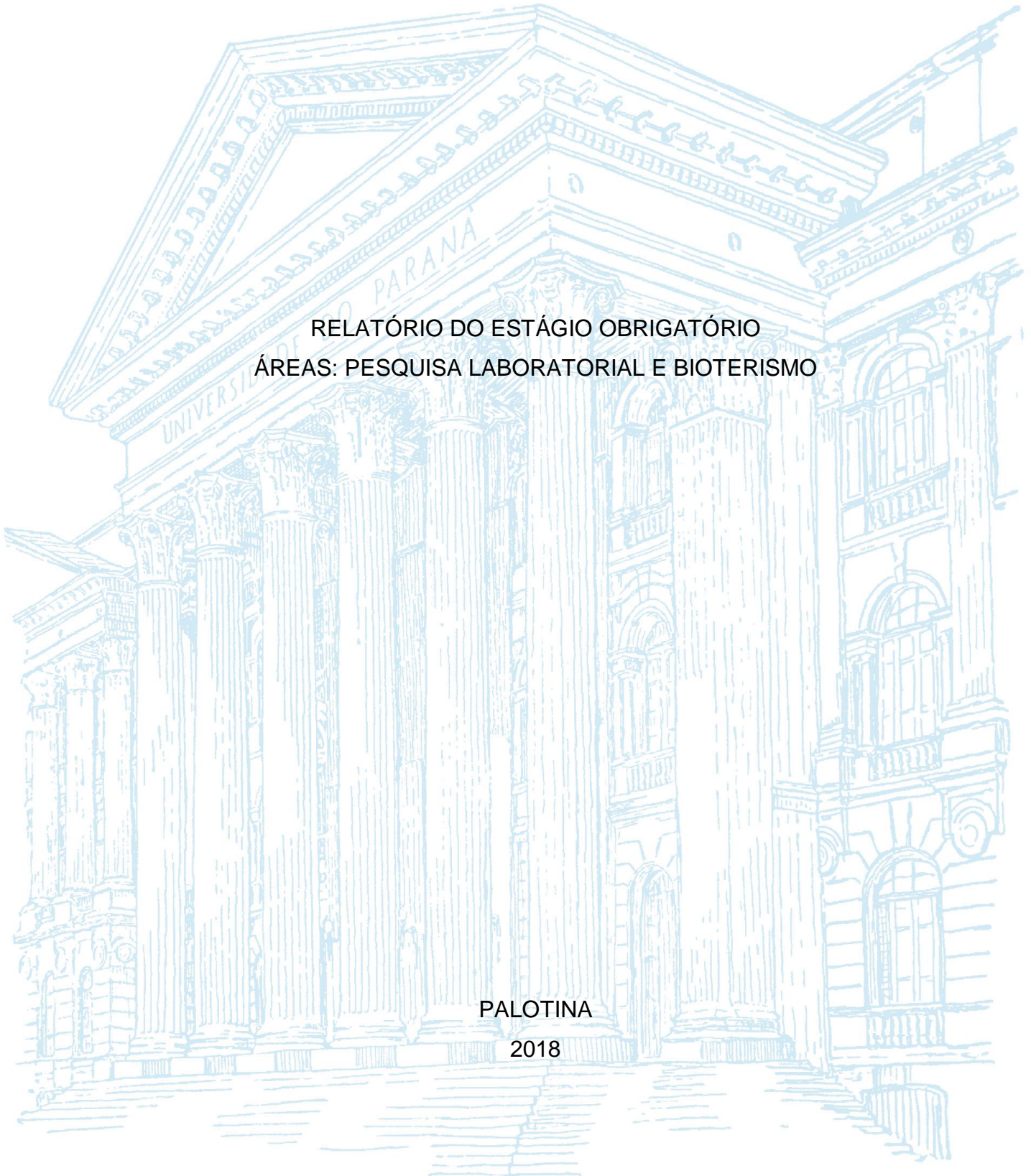


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

THAMIRES MARCANTE

RELATÓRIO DO ESTÁGIO OBRIGATÓRIO
ÁREAS: PESQUISA LABORATORIAL E BIOTERISMO

PALOTINA
2018



THAMIRES MARCANTE

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO OBRIGATÓRIO
ÁREAS: PESQUISA LABORATORIAL E BIOTERISMO**

Relatório de Estágio Obrigatório apresentado como parte das exigências para a conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Orientadora: Prof^a Dra. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro

Supervisores: Dr. Fabiano Borges Figueiredo e Iselen Abreu Florentino Ivanoski


PALOTINA
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**


**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO**

**Área: Pesquisa Laboratorial e Bioterismo
Aluno: Thamires Marcante GRR: 20144700
Orientador(a): Profª Dra. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro
Supervisores: Dr. Fabiano Borges Figueiredo e
Iselen Abreu Florentino Ivanoski**

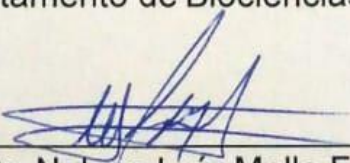
O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:



Prof(a) Dra. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro
Orientadora



MSc. Jéssica Cristine Gallego
Departamento de Biociências – UFPR



Prof Dr. Nelson Luís Mello Fernnades
Departamento de Ciências Veterinárias – UFPR

Palotina, 22 de novembro de 2018

FOLHA DE IDENTIFICAÇÃO

LOCAL DE ESTÁGIO I: Instituto Carlos Chagas - Fiocruz

Curitiba - Paraná

Carga horária cumprida: 360 horas

Período de realização do estágio: 09/07/2018 a 28/09/2018

Supervisor: M.V. Dr. Fabiano Borges Figueiredo

Orientadora: Prof^a Dra. Erica Cristina B. P. Guirro

LOCAL DE ESTÁGIO II: Biotério Central da Universidade Federal do Paraná,

Campus Biológicas

Curitiba - Paraná

Carga horária cumprida: 80 horas

Período de realização do estágio: 08/10/2018 a 19/10/2018

Supervisora: M.V. Iselen Abreu Florentino Ivanoski

Orientadora: Prof^a Dra. Erica Cristina B. P. Guirro

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada,
ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço do fundo do meu coração a minha família, meu pai Neocir Marcante, minha mãe Salete Aparecida Selleri Marcante e minhas irmãs Greicy Fernanda Marcante e Thainara Cristina Marcante por toda dedicação que tiveram comigo, pelas palavras de incentivo e conforto, pelo carinho, por nunca terem medido esforços para eu conseguir realizar esta etapa muito importante e por serem meu porto seguro nos momentos difíceis, sei que sem vocês não conseguiria chegar até aqui, amo muito vocês!

Aos meus amigos que se fizeram uma família enquanto estive em Palotina, quero agradecer por me darem a oportunidade de fazer parte das suas vidas, pelas longas conversas, pelos trabalhos feitos em equipe, por estarem ao meu lado compartilhando momentos de alegria e tristeza, Mariana Reffatti de Oliveira, Larissa Martarella de Souza Mello, Ana Luísa Honda, Ruana Renostro Delai, Felipe Eduardo Dal Mas, Matheus Morillo Bär, Debora Regina Zancanaro e a todos os colegas da XXVII turma de Medicina Veterinária UFPR- Setor Palotina, por toda ajuda e companheirismo que tivemos.

A minha orientadora Erica Cristina Bueno do Prado Guirro, pela excelente orientação, pelo voto de confiança em ter me aceitado como orientada e por toda ajuda e dedicação que teve comigo durante todo o período da minha formação! Você se tornou uma pessoa muito especial em minha vida! Muito obrigada por tudo!

A todos os professores da UFPR – Setor Palotina que estiveram presentes nestes anos de graduação, por todo o ensinamento e dedicação, nos repassando seus preciosos conhecimentos.

Aos meus supervisores de estágio Fabiano Borges Figueiredo e Iselen Abreu Florentino Ivanoski, assim como aos colegas de estágio agradeço por cada ensinamento, repassado com toda paciência e boa vontade. Cada conselho e ensinamento serão de extrema importância na minha vida profissional. Muito obrigada por me aceitarem como estagiária!

E por fim, agradeço por todos os animais que passarem pela minha vida, contribuindo para o meu aprendizado e formação acadêmica.

RESUMO

O presente Relatório de Estágio Obrigatório apresenta as atividades desenvolvidas na disciplina de Estágio Obrigatório, realizado no período de 09 de julho a 19 de outubro de 2018, sob orientação da Prof^a Dr^a Erica Cristina Bueno do Prado Guirro da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Setor Palotina. O estágio foi dividido em duas etapas, sendo a primeira, na área de pesquisa laboratorial realizada no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz) em Curitiba/PR, no período de 09 de julho a 28 de setembro de 2018, sob supervisão do Médico Veterinário Dr. Fabiano Borges Figueiredo. Já a segunda etapa foi realizada na área de bioterismo, realizada no Biotério Central da UFPR em Curitiba/PR de 08 a 19 de outubro de 2018, sob supervisão da Médica Veterinária Iselen Abreu Florentino Ivanoski. O presente trabalho descreve o acompanhamento da fase experimental de dois trabalhos de iniciação científica intitulados “Avaliação *in vitro* da atividade anti-Leishmania do óxido nítrico e própolis brasileira em *L. braziliensis*” e o “Avaliação *in vitro* da resistência à miltefosina em isolados de *Leishmania (Leishmania) infantum* provenientes de casos caninos e humanos em diferentes áreas endêmicas do Brasil” e um projeto de Estágio Obrigatório utilizando o ensaio colorimétrico MTT. Também descreve o acompanhamento de sexagem e desmame de *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar e de *Mus musculus*, linhagem Swiss, realizados no Biotério Central da UFPR. Além disso, caracteriza os locais de estágio, suas estruturas e funcionamento, traz uma breve revisão bibliográfica e discussão do que foi acompanhado.

Palavras-chaves: Estágio Obrigatório. Fiocruz. Laboratório de biologia celular. Biotério.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Vista frontal do Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, em Curitiba/PR.	16
FIGURA 2 – Vista frontal do Biotério Central da UFPR, em Curitiba/PR.....	18
FIGURA 3 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp. no flebotomíneo e no ser humano. Disponível em: http://www.parasitandonaweb.xpg.com.br/leishmania.html , acesso em 10 nov. 2018.....	21
FIGURA 4 - Garrafas de 25cm ² utilizada para cultivo de <i>Leishmania</i> spp. no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz.....	25
FIGURA 5 – Garrafas para cultura de <i>Leishmania</i> spp. contendo em seu interior meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) utilizadas no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz.....	26
FIGURA 6 – Processo de filtração do meio Schneider em sistema a vácuo com membrana filtrante de 0,22µm no fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas - ICC/Fiocruz.....	27
FIGURA 7 - Processo de filtração do meio RPMI-1640 em sistema a vácuo com membrana filtrante de 0,22µm no fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas - ICC/Fiocruz.....	28
FIGURA 8 – Caixa criogênica contendo criotubos que são mantidos numa rack no interior do container de nitrogênio líquido na sala de Freezers do Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz.	29
FIGURA 9 - Processo de descongelamento de <i>Leishmania braziliensis</i> na sala de Freezers do Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz. A- Retirada da rack do interior do container de nitrogênio líquido B- rack do container de nitrogênio líquido.	30
FIGURA 10 - Pipetagem de meio de cultura Schneider suplementado no criotubo sobre as <i>Leishmania infantum</i> congeladas, para o descongelamento, realizado no fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz.....	31
FIGURA 11 – Curva de crescimento, estabelecida pela contagem na câmara de Neubauer de <i>Leishmania infantum</i> , em meio de cultura Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) sendo um deles preparado com sangue de coelho e outro de carneiro.....	33
FIGURA 12 – Materiais utilizado no teste de triagem para diagnóstico de Leishmaniose. A direita da imagem observa-se os materiais inclusos no kit do teste rápido de Dual Path Platform (TR- DPP®), contendo um suporte Dual Path Platform	

(DPP®), 20 alças coletoras descartáveis (5µL) e um frasco de tampão de corrida (6mL) e a esquerda o dispositivo de leitura óptica Dual Path Platform (DPP®).....	34
FIGURA 13 – Teste Rápido Dual Path Platform (DPP®), realizados com soros de cães. A - suporte de DPP® representando um resultado reagente. B - suporte de DPP® representando um resultado não reagente.....	35
FIGURA 14 – Equipamento Operetta CLS™, PerkinElmer®, localizado na sala de Equipamentos I no Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz em Curitiba/PR.....	38
FIGURA 15 – Centrifuga de placas, Eppendorf® modelo 5810 R, localizada na Sala de Equipamentos II no Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz em Curitiba/PR. A- centrifuga; B- placas de 96 poços posicionadas no interior da centrifuga.....	42
FIGURA 16 – Aspecto visual da placa de 96 poços após finalizado o ensaio de MTT com <i>Leishmania infantum</i> cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um Controle Negativo, todos grupos realizados em quintuplicata.....	42
FIGURA 17 – Resultados da PLACA 1 analisados no GraphPad sobre o ensaio de MTT com <i>Leishmania infantum</i> cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um Controle Negativo, demonstradas na figura em Log ⁻¹	43
FIGURA 18 – Resultados da PLACA 2 analisados no GraphPad sobre o ensaio de MTT com <i>Leishmania infantum</i> cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um Controle Negativo, demonstradas na figura em Log ⁻¹	44
FIGURA 19 – Resultados da PLACA 3 analisados no GraphPad sobre o ensaio de MTT com <i>Leishmania infantum</i> cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um Controle Negativo, demonstradas na figura em Log ⁻¹	44
FIGURA 20– Sistema de racks ventiladas para manutenção de ratos em reprodução/maternidade no Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.	48
FIGURA 21 – Realização de sexagem pela distancia ano-genital, em camundongos da espécie <i>Mus musculus</i> , linhagem Swiss. A- Observa-se uma distancia ano-genital grande, conferindo a este animal a característica de um macho. B- Observa-se uma distância ano-genital pequena, conferindo a característica de uma fêmea.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CN – Controle Negativo

DAT – Testes de Aglutinação Direta

DMSO – Sulfóxido de Dimetil

ED50 – Dose terapêutica em 50% dos parasitas

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz

HCl – Ácido Clorídrico

HEPES – 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

ICC – Instituto Carlos Chagas

LBC – Laboratório de Biologia Celular

LC – Leishmaniose Cutânea

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LV – Leishmaniose Visceral

M.V – Medico(a) Veterinário(a)

MOI – Multiplicidade de Infecção

MS – Ministério da Saúde

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NB – Nível de Segurança Biológica

NNN – Meio Novy-MacNeal-Nicolle

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PMA – Phorbol12-myristate-13-acetate

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

SDS – Sodium dodecyl sulfate

SFB – Soro Fetal Bovino

THP-1 – Human Acute Monocytic Leukemia Cells

UFPR – Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentual

μm - micrometro

cm^2 - centímetro quadrado

mg - miligrama

mg/mL - miligrama por mililitro

μg - micrograma

$\mu\text{g/mL}$ - micrograma por mililitro

mL - mililitro

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

pH - potencial hidrogeniônico

rpm - rotações por minutos

ng- nanograma

® - marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. LOCAIS DE ESTÁGIO	15
2.1 Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz	15
2.1.1 Estrutura do Instituto Carlos Chagas	16
2.1.2 O Laboratório de Biologia Celular	17
2.2 Biotério Central da UFPR	18
2.2.1 Funcionamento e Estrutura do Biotério Central da UFPR	19
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO	20
3.1 Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz	20
3.1.1 Repique de THP-1	23
3.1.2 Repique de <i>Leishmania</i> spp.	24
3.1.3 Preparo meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)	26
3.1.4 Preparo de Meio de cultura Schneider’s Insect Medium suplementado	26
3.1.5 Preparo de meio RPMI-1640 suplementado	27
3.1.6 Congelamento de <i>Leishmania</i> spp. ou de células TPH-1	28
3.1.7 Descongelamento de <i>Leishmania</i> spp. ou células TPH-1	29
3.1.8 Preparo do composto <i>Caryocar braziliense</i>	31
3.1.9 Preparo da solução de SDS 10% em 0,01M de HCl	32
3.1.10 Análise de curva de crescimento	32
3.1.11 Dual Path Platform (DPP®)	33
3.1.12 Diferenciação de células THP-1 em macrófagos	35
3.1.13 Infecção dos macrófagos com <i>Leishmania</i> spp.	36
3.1.14 Tratamento de amastigotas intracelulares	37
3.1.15 Fixação e coloração das células	38
3.1.16 Contagem das células	38
3.1.17 Acompanhamento de projetos	39
3.1.17.1 “Avaliação <i>in vitro</i> da resistência à miltefosina em isolados de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> provenientes de casos caninos e humanos em diferentes áreas endêmicas do Brasil”	39
3.1.17.2 “Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti- <i>Leishmania</i> do oxido nítrico e própolis brasileira em <i>Leishmania braziliensis</i> ”	40
3.1.19 Projeto de Estágio Obrigatório no ICC utilizando o ensaio colorimétrico MTT	40
3.2 Biotério Central UFPR - Curitiba	46

3.2.1 Rotina de manejo dos animais	47
3.2.2 Manejo reprodutivo	49
3.2.3 Eutanásia	50
4. DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA	51
4.1 Instituto Carlos Chagas – (ICC/Fiocruz).....	51
4.2 Biotério Central UFPR- Curitiba.....	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

O estágio obrigatório faz parte do currículo do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina, ocorrendo no último semestre da graduação. O estágio é de extrema importância na preparação dos acadêmicos para o mercado de trabalho visto que, objetiva colocar em prática o aprendizado, assim como complementar e aprimorar os conhecimentos adquiridos na graduação.

Após o acadêmico escolher a área que possui grande afinidade e interesse, é realizado, junto ao seu orientador, a escolha dos locais para se realizar o estágio. Optou-se por dividir o estágio obrigatório em duas etapas. A primeira parte foi realizada no Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, localizado em Curitiba/PR, no Laboratório de Biologia Celular, sob a supervisão do M.V. Dr. Fabiano Borges Figueiredo. Já a segunda etapa foi realizada no Biotério Central da UFPR, localizado em Curitiba/PR, na área de bioterismo, sob a supervisão da M.V. Iselen Abreu Florentino Ivanoski. Em ambas as etapas do estágio a orientação coube à Prof^a Dr^a Erica Cristina B. P. Guirro.

Este Relatório de Estágio Obrigatório tem por objetivo o relato dos locais de estágio, as atividades realizadas e a casuística acompanhada, embasados em uma breve revisão de literatura.

2. LOCAIS DE ESTÁGIO

2.1 Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz

A primeira parte do estágio obrigatório foi realizada no Instituto Carlos Chagas (ICC) (FIGURA 1) que está localizado no campus do Instituto Tecnológico do Paraná (Tecpar), na Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, nº 3775, Bloco C, Cidade Industrial, em Curitiba/PR.

O estágio teve início dia 09 de julho e término em 28 de setembro de 2018. Foram cumpridas 30 horas semanais de estágio, totalizando 360 horas. As atividades desenvolvidas no estágio foram realizadas de segunda a sexta-feira, das 9h00 as 12h00 e das 14h00 as 17h00.

O ICC é considerado uma das 10 unidades técnico-científica regionais da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, no Paraná, coordenado pelo diretor Bruno Dallagiovanna. É um centro de pesquisa vinculado ao Ministério da Saúde (MS) que visa combater os problemas de saúde pública brasileira em função do Sistema Único de Saúde (SUS). O Instituto atua na promoção da saúde e no desenvolvimento social, na geração e difusão do conhecimento científico e tecnológico.

A inauguração do ICC foi realizada em março de 2008, porém teve sua origem em 1999 com a criação do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, o qual foi resultado de uma parceria entre o governo do Estado e a Fiocruz.

A Fiocruz tem um produtivo e bem instalado centro de pesquisa, atua em diversas áreas como na de bioquímica, biologia molecular e biologia celular de agentes infecciosos e seus hospedeiros, no estudo da regulação da expressão gênica de micro-organismos e parasitas, na caracterização molecular de células tronco, em virologia molecular e em biotecnologia (FIOCRUZ, 2018).

FIGURA 1 - Vista frontal do Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz, em Curitiba/PR.



FONTE: A autora (2018).

2.1.1 Estrutura do Instituto Carlos Chagas

O ICC conta com vários laboratórios bem equipados para o desenvolvimento de projetos nas áreas de biologia celular e molecular, laboratórios especializados para o cultivo de bactérias, parasitas, leveduras, células não infectadas e infectadas com vírus, cultivo de células-tronco e um laboratório de nível de segurança biológica 3 (NB-3).

Os laboratórios de apoio à pesquisa presentes são os seguintes:

- Laboratório de Biologia Celular
- Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas
- Laboratório de Biologia Básica de Células Tronco
- Laboratório de Regulação da Expressão Gênica
- Laboratório de Virologia Molecular
- Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos
- Laboratório de Genômica Funcional

Existem, ainda, 12 laboratórios de apoio para dar suporte ao desenvolvimento das pesquisas científicas, sendo eles:

- Equipamentos I e II;
- Fungos Patogênicos;
- Cultivo de Parasitas;
- Cultivo Celular;
- Radioatividade;
- Freezer;
- Cultivo de Bactérias;
- Cristalografia;
- Pesagem;
- Preparação e Água;
- Cultivo viral; e
- Preparo e lavagem de Material I e II.

2.1.2 O Laboratório de Biologia Celular

O Laboratório de Biologia Celular (LBC) possui uma equipe técnica formada por um Médico Veterinário, uma pós-doutoranda, uma analista de laboratório II, dois doutorandos e duas alunas de iniciação científica. O LBC fica aberto todos os dias da semana por 24 horas, porém apenas pessoas autorizadas do ICC tem acesso a este nos finais de semana e feriados.

O LBC ocupa cerca de 50 m² e fica localizado no segundo andar do ICC. Nele há uma capela de exaustão de gases para os procedimentos com produtos voláteis e nocivos ao trato respiratório, um fluxo laminar NB2, duas estufas (mantidas uma a 25°C e outra a 60°C), dois microscópios de luz, uma lupa, uma centrífuga de bancada para tubos de 15 e 50 mL, duas centrífugas de bancada para tubos de 1,5mL, um banho-maria, um micro-ondas, um termo bloco, dois homogeneizadores de tubos, duas fontes para corrida de eletroforese, equipamento para leitura de placa de ELISA associado a um computador com monitor, duas balanças (sendo uma de precisão), dois agitadores magnéticos com aquecimento, um pHmetro, uma placa homogeneizadora, duas micro centrífugas de bancada, uma bomba de vácuo, uma micro centrífuga de placa, uma cabine de segurança exclusiva para trabalhar com RNA, três geladeiras e um freezer vertical. Ainda, uma pia, oito bancadas de experimentação e/ou trabalho, dois computadores com acesso

à rede e internet, sendo um deles com dois monitores e software Photoshop para edição de imagens e um scanner.

2.2 Biotério Central da UFPR

A segunda parte do estágio foi realizada no Biotério Central da UFPR (FIGURA 2), Campus Biológicas, localizado na Av. Cel. Francisco Heráclito dos Santos nº 100, Jardim das Américas em Curitiba/PR. O estágio ocorreu no período de 08 a 19 de outubro de 2018 e foi realizado de segunda a sexta-feira, das 8h00 as 12h00 e das 13h00 as 17h00, totalizando 40 horas semanais. A carga horária total de estagio no Biotério Central da UFPR foi de 80 horas.

A fundação do Biotério Central da UFPR ocorreu em 1982 pelo Professor Oldemir Carlos Mangili devido a necessidade da criação e uso de animais de laboratório pelos acadêmicos dos cursos do departamento de ciências biológicas e da saúde. No entanto com o aumento da demanda e exigências, atualmente, o biotério conta com um novo edifício, inaugurado em 2016, que fornece animais para professores e acadêmicos das áreas de biologia celular, bioquímica, farmacologia, fisiologia, medicina e patologia básica.

FIGURA 2 – Vista frontal do Biotério Central da UFPR, em Curitiba/PR.



FONTE: A autora (2018).

2.2.1 Funcionamento e Estrutura do Biotério Central da UFPR

O Biotério Central possui uma equipe técnica formada por uma médica veterinária possuindo a função de responsável técnica, uma bioterista, sendo ela bióloga, um auxiliar de escritório, além de contar com sete tratadores de animais e um operador de máquinas. O biotério fica aberto para funcionamento e atendimento ao público de segunda a sexta-feira, das 08h00 as 12h00 e das 13h00 as 17h00.

O edifício possui dois pavimentos sendo o térreo composto por uma recepção, sala administrativa, sala de recepção dos animais, área de lavagem, higienização e esterilização de materiais, sala de preparo de materiais, sala de depósito de materiais, ração e insumos, um laboratório, vestiários e 14 salas de criação de animais, destas 10 estavam em uso, sendo uma de reprodução e estoque de camundongos, três de reprodução de ratos, uma de maternidade de ratos, duas de estoque de ratos fêmeas e três de estoque de ratos machos. Já o primeiro andar do edifício é reservado apenas para experimentação animal, possuindo 15 salas de experimentação, porém ainda não foram liberadas para uso.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

3.1 Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz

Durante o estágio foi possível acompanhar diversas atividades relativas a *Leishmania* spp. e células THP-1.

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças parasitárias negligenciada pelo homem, causada por 20 espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes à família *Trypanosomatidae*, transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*. Não há vacina disponível contra a leishmaniose humana e ações para combater a doença são restritas ao controle vetorial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018).

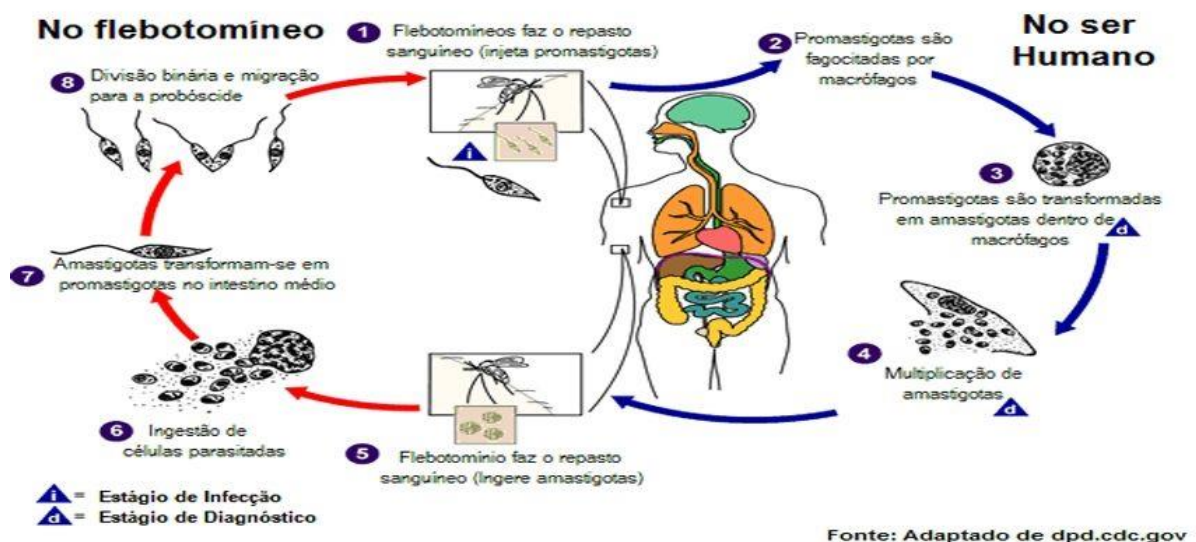
A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera 97 países e territórios endêmicos para leishmaniose e estima-se que há 12 milhões de pessoas infectadas com *Leishmania* spp. no mundo, apresentando ou não sinais clínicos. Anualmente surgem 700.000 a um milhão de casos novos e 20.000 a 30.000 mortes no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018).

Segundo a OMS, a leishmaniose está associada a populações pobres, desnutrição, moradias precárias, ao deslocamento populacional, sistema imunológico debilitado, a falta de recursos financeiros, mudanças ambientais como desmatamento e construção de barragens e urbanização. No Brasil a maior prevalência se dá nas regiões norte e nordeste, porém também acomete as regiões centro-oeste, sudeste e sul (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). Os investimentos na pesquisa pelo desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento é baixo e os tratamentos disponíveis no mercado apresentam problemas como a resistência do parasita, indução de efeitos adversos no paciente e sua eficácia (BLANCO, JUNIOR, 2017 e DELORENZI, 2018).

Conforme observado na FIGURA 3, o ciclo de vida do parasito apresenta duas fases principais, uma dentro do flebotomíneo e outra do hospedeiro. A leishmaniose é transmitida através da picada da fêmea do flebotomíneo que se infecta durante o repasto sanguíneo, adquirindo a forma amastigota do hospedeiro vertebrado. A *Leishmania* spp. chega ao tubo digestivo do vetor e é transformada na forma flagelada ou promastigota. Quando ocorre a picada a *Leishmania* spp migra para a faringe do flebotomíneo e é inoculada na corrente sanguínea do

hospedeiro vertebrado, onde segue para os órgãos linfoides secundários, principalmente fígado, baço, linfonodos e medula óssea. A *Leishmania* spp. infecta as células do sistema fagocitário mononuclear, passando para fase amastigota, que é intracelular obrigatória. Nas células, o parasita passa por diversas divisões binárias causando a lise da célula e disseminam-se pelas vias hematogena e linfáticas para infectar outras células, momento no qual se inicia uma reação inflamatória e imunológica no hospedeiro, que pode começar a exibir os sinais clínicos. Os reservatórios incluem seres humanos, roedores, cães, lobos e raposas. Répteis e anfíbios são com menos frequência reservatórios de infecção (BLANCO, JUNIOR, 2017 e ROCHA, PETRONI, 2017).

FIGURA 3 – Ciclo biológico da *Leishmania* spp. no flebotomíneo e no ser humano. Disponível em: <http://www.parasitandonaweb.xpg.com.br/leishmania.html>, acesso em 10 nov. 2018.



Existem três diferentes tipos de leishmaniose sendo elas: a cutânea, a mucocutânea e a visceral ou calazar.

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar é uma zoonose, considerada uma doença crônica grave e potencialmente fatal, causada pela *Leishmania (leishmania) donovani* e *L. (leishmania) infantum* e tem como hospedeiros definitivos os canídeos e o homem (GONTIJO, MELO, 2004).

O diagnóstico de LV no cão, feito pelo médico veterinário, é desafiador devido aos animais apresentarem variados sinais clínicos, podendo estar aparentemente saudável, com poucos sinais clínicos ou em estágios severos da

doença (GONTIJO, MELO, 2004). Esse parasita afeta principalmente o fígado e o baço promovendo esplenomegalia e hepatomegalia (CARVALHO et al., 2000).

Para o diagnóstico parasitológico de LV pode ser utilizado o material de punção aspirativa ou biópsia do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, utilizados para a confecção de esfregaço em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido. O diagnóstico pode ser utilizando testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA), cada qual difere na sensibilidade e especificidade (GONTIJO, MELO, 2004).

Para o ser humano o tratamento realizado de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, e o alternativo são a anfotericina B, miltefosina, paramomicina e pentamidina. No entanto, todas essas drogas exibem toxicidade. No caso de cães infectados recomenda-se a eutanásia ou o tratamento com Milteforan, licenciado pela empresa Virbac Saúde Animal, que foi autorizado pelo MS e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS. No entanto, deve-se levar em consideração que a terapia pode proporcionar o desaparecimento dos sinais clínicos do cão, mesmo este ainda sendo portador da doença, continuando como fontes de infecção para o vetor e, portanto um risco para saúde da população humana e canina além de ter risco de selecionar parasitos resistentes a droga (ROCHA, PETRONI, 2017).

A Leishmaniose Cutânea (LC) tende a ser menos severa, não sendo uma ameaça a vida, desenvolvendo lesões cutâneas em forma de ulcera ou pápula, na área de cada picada do vetor, raramente progride para mucocutânea. É causada pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. mexicana*, *L. (V.) panamensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. (Leishmania) amazonensis* (ROCHA, PETRONI, 2017).

Já a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) é potencialmente fatal causada pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*. A forma clinica é dependente da imunossupressão do hospedeiro e da virulência do parasita. O paciente poderá apresentar lesões nas

mucosas e cartilagens nasais, bucal, da laringe e faringe, que podem ser resultante da extensão das lesões cutâneas (ROCHA, PETRONI, 2017).

O tratamento de primeira escolha para LC e LMC é realizado com Antimoniato de N-metilglucamina e a de segunda escolha com Anfotericina B. O diagnóstico pode ser clínico com base nas características das lesões, anamnese e dados epidemiológicos associados a exames histopatológicos de biópsia da borda da lesão e teste PCR (ROCHA, PETRONI, 2017).

As atividades desenvolvidas durante o estágio no Laboratório de Biologia Molecular do ICC eram associadas a diagnósticos e tratamentos de leishmaniose. Segue abaixo a descrição das atividades.

3.1.1 Repique de THP-1

As células denominadas Human Acute Monocytic Leukemia Cells (THP-1) são consideradas da linhagem de monócitos e foram obtidas de sangue periférico de criança do sexo masculino, com um ano de idade, portador de leucemia monocítica aguda.

As células THP-1 eram cultivadas em garrafas com meio Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) suplementado e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada de 5% CO₂ e umidade, localizada no Laboratório de Cultivo de Parasitas. Após serem localizadas na estufa eram, primeiramente, observadas em microscópio ótico invertido o aspecto das células em cultivo, certificando que estas estavam livres de contaminação. Assim que certificado a ausência, as culturas eram transferidas ao LBC dentro de uma caixa de transporte para se realizar o repique.

No fluxo laminar era coletado todo volume da garrafa de cultura e dispensado em um tubo de fundo cônico de 15mL, centrifugado a 200g por 8 minutos, descartado o sobrenadante e ressuspendido o pellet com leves batidas no tubo e acrescentado 2mL de meio novo.

Para realização da contagem em microscópio de luz ótico, eram diluídos em um tubo de 1,5mL, os 10µL das células em 90µL de meio RPMI-1640 ou solução de paraformaldeído. Após homogeneização eram pipetados 10µL dessa solução na Câmara de Neubauer.

Para contagem era levado em conta a diluição feita (1:10) e o fator de diluição da câmara (10^4). Segue um exemplo do cálculo para obter o número de células necessários no repique:

Considerando que a contagem na Câmara de Neubauer resultou em 200 células nos 4 campos laterais, esse valor era dividido por 4, resultando em 50 células, esse valor encontrado era multiplicado pelo fator de diluição realizado (1:10) e pelo fator de diluição da câmara (10^4), resultando em 5×10^6 células/mL. Para o repique era utilizado a concentração $1,5 \times 10^5$ células/mL em garrafas de 25cm², considerando que o volume final era de 5mL, a densidade final era $7,5 \times 10^5$ células. Assim, se em 1000µL havia 5×10^6 células, em 1500µL tinham $7,5 \times 10^5$ células. Portanto, segundo o exemplo, foi necessário pipetar 1500 µL de células TPH-1 e completando o volume para 5mL com meio, ou seja, com 3500 µL de meio RPMI-1640.

Finalizando o repique, a nova garrafa era homogeneizada e incubada na estufa a 37°C, 5% CO₂ e umidade. Este procedimento denominado repique era repetido a cada três dias, para manter a viabilidade das células.

3.1.2 Repique de *Leishmania* spp.

As *Leishmania* spp. eram mantidas em garrafas de culturas com meio Schneider suplementado em estufa a 25°C com atmosfera controlada de 5% CO₂ e umidade, no Laboratório de Cultivo de Parasitas (NB2). Após serem localizadas na estufa eram, primeiramente, observadas em microscópio ótico invertido o aspecto das *Leishmania* spp. em cultivo, certificando que estas estavam livres de contaminação. Assim que certificado a ausência, as culturas eram transferidas ao LBC dentro de uma caixa de transporte para se realizar o repique.

No fluxo laminar era coletado todo volume da garrafa de cultura e dispensado em um tubo de fundo cônico de 15mL, centrifugado a 3000g por 5 minutos, descartado o sobrenadante e ressuspendido o pellet com leves batidas no tubo e acrescentado 2mL de meio Schneider suplementado.

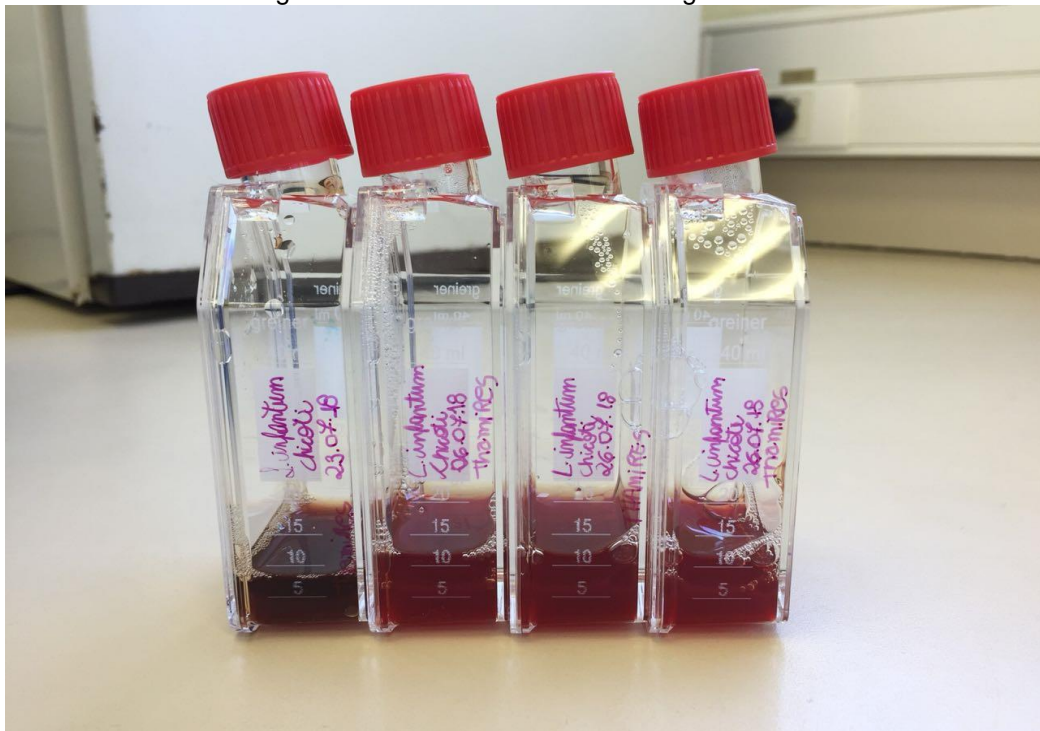
Para realização da contagem em microscópio ótico, eram diluídos em um tubo de 1,5mL, os 10µL das parasitas em 90µL de meio Schneider ou solução de paraformaldeído. Após homogeneização eram pipetados 10µL dessa solução na Câmara de Neubauer.

Para contagem era levado em conta a diluição feita (1:10) e o fator de diluição da câmara (10^4). Segue um exemplo de um cálculo para obter o número de células necessários no repique:

Considerando que a contagem na Câmara de Neubauer resultou em 200 parasitas nos 4 campos laterais, esse valor era dividido por 4, resultando em 50 parasitas, esse valor encontrado era multiplicado pelo fator de diluição realizado (1:10) e pelo fator de diluição da câmara (10^4), resultando em 5×10^6 parasitas/mL.

Para o repique de *Leishmania* spp. era utilizado a densidade 1×10^6 parasitas/mL em garrafas de 25cm² (FIGURA 4), considerando que o volume final era de 5mL, a densidade final era 5×10^6 parasitas.

FIGURA 4 - Garrafas de 25cm² utilizada para cultivo de *Leishmania* spp. no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz.



FONTE: A autora (2018).

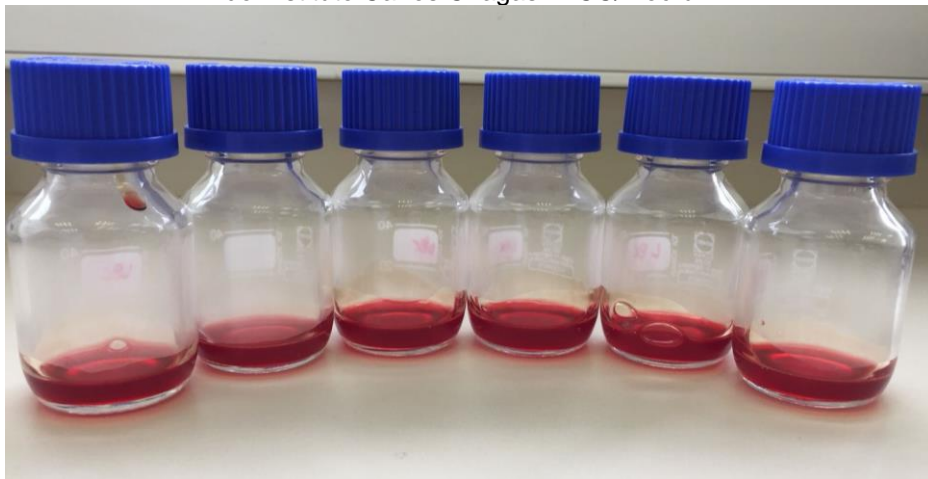
Assim, se havia 5×10^6 parasitas em 1000 μ L, foi necessário pipetar aproximadamente 1000 μ L de *Leishmania* spp., completando o volume para 5mL com meio, ou seja, com 4000 μ L de meio Schneider suplementado.

Finalizando o repique, a nova garrafa era homogeneizada e incubada na estufa a 25°C, 5% CO₂ e umidade. Este procedimento denominado repique era repetido a cada sete dias, para manter a viabilidade dos parasitas.

3.1.3 Preparo meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)

Este procedimento foi realizado no fluxo laminar do LBC, pois este deveria se manter estéril. Para o preparo do meio foi utilizado a proporção de 90% Ágar-ágar e 10% de sangue de coelho ou carneiro fresco refrigerado. Estas soluções foram homogeneizadas em um frasco e adicionadas nos recipientes utilizados para cultura de *Leishmania* spp. e após o meio solidificar os recipientes foram mantidos armazenados refrigerados, prontos para o uso. No preparo de 20 garrafas de 25cm² (FIGURA 5), por exemplo, homogeneizou-se 90mL de Ágar-ágar com 10mL de sangue de coelho fresco refrigerado e pipetou-se 4 a 5mL deste meio por garrafa.

FIGURA 5 – Garrafas para cultura de *Leishmania* spp. contendo em seu interior meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) utilizadas no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz.



FONTE: A autora (2018).

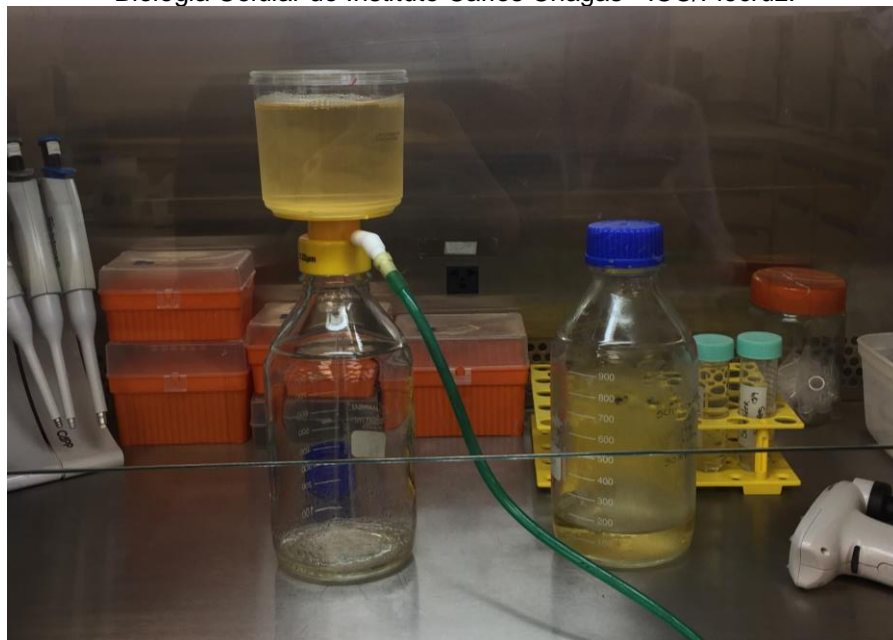
3.1.4 Preparo de Meio de cultura Schneider's Insect Medium suplementado

O meio de cultura Schneider's Insect Medium era utilizado especificamente para o crescimento e manutenção das linhagens celulares de *Leishmania* spp. e era preparado seguindo as instruções do fabricante Sigma-Aldrich®. Para o preparo de 1L de meio, era adicionado lentamente, sob agitação, um sachê de meio Schneider Sigma® com L-glutamina, sem cloreto de cálcio (CaCl₂) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃) em 800mL de água purificada entre 15-20°C. Após completa solubilização era acrescentado 0,4g de NaHCO₃ sob agitação e realizado, com auxílio do aparelho de pHmetro, o ajuste do pH para $9,2 \pm 0,2$. Após 10 minutos sob agitação a solução se tornava turva e era realizado novamente o ajuste do pH, sob agitação, para $6,7 \pm$

0,2 o que tornava a solução mais límpida. Era adicionado lentamente, sob agitação vigorosa, para evitar formação de precipitados, uma solução previamente preparada de 0,6g de cloreto de cálcio (CaCl_2) dissolvido em 50mL de água purificada. Foi completado o volume de 1L com água purificada e ajustado o pH, novamente, agora para 0,1 a 0,3 unidades de pH abaixo do pH desejado (7,2 á 7,4). No fluxo laminar do LBC foi realizado a esterilização do meio através da filtração em sistema a vácuo com membrana filtrante de 0,22 μm (FIGURA 6).

Ainda no fluxo laminar, foi realizado a suplementação do meio Schneider estéril preparado, adicionando 2% de urina de criança do sexo masculino filtrada, 1% de antibiótico penicilina estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado no calor de 56°C por 30 minutos, e então foi mantido refrigerado para uso em culturas de *Leishmania* spp.

FIGURA 6 – Processo de filtração do meio Schneider em sistema a vácuo com membrana filtrante de 0,22 μm no fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas - ICC/Fiocruz.



FONTE: A autora (2018).

3.1.5 Preparo de meio RPMI-1640 suplementado

Este meio de cultura é utilizado para o crescimento e manutenção da linhagem de células THP-1 e foi preparado seguindo as instruções do fabricante Sigma-Aldrich®. Para o preparo de 1L de meio, foi utilizado um sachê de RPMI-1640 dissolvido em 900mL de água ultrapura que após solubilização foi acrescentado 2,5g

de glicose, 1,5g de NaHCO_3 , 2,38g de HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) e 10mL piruvato de sódio a 11mg/mL e deixado sob agitação.

Completada a solubilização foi completado o volume de 1L com água ultrapura e realizado, com auxílio do aparelho de pHmetro, o ajuste do pH para $7,3 \pm 0,1$. No o fluxo laminar do LBC e foi realizado a esterilização do meio através da filtração em sistema a vácuo com membrana filtrante de $0,22\mu\text{m}$ (FIGURA 7).

Para suplementação foi adicionado ao meio 10% de SFB (no caso 100mL) inativado a 56°C por 30 minutos e foi mantido refrigerado para uso em culturas de células THP-1.

FIGURA 7 - Processo de filtração do meio RPMI-1640 em sistema a vácuo com membrana filtrante de $0,22\mu\text{m}$ no fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas - ICC/Fiocruz.



FONTE: A autora (2018).

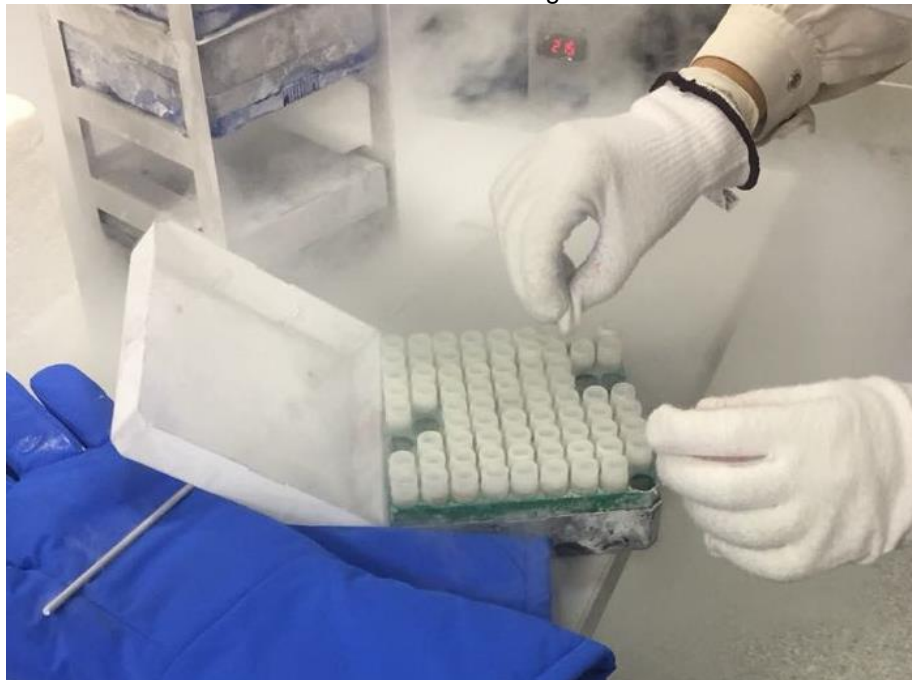
3.1.6 Congelamento de *Leishmania* spp. ou de células TPH-1

Primeiramente foi certificado se as culturas celulares estavam na fase log de crescimento, para que não fosse congelado culturas antigas. O procedimento foi realizado no fluxo laminar do LBC onde todo conteúdo da cultura foi pipetado e dispensado num tubo de fundo cônico de 15 mL, o qual seguiu para centrifuga

(200g/8min para células THP-1 e 1300g/10min para *Leishmania* spp.), foi descartado o sobrenadante e ressuspendido o *pellet* formado pelo acréscimo de meio de cultura (RPMI para células THP-1 e Schneider para *Leishmania* spp.). Foi realizado a contagem das células em câmara de Neubauer e conforme o resultado, foi definido quantos criotubos de 1mL seriam feitos.

Portanto, para o preparo dos criotubos de 1,5mL foi pipetado a quantidade de células THP-1 ou *Leishmania* spp. que representa a densidade de $1,5 \times 10^5$ células/mL e 1×10^6 parasitas/mL, respectivamente. Foi acrescentado 5% da solução final de sulfóxido de dimetil (DMSO) estéril e para finalizar foi pipetado meio de cultura até atingir 1mL. Por fim os criotubos foram identificados com o tipo celular e a data do congelamento, foram colocados em gelo seco por 2-3 horas e então transferidos para as caixas criogênicas (FIGURA 8) nos containers de nitrogênio líquido do LBC na sala de freezers.

FIGURA 8 – Caixa criogênica contendo criotubos de 1,5mL que são mantidos numa rack no interior do container de nitrogênio líquido na sala de Freezers do Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz.



FONTE: A autora (2018).

3.1.7 Descongelamento de *Leishmania* spp. ou células TPH-1

Primeiramente foi localizado no “Mapa de congelamento em nitrogênio líquido” o criotubo que seria descongelado. Para retirar as racks contendo as caixas

criogênicas congeladas do container de nitrogênio líquido do LBC na sala de Freezers, foram utilizados Equipamentos de Proteção Individual (luvas Cryo Gloves® e máscara protetora de rosto) (FIGURA 9). Foram localizados os criotubos de escolha e estes foram rapidamente transferidos para uma caixa de isopor contendo gelo seco, previamente preparada.

FIGURA 9 - Processo de descongelamento de *Leishmania braziliensis* na sala de Freezers do Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz. A- Retirada da rack do interior do container de nitrogênio líquido B- rack do container de nitrogênio líquido.



FONTE: A autora (2018).

No fluxo laminar do LBC foi preparado uma garrafa de cultura contendo 5mL de meio NNN com 10 ml de meio Schneider suplementado para o descongelando *Leishmania* spp e outra garrafa com 10mL meio RPMI-1640 para células o descongelando de células THP-1. Foi adicionado 500µL de meio de cultura refrigerado sobre as células congeladas no criotubo, aspirando e soltando o volume levemente repetidas vezes, para que assim as células se descongelassem (FIGURA 10).

Conforme algum volume descongelava este era aspirado e desprezado na garrafa, quando todo volume de células descongelou e foi transferido para o meio de cultura novo, a garrafa foi colocada na estufa apropriada para as células que foram descongeladas (*Leishmania* spp. em 25°C e para células THP-1 em 37°C).

FIGURA 10 - Pipetagem de meio de cultura Schneider suplementado no criotubo sobre as *Leishmania infantum* congeladas, para o descongelamento, realizado no fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz.



FONTE: A autora (2018).

3.1.8 Preparo do composto *Caryocar brasiliense*

Encontrado em todo cerrado brasileiro e considerado um dos símbolos do bioma Cerrado o *Caryocar brasiliense* é uma planta popularmente conhecida por Pequi, cujos frutos são ricos em óleo e proteína, sendo muito utilizada na preparação dos pratos típicos e na produção de óleo e bebidas (SILVA et al., 2001 e JÚNIOR et al., 2007). Segundo estudos os frutos do *Caryocar brasiliense* possuem atividades anti-Leishmania em *L. amazonensis*, portanto o objetivo do projeto de Iniciação Científica descrito no item 3.1.17.2 foi investigar se há essas mesmas atividades em *L. braziliensis*.

Para o preparo deste composto foram dissolvidos, num tubo de 1,5mL, 10µg de extrato de *Caryocar brasiliense* em 10µL de DMSO (1% da solução final). Lentamente foram adicionados 500mg de pérolas de vidro misturadas em 1000µL de PBS e o tubo foi agitado até a solução dissolver. No fluxo laminar do LBC foi realizado a esterilização da solução preparada através da filtração em membrana filtrante de 0,22mm.

3.1.9 Preparo da solução de SDS 10% em 0,01M de HCl

Esta solução foi utilizada nos ensaios colorimétricos MTT do Projeto de Estágio Obrigatório descrito no item 3.1.18. Para seu preparo, em uma vidraria Becker, foi adicionado 70mL de uma solução previamente preparada contendo 1mL de uma solução de 1M de HCl dissolvido em 99mL de água ultrapura e aos poucos foram adicionados 10g de SDS 10% sob agitação com aquecimento. Após a completa solubilização foi adicionado o restante da solução preparada de HCl na concentração de 0,01M para completar os 100mL.

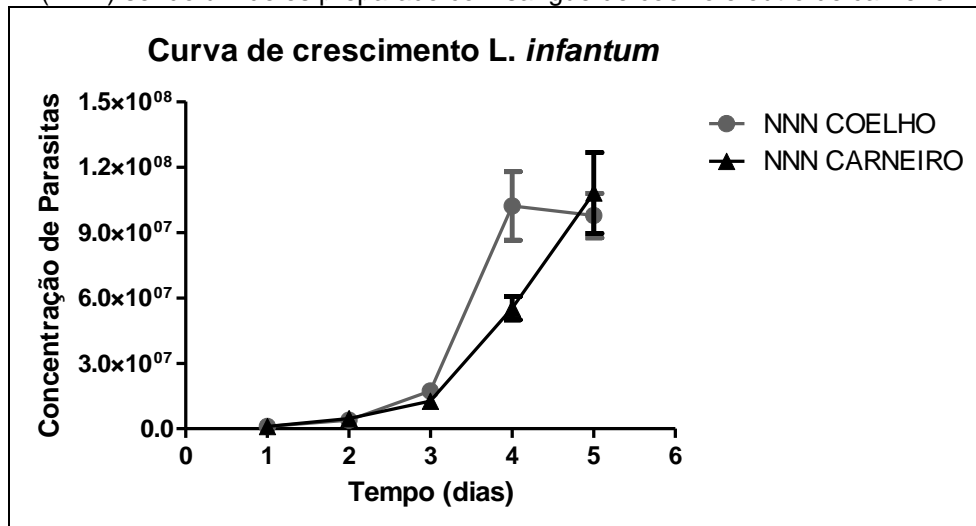
3.1.10 Análise de curva de crescimento

A curva de crescimento do parasito em meio de cultura é realizada pelo pesquisador quando objetiva-se descobrir quanto tempo sua cultura leva para atingir a fase de crescimento logarítmico (log) e a sua duração ou apenas avaliar se o crescimento dos parasitos estão de acordo com o esperado.

Foram feitas duas curvas de crescimento com *L. infantum* em triplicata, a partir de um inoculo inicial de 1×10^6 parasitas/mL, ao longo de cinco dias foram realizadas contagens diárias do número de parasitas em câmara de Neubauer. O objetivo foi analisar se haveria diferença significativa no crescimento dos parasitas cultivados em diferentes meios de NNN, sendo um deles preparado com sangue de coelho e o outro com sangue de carneiro (item 3.1.3).

No meio de cultura preparado com sangue de coelho a fase exponencial logarítmica (log) iniciou após dois dias e durou até o quarto dia (FIGURA 11), enquanto para a cultura preparada com sangue de carneiro a duração foi até o quinto dia. Adicionalmente foi realizada a análise estatística no programa GraphPad Prism onde foi comprovado estatisticamente que não houve diferença significativa entre as curvas.

FIGURA 11 – Curva de crescimento, estabelecida pela contagem na câmara de Neubauer de *Leishmania infantum*, em meio de cultura Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) sendo um deles preparado com sangue de coelho e outro de carneiro.



FONTE: A autora (2018).

3.1.11 Dual Path Platform (DPP®)

Adotado pelo MS como teste de triagem para diagnóstico da Leishmaniose visceral canina (LVC) a Dual Path Platform (DPP®) é produzida pela Fiocruz (Unidade Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), segundo o fabricante esse teste é considerado um teste rápido qualitativo e imunocromatográfico, baseado na rápida detecção de anticorpos específicos contra a proteína de fusão K28.

Para realizar o teste rápido DPP® foi utilizada uma das opções de amostra, sendo elas de sangue total venoso, soro ou plasma, que segundo o fabricante possuem índices de sensibilidade de 100% para sangue e soro e entre 92,9% - 100% para plasma e índices de especificidade entre 87,5% - 91,7% para sangue e soro e entre 87,5% - 86,6% para plasma (Fundação Oswaldo Cruz, 2017). Semelhante a resultados encontrados por Laurenti et al. (2014), em um estudo comparando o desempenho do DPP® com o ELISA produzido por BioManguinhos (Brasil), utilizando amostras de soro de cães infectados clinicamente sintomáticos e assintomáticos de uma área endêmica de LVC, descobriram que o DPP® apresentou uma sensibilidade de 90,6% e especificidade de 95,1%.

Nos kits estavam inclusos materiais para vinte reações, contendo 20 suportes DPP®, 20 alças coletoras descartáveis (5µL), 20 lancetas descartáveis e um frasco de tampão de corrida (6mL) (FIGURA 12). Os testes realizados seguiram as instruções contidas no manual, descritas a seguir:

FIGURA 12 – Materiais utilizado no teste de triagem para diagnóstico de Leishmaniose. A direita da imagem observa-se os materiais inclusos no kit do teste rápido de Dual Path Platform (TR- DPP®), contendo um suporte Dual Path Platform (DPP®), 20 alças coletoras descartáveis (5µL) e um frasco de tampão de corrida (6mL) e a esquerda o dispositivo de leitura óptica Dual Path Platform (DPP®).



FONTE: A autora (2018).

Depois de preenchido alça coletora com a amostra em temperatura ambiente, foi adicionado ao poço de aplicação de amostra, denominada P1, a amostra, em sequencia foi adicionado duas gotas do tampão neste poço e aguardado 5 minutos. Nesse tempo a amostra diluída migrou para a segunda tira contendo uma linha de teste azul e uma linha de controle verde, que desapareceram após entrar com contato com a amostra. Foram adicionadas quatro gotas do tampão no poço conjugado, denominado P2, nesse momento as partículas de ouro coloidal migraram, ao longo da segunda faixa, para a área de teste e reagiram aos anticorpos ligados ao antígeno criando um complexo imune colorido visualizado na banda de teste. Percorridos 10 a 15 minutos foi realizado a leitura visual por dois operadores e em seguida usando um dispositivo de leitura óptica DPP medindo a refletância em unidades relativas de luz (RLU) (Fundação Oswaldo Cruz, 2017).

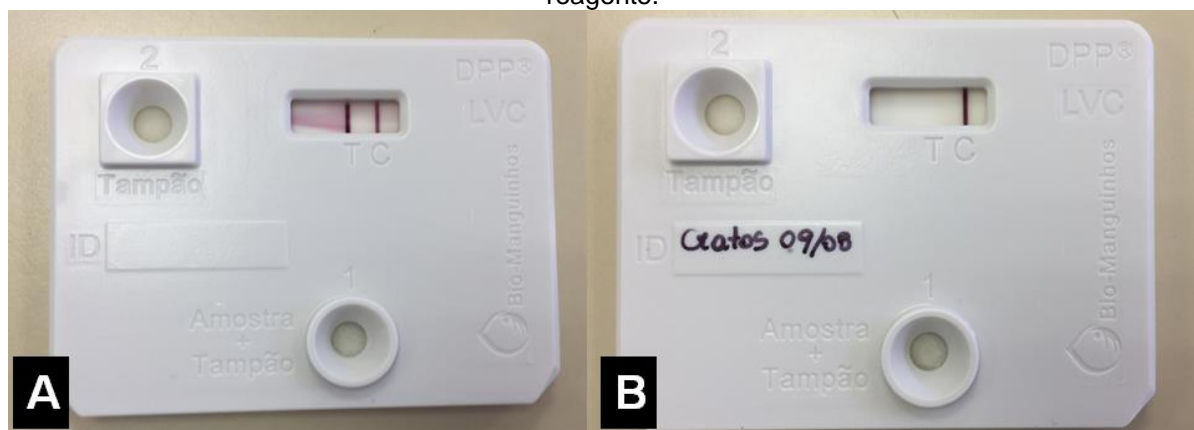
Os resultados obtidos podiam ser de três tipos:

- Não reagente: indicado pela presença de uma linha roxa/rosa na área de controle e nenhuma linha na área de TESTE, sugerindo a ausência de anticorpo para *Leishmania* sp. na amostra;

- Reagente: indicado pela presença de duas linhas roxas/rosas uma na área de controle e outra na área de TESTE, sugerindo a detecção de anticorpo para *Leishmania* sp. na amostra (FIGURA 13); e

- Inválido: indicando a ausência de uma linha roxa/rosa na área de controle, independente da presença de uma linha roxa/rosa na área de teste, não devendo ser interpretado.

FIGURA 13 – Teste Rápido Dual Path Platform (DPP®), realizados com soros de cães. A - suporte de DPP® representando um resultado reagente. B - suporte de DPP® representando um resultado não reagente.



FONTE: A autora (2018).

3.1.12 Diferenciação de células THP-1 em macrófagos

Este procedimento tinha como objetivo realizar, futuramente, a infecção de macrófagos com *Leishmania* spp. (item 3.1.9). Para esse processo foi utilizado a solução de PMA (Phorbol12-myristate-13-acetate) a 100 ng/ μ L que possui ação de diferenciar células THP-1 em macrófagos, utilizada na proporção de 1 μ L de PMA para 1ml de células.

Primeiramente, foi realizada a contagem das células THP-1 em câmara de Neubauer e decidido qual placa de cultura e quantos poços seriam utilizados. Nos protocolos do LBC é pré-estabelecido que em placas de 96 poços usa-se 200 μ L com densidