherichia coli* DH10B™ strain (Invitrogen) by heat shock. Transformed *E. coli* DH10B cells were cultivated on Luria-Bertani (LB) agar plates containing ampicillin (100 µg/mL) and the clone screening was performed by the inoculation of a single colony in 2 mL LB broth supplemented with ampicillin (100 µg/mL) for 18 h at 37 °C in constant agitation (220 rpm). For plasmid purification, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) was used according to the manufacturer's instructions. After that, the plasmid was then double digested with Nco1 and Not1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). After confirmation of the restriction fragment pattern by electrophoresis in agarose gel, the fragment of interest was purified, as described above. Then, the purified digestion product was cloned into dephosphorylated pLEXSY's Nco1 and Not1 cloning sites with T4 DNA ligase using different insert:vector molar ratios. The ligation mixture was used to transform *Escherichia coli* DH10B by heat shock. Transformed *E. coli* DH10B cells were selected on LB agar plates containing ampicillin (100 µg/mL). For plasmid purification the selected colonies, Qiagen® Plasmid Mid kit was used according to the manufacturer's instructions. Approximately 5 µg of plasmid were digested and linearized with Sma1 (New England Biolabs). The digestion of the construct with Sma1 liberated the *iRFP* expression cassette (~6.1 kb). The conservation of the gene sequence and the correct orientation were confirmed by DNA sequencing. After electrophoresis and purification of the digestion product, the expression cassette was electroporated using Bio-Rad Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), into *L. amazonensis* promastigotes, according to plasmid instructions. Transfected cells were selected with 100 µg/mL hygromycin, for clonal and non-clonal selection. All procedures for transfection, recombination and selection of positive *L. amazonensis*-iRFP clones were followed according to the plasmid (pLEXSY-Hyg2) manufacturer's instructions.

2.5. Confirmation of genomic integration and iRFP expression

Total genomic DNA was extracted from 10^7 iRFP and WT *Leishmania* cells with a commercial kit (PureLink® Genomic DNA, Invitrogen). The PCR was performed using a pair of specific primers for the *Leishmania* *ssu* sequence (not present in the plasmid) and hygromycin gene sequence, which were respectively, the *ssu* reverse primer (F3002) and *Hyg* forward primer (A3804) (Jena Bioscience). To phenotypically confirm iRFP cassette integration and protein expression, we used the Odyssey® Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) with the 700 nm channel, to scan the 100 mm cell culture dish (Nest Biotechnology, Rahway, NJ, USA) from the clonal *L. amazonensis*-iRFP selection, as well as the 96-well microplate (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) containing 10^6 *L. amazonensis*-WT and *L. amazonensis*-iRFP in appropriated Schneider's medium.

2.6. In vitro growth kinetics of *L. amazonensis*-iRFP and WT

After thawing, parasites (iRFP and WT) were cultivated in 50 mL centrifuge tubes containing each 10 mL of appropriated complete Schneider's medium, for two serial passages at 26 °C. Then, after 3 days of culture, the culture concentration was determined in Neubauer chamber and adjusted with complete Schneider's medium to a final concentration of 1×10^6 promastigotes/mL in a volume of 10 mL in triplicate. Parasite counts and morphology were performed daily over 6 days with a 10 μ L aliquot of the culture in a Neubauer chamber using a light microscope with a 400 \times magnification. Additionally, 2.5×10^8 parasites/mL were 2-fold serially diluted in a 96-well plate, until reach the concentration of approximately 1×10^2 parasites/mL. The plate was scanned on Odyssey® using the 700 nm channel before and after centrifugation at 2000 $\times g$ for 5 min. This experiment was performed in triplicate. Fluorescence intensity was given by the determination of the total number of pixels in each well.

2.7. Infection of BALB/c mice with wild-type and fluorescent *L. amazonensis*

Promastigote forms of *L. amazonensis*-iRFP and *L. amazonensis*-WT were thawed and cultured in 10 mL of complete Schneider's medium in 50 mL centrifuge tubes, as described above. To obtain metacyclic promastigote forms (infective stage), parasites were counted in Neubauer chamber and cultured at an initial inoculum of 1×10^6 leishmania cells/mL in complete Schneider's medium until they reached the stationary phase (4–5 days). The culture supernatants were transferred to 50 mL centrifuge tubes, cells were harvested by centrifugation at 2000 $\times g$ for 5 min and the leishmania pellet was washed twice with sterile PBS-1 \times pH 7.2, to completely remove the hygromycin antibiotic. Thereafter, the pellet was gently resuspended in a small volume of sterile PBS1X pH 7.2 and the metacyclic promastigotes forms were estimated in Neubauer chamber. The concentrations of the suspensions were adjusted to 10^5 , 10^6 and 10^7 parasites/mL. Groups of BALB/c mice ($n = 3$) were subcutaneously injected in the right hind footpad with 10^5 to 10^7 late-stationary-phase *L. amazonensis*-iRFP promastigotes suspended in 30 μ L of sterile PBS1X pH 7.2, using a 26-gauge needle.

2.8. In vivo near-infrared fluorescence imaging of *L. amazonensis*-iRFP

In vivo imaging studies were performed on Odyssey® Infrared Imaging System. This device is a fluorescence scanner in the near-infrared window and it has two channels (700 nm and 800 nm) for detection of NIR dyes. The MousePOD® *in vivo* Imaging Accessory, CCD (charge-coupled device) chamber (Li-COR Biosciences), easily converts the scanner in a small-animal image acquisition device. A group of 3 animals was anesthetized by intraperitoneal injection with Ketamine/Xylazine mixture (Ceva, Campinas, SP, Brazil) at a dose of 115 mg/Kg of a 10% ketamine and 10 mg/Kg of a 2% xylazine. A group of 3 mice at a time was placed on the heated surface of the MousePOD® chamber and the eyes

were protected and humidified with physiological sterile saline to avoid cornea drying. Footpads were carefully fixed on the scanner surface and weekly imaged in the 700 nm channel for approximately 5–10 min, for two months by using appropriate *in vivo* scan parameters. The determination of the parasite burden was performed using Odyssey® Application Software Version 3.0. and it is given by the quantification of fluorescence intensity of the region of interest (ROI). It was defined as the number of pixels in a given area multiplied by the average fluorescence intensity. Fluorescence determination was expressed as a pseudocolor on a blue background, with the red color denoting the highest intensity and the dark blue the lowest one. The non-infected paw of each animal was also scanned and was used to determine the background values. After approximately 8 weeks, the animals were euthanized by cervical dislocation with previous anesthesia by Ketamine/Xylazine mixture. The evolution of the infection was also weekly monitored by measuring the thickness of the footpad lesions with a caliper (Vonder, Curitiba, PR, Brazil).

2.9. Ex vivo parasitic load quantification

The parasitic load was determined two months post infection using the quantitative limiting dilution assay, described as follows. After the euthanasia procedure, the *L. amazonensis*-iRFP-infected footpads were cleaned with 70% alcohol and opened using sterile scissors and tweezers in a laminar flow hood to collect a fragment of infected tissue, that was placed in a 15 mL centrifuge tube (Corning) containing 2 mL of sterile PBS-1 \times pH 7.2 and then weighed. The single-cell suspensions were obtained by homogenization of the tissues through a wire mesh. The resulting cell suspension was serially diluted in triplicate in a 96-well plate containing complete Schneider's medium supplemented with 10% SBF, hemin and hygromycin, and incubated for 7 days at 26 °C. The number of viable parasites in each footpad was estimated from the highest dilution that promoted promastigote growth after seven days of incubation. Each well of the plate was examined by microscopy and classified as positive or negative according to whether or not viable promastigotes (mobile forms) were present. The plate was also scanned on Odyssey® using the 700 nm channel.

2.10. Statistical analyses

Data of the kinetic growth of WT and *L. amazonensis*-iRFP strains were analyzed with two way-ANOVA using GraphPad Prism version 4.0a for Macintosh OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and the results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Generation of *L. amazonensis* expressing iRFP protein

In order to obtain a fluorescent *L. amazonensis* strain in the 'NIR window', we cloned the open reading frame of iRFP (λ 690 nm/713 nm) gene into the *Leishmania* expression vector (pLEXSY-Hyg2) and transfected the expression cassette in a wild-type reference strain of *L. amazonensis*. To constitutively express the iRFP gene in the cytosol, the gene was cloned into the 5'-Nco1 e 3'-Not1 cloning sites of pLEXSY. Posteriorly, the integrative cassette linearized with Swal1, containing the encoding region for iRFP, was integrated into the chromosomal 18S rRNA locus (*ssu*) of *L. amazonensis* through homologous recombination (Fig. 1A).

After clonal and non-clonal selection of *L. amazonensis*-iRFP strain with hygromycin, the integration of the iRFP expression cassette into the *ssu* locus of *L. amazonensis* was confirmed by PCR using total genomic DNA of both *L. amazonensis*-iRFP and *L. amazonensis*-WT. A unique and expected product of 1823pb was expected and amplified only when we used *L. amazonensis*-iRFP DNA as template (Fig. 1B). The genomic integration and iRFP expression was also confirmed by phenotypic selection of *L. amazonensis*-iRFP through the detection of the emitted

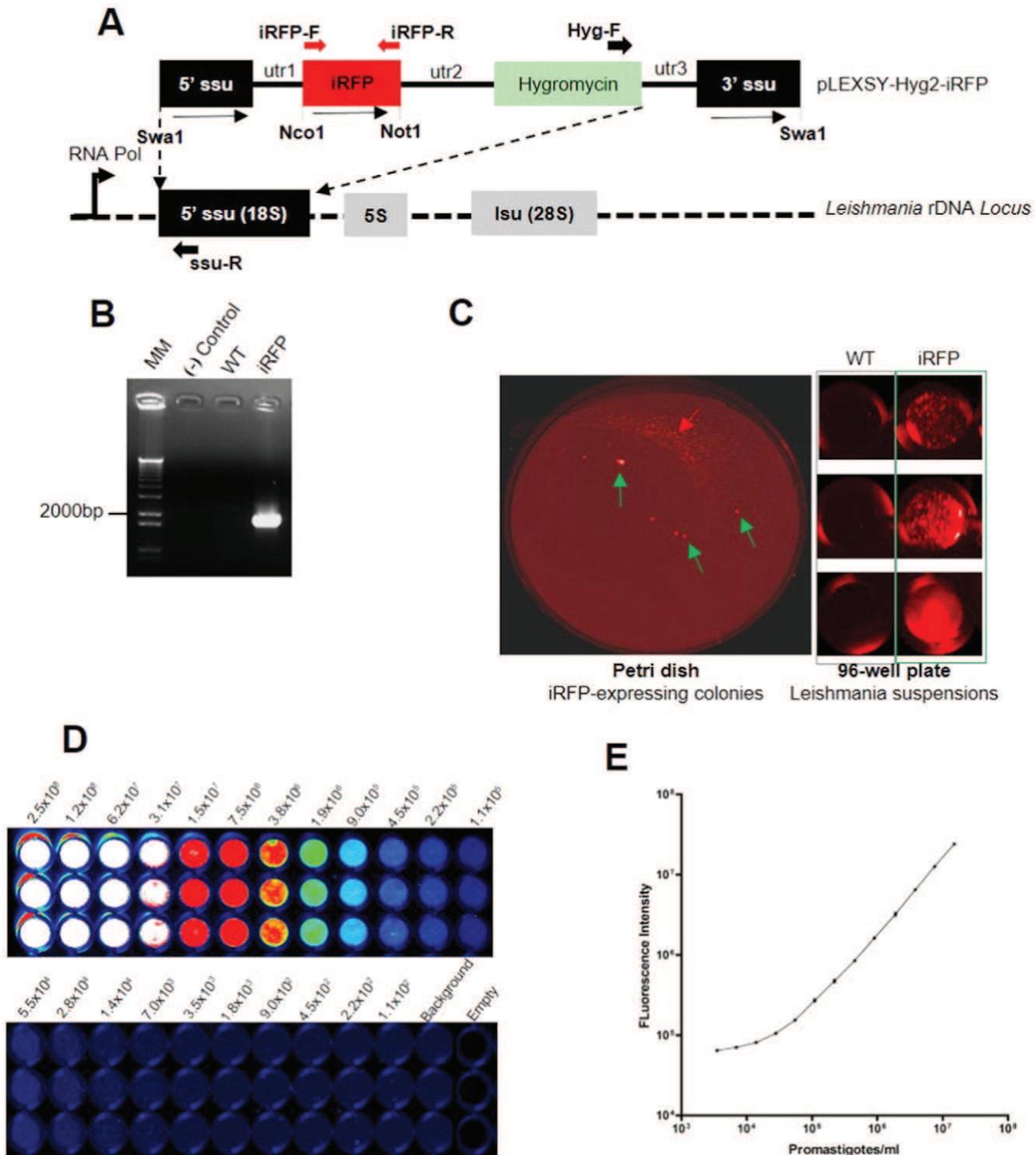


Fig. 1. Cloning strategy, screening of the transfected leishmania and *in vitro* quantification of fluorescence. (A) Scheme of *iRFP* cassette organization and its integration into *Leishmania*'s genome. (B) DNA gel showing a specific fragment of 1823bp amplified with *ssu-R* and *Hyg-F* primers to confirm genome integration. (C) Use of the infrared imager Odyssey to select recombinant parasites in solid medium and in suspension: The Petri dish contained few big (green arrow) and several small (red arrow) fluorescent colonies, however only the big ones can be seen by naked eye (data not shown). *Leishmania*'s suspension growing in 96-well plates shows that only different *iRFP* parasites (not WT) emit fluorescence over time. (D) is representative of fluorescence detection in the 96-well plate containing *L. amazonensis-iRFP* serial dilution. (B-Background; E-empty well). (E) Graphic showing the relation between concentration of *L. amazonensis-iRFP* promastigotes and its fluorescence intensity in each well. The experiment was made in triplicate. Results are expressed by mean \pm standard deviation.

fluorescence of the recombinant strain cultured in both agar and broth Schneider's medium. In the Petri dish, most of the recombinant colonies were still small and could not be seen with the naked eye, but when passed on the fluorescence scanner, they could be easily detected in a large number (Fig. 1C). In order to establish the correlation between parasite load and fluorescence intensity, a culture of *L. amazonensis-*

iRFP promastigotes in log phase was 2-fold serially diluted in a 96-well plate and the fluorescence intensity of each well was measured on the Odyssey near-infrared scanner (Fig. 1D). As we can observe, Fig 1D and E show a clear correlation between fluorescence intensity and promastigote concentration in the plate, with the lower detection limit of $2,8 \times 10^4$ parasites/mL.

3.2. Fitness, pathogenic characteristics and *in vivo* fluorescence detection

In order to determine whether the generated construction brought an important metabolic disadvantage to *L. amazonensis*-iRFP or not, we observed the growth kinetics, morphology and motility of promastigote forms of both strains in a time course. The Fig. 2A shows that there is a slight difference in the growth kinetics between the two strains, however it is not statistically relevant and it does not have a negative impact over the growth. Moreover, we did not detect any difference in the general morphological characteristics or in the

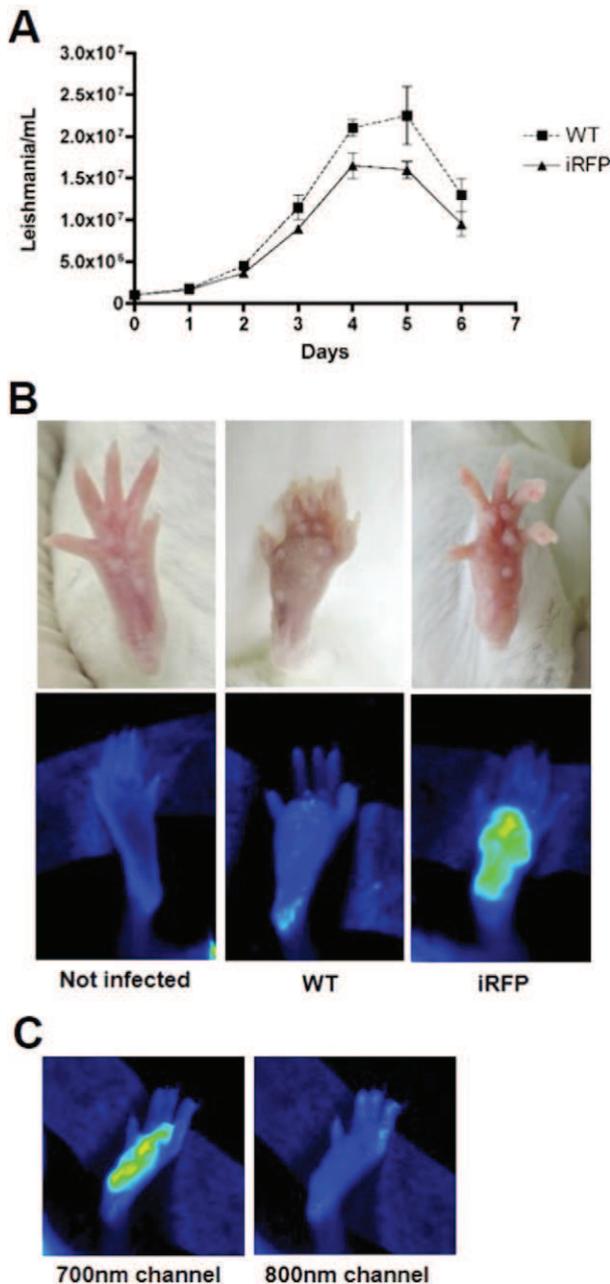


Fig. 2. Comparison of *in vitro* and *in vivo* characteristics of *L. amazonensis*-iRFP versus WT and *in vivo* fluorescence detection. (A) Standard growth rates during 7 days. Experiment was carried out with 10^6 promastigotes parasites at log phase in duplicate. Results were expressed by mean \pm standard deviation. Curves were compared by ANOVA without significance. (B) Lesion comparison of BALB/c mice after 35 days inoculated with 10^7 *L. amazonensis*-iRFP and WT promastigotes in stationary phase, and not infected. The figure shows photographs of mouse footpads, as well as their respective fluorescence detection on the near-infrared imager Odyssey. (C) 700 nm channel specificity of *in vivo* iRFP fluorescence detection.

motility of cultured *L. amazonensis*-iRFP compared to wild-type culture over time (data not shown). In order to evaluate the maintenance of the pathogenicity and virulence of the transgenic strain *in vivo*, we initially inoculated 10^7 of stationary phase of promastigotes of *L. amazonensis*-iRFP and *L. amazonensis*-WT in BALB/c mice and compared the lesion development over time. We can observe (Fig. 2B) after 40 days of inoculation the presence of a typical lesion at the inoculated footpads of the infected animals by either recombinant or wild-type strains of *L. amazonensis*, characterized by a visible swelling when compared to the healthy footpad. This experiment indicates that both, wild-type and *L. amazonensis*-iRFP parasites are driving the same clinical processes in BALB/c mice. Concerning the fluorescent emission by *L. amazonensis*-iRFP *in vivo*, we can observe that only animals which are infected with the transgenic strain emit detectable fluorescence on the infrared scanner. The specificity of fluorescence detection emitted by iRFP at the 700 nm channel was also confirmed and showed that it could not be detected by the 800 nm channel (Fig. 2C).

3.1. *In vivo* imaging of *L. amazonensis*-iRFP for monitoring disease progression

In order to investigate the *in vivo* sensitivity of the fluorescence detection, right after the parasite injection, we injected in the right hind footpad 10^5 , 10^6 and 10^7 late-stationary-phase *L. amazonensis*-iRFP (Fig. 3A). We could detect a clear signal of fluorescence in the animal's footpad inoculated with 10^6 and 10^7 *L. amazonensis*-iRFP, however, we were not able to detect satisfactory signal intensity in animals inoculated with 10^5 parasites using standard scan parameters. Despite the absence of satisfactory signal, these animals have also developed footpad lesion overtime (data not shown). For relative quantification of parasite burden along the time, we followed the lesion development and fluorescence detection of the group inoculated with 10^7 parasites for approximately two months. Fig. 2B shows that right after parasite injection, there is a strong fluorescence signal (Day 0), followed by a signal decrease (day 7), and finally a gradual increase of signal fluorescence over the weeks until day 63. The Fig. 2C and D show the fluorescence quantification in footpad lesions and lesion sizes, respectively, after the appearance of clinical signs, at different time intervals. As expected, there was a proportional increasing in both fluorescence signal and lesion size.

Subsequently, we investigated the parasite burden of the group during approximately 60 days after parasite inoculation by determining the number of parasites present in the infected paws. The number of parasites reached the value of 1×10^8 parasite/mg of tissue. In order to show if the fluorescence detection could also be used to identify positive wells after the limiting dilution assay, we compared the number of positive and negative wells by light microscopy and then by fluorescence scanning. Fig. 4 is an example of sample processing and the correspondence of results (fluorescence versus microscopy). As we can see, all positive wells of the plate were also positive when analyzed by fluorescence, confirming the good sensitivity of this technique.

4. Discussion

In this study we developed a non-invasive method to directly evaluate and measure parasite burden during the course of the infection, based on the near-infrared fluorescence detection of a recombinant *L. amazonensis* strain. From all modalities of small animal *in vivo* imaging based on fluorescent or bioluminescent approaches, the NIR fluorescence imaging is the key to effective reach deep tissues, because in the NIR 'optical window' (from 650 nm to 900 nm), the absorption of light by biological components such as hemoglobin, lipids and water is minimal, allowing light to reach its maximum depth of tissue penetration. Besides, the phenomenon of light scattering and auto fluorescence are greatly reduced in the NIR window and the light-based radiation

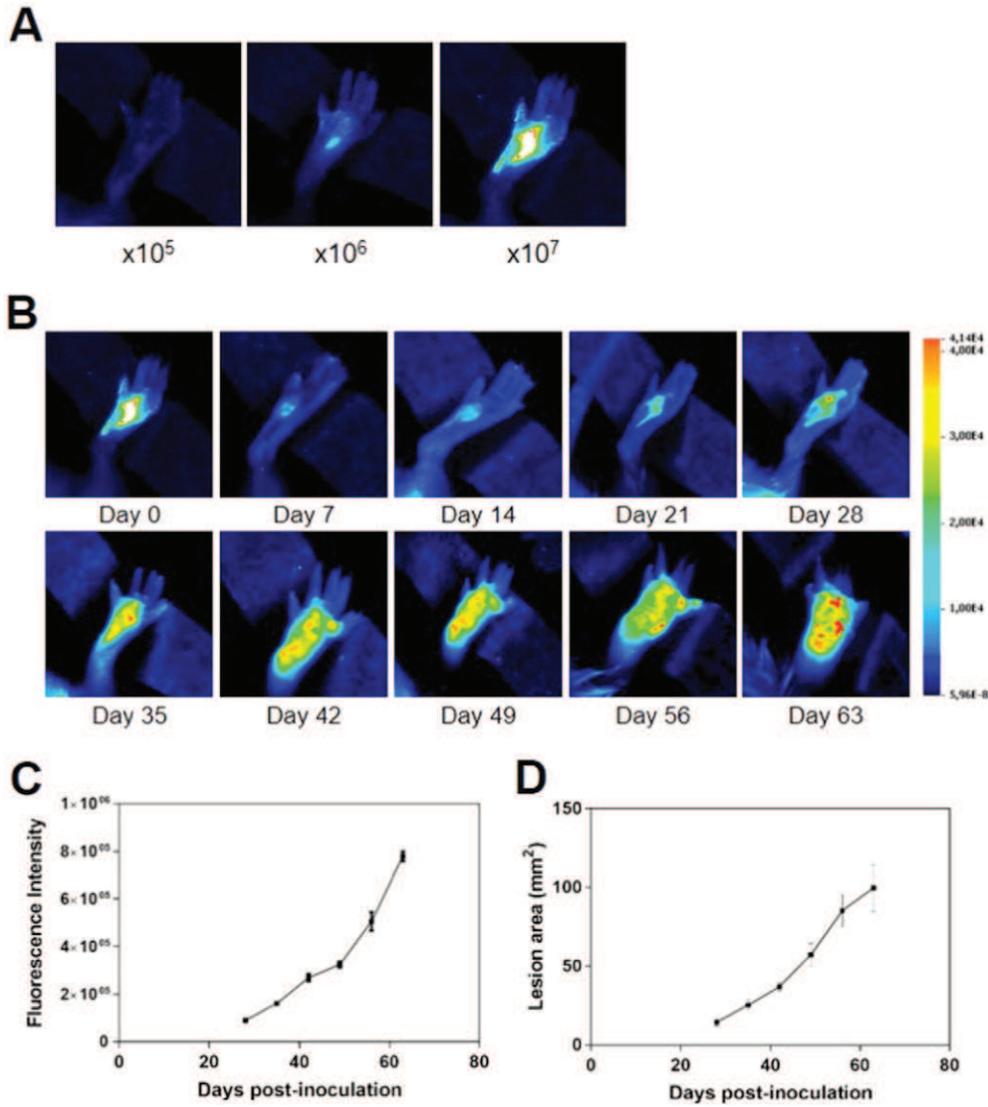


Fig. 3. *In vivo* monitoring of *L. amazonensis*-iRFP infection in BALB/c mice at different time intervals. (A) Fluorescence detection emitted by different amounts of *L. amazonensis*-iRFP (10^5 , 10^6 and 10^7), right after footpad inoculation. (B) Imaging of BALB/c mice inoculated with 10^7 *L. amazonensis*-iRFP promastigotes in stationary phase at different time intervals (from day 0 to 63). (C) Graph of the mean of footpad fluorescence intensity ($n = 3$). (D) Graph of the mean of the footpad thickness measurement over the course of *Leishmania*-iRFP infection. Bars represent the standard deviation ($n = 3$).

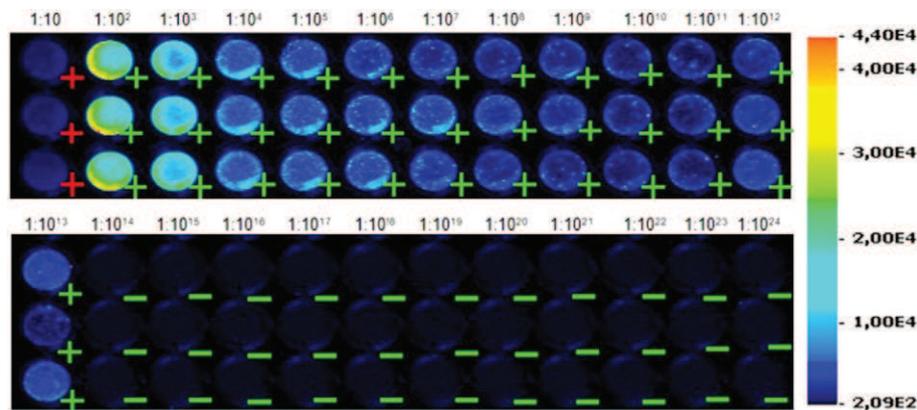


Fig. 4. *Ex vivo* limiting dilution assay. In order to quantify the parasite burden, parasites were serially diluted at 10 fold, cultured by 7 days, and observed by light microscopy and scanned on Odyssey for fluorescence detection. Green plus and minus signals were, respectively, positive and negative at microscopy. Red plus signal means it was positive at microscopy, but fluorescence-negative. Above there is a representative serial dilution in triplicate showing that the limiting dilution was at titer $1:10^{13}$.

(not harmful) can be repeatedly applied to the animal (Frangioni 2003; Hilderbrand and Weissleder 2010; Shcherbakova and Verkhusha 2013). One of NIR proteins, the iRFP has a suitable and useful characteristic for *in vivo* use: it incorporates the biliverdin pigment that is an intermediate product of heme catabolism in all aerobic organisms, including animals. Low levels of biliverdin are enough to confer fluorescence to cells, tissues and animals. In addition, iRFP does not need an exogenous source of biliverdin, thus, it is not cytotoxic and presents good brightness and photostability characteristics. Its maximum absorption and emission peaks are 690 nm and 713 nm, respectively (Filonov et al. 2011). Leishmania imaging methods based on the fluorescence detection of NIR transgenic Leishmania species has been successfully developed for *in vitro* and *in vivo* use as an alternative to conventional tools (Calvo-Alvarez et al. 2015; Dortay and Mueller-Roeber 2010).

Regarding the results obtained by *in vitro* detection of only 3×10^4 *L. amazonensis*-iRFP in a 96-well plate, it shows the sensitivity of this technique to be employed as a high-throughput screening (HTS) assay for checking efficacy of new anti-leishmania drugs. The difference observed in *L. amazonensis*-iRFP curve growth compared to the wild-type strain, although not significant, could be explained by the fact that for each cassette integration it occurs the inactivation of one *ssu* site. However, as the *ssu* integration site is present in multiple copies per genome, this inactivation does not significantly influence host physiology. Regarding the lesion diameter, as expected, it showed a direct relationship with the parasite burden. Such data is important, since this method has already been incorporated into the research routine on cutaneous leishmaniasis. However, these values may not always be proportional to the parasite burden in this model. This occurs because the footpad lesion caused by *L. amazonensis* in BALB/c mouse is the result not only of local parasite multiplication, but also of a progressive inflammatory process that does not spontaneously evolve to cure and sometimes it is hard to regress, even when it occurs a reduction of the parasite burden. In this sense, the relative fluorescence quantification as a direct measurement of the *in vivo* parasitic load in this model can be an extremely useful tool in earlier evaluating the effectiveness of anti-leishmania drugs. The near absence of signal detected in animals infected with only 10^5 parasites can be improved by changing scan parameters, such as laser intensity during individual scanings. The *ex vivo* limiting dilution test is a useful and still necessary test for determining the *ex vivo* parasite burden in models of cutaneous leishmaniasis, mainly because weakly parasitized lesions may go unnoticed by imaging methods. On the other hand, the risk of contamination of cultures in the limiting dilution test, whether by the inappropriate handling or by secondary contamination caused by bacteria from the lesion itself endangers the results of the parasite burden quantification in collected tissue fragments, as well as any conclusion about the study in question.

The method developed here allowed us to directly and early evaluate parasite burden in a well-established model of cutaneous leishmaniasis. The use of a *L. amazonensis* strain expressing a NIR protein, allowed us to track the parasites before, after and during the course of an *in vivo* infection, as well as identifying parasites in tissues collected from infected animals with high sensitivity.

Author contributions

J.C.O. performed all experimental procedures and wrote the manuscript. A.C.S. performed *ex vivo* limit dilution assay and together with J.C.O. performed *in vivo* parasite inoculations. R.A.S.O. together with J.C.O. analyzed the data. V.R.A.P. and L.H.V.G.G. supervised the study. L.H.V.G.G. together with J.C.O. designed and planned the project. All the authors revised the manuscript.

Acknowledgments

We thank CAPES foundation (Ministry of Education, Brazil) for J.C.O. and A.C.S. scholarships.

References

- Bolhassani, A., et al., 2011. Fluorescent Leishmania species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. *Exp. Parasitol.* 127 (3), 637–645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.12.006>.
- Calvo-Alvarez, E., et al., 2012. Appraisal of a Leishmania major strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (11), e1927. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001927>.
- Calvo-Alvarez, E., et al., 2015. Infrared fluorescent imaging as a potent tool for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (3), e0003666. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003666>.
- de Brito, M.E., et al., 2012. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45 (4), 425–429.
- de Matos Guedes, H.L., et al., 2014. Intranasal vaccination with extracellular serine proteases of *Leishmania amazonensis* confers protective immunity to BALB/c mice against infection. *Parasites & vectors* 7, 448. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-448>.
- Dortay, H., Mueller-Roeber, B., 2010. A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. *Microb. Cell Factories* 9, 29. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-9-29>.
- Filonov, G.S., et al., 2011. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.* 29 (8), 757–761. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1918>.
- Fonseca-Silva, F., et al., 2016. Oral efficacy of Apigenin against cutaneous leishmaniasis: involvement of reactive oxygen species and autophagy as a mechanism of action. *PLoS neglected tropical diseases.* 10 (2), e0004442. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004442>.
- Franca-Costa, J., et al., 2012. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS one* 7 (5), e36595. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036595>.
- Frangioni, J.V., 2003. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (5), 626–634.
- Handler, M.Z., et al., 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: clinical perspectives. *J. Am. Acad. Dermatol.* 73 (6), 897–908 (quiz 909–10.1016/j.jaad.2014.08.051).
- Hilderbrand, S.A., Weissleder, R., 2010. Near-infrared fluorescence: application to *in vivo* molecular imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (1), 71–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.029>.
- Kaye, P., Scott, P., 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (8), 604 (15.10.1038/nrmicro2608).
- Kevric, I., Cappel, M.A., Keeling, J.H., 2015. New world and old world Leishmania infections: a practical review. *Dermatol. Clin.* 33 (3), 579–593. <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>.
- Marlow, M.A., et al., 2013. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. *PLoS One* 8 (2), e56177. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056177>.
- Mehta, S.R., et al., 2008. 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.* 15 (12), 1764–1770. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00270-08>.
- Michel, G., et al., Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011. 5(9): p. e1323.10.1371/journal.pntd.0001323.
- Millington, O.R., et al., 2010. Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 126 (3), 310–317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.05.014>.
- Reimao, J.Q., et al., 2013. Parasite burden in *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. *J. Microbiol. Methods* 93 (2), 95–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.02.007>.
- Rocha, M.N., et al., 2013. An alternative *in vitro* drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75 (3), 282–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.018>.
- Shcherbakova, D.M., Verkhusha, V.V., 2013. Near-infrared fluorescent proteins for multi-color *in vivo* imaging. *Nat. Methods* 10 (8), 751–754. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2521>.
- Shcherbakova, D.M., Balaban, M., Verkhusha, V.V., 2015. Near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Acta Pharm. Sin. B* 27, 52–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.005>.
- Shcherbo, D., et al., 2010. Near-infrared fluorescent proteins. *Nat. Methods* 7 (10), 827–829. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1501>.
- Shu, X., et al., 2009. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324 (5928), 804–807. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1168683>.
- Sousa, L.M., et al., 2014. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 36 (1), 13–31. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12078>.
- Tong, H., Lou, K., Wang, W., 2015. Near-infrared fluorescent probes for imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Acta Pharm. Sin. B* 5 (1), 25–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2014.12.006>.
- Trinconi, C.T., et al., 2016. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (5), 1314–1322. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv495>.
- Zerpa, O., et al., 2007. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br. J. Dermatol.* 156 (6), 1328–1335. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07872.x>.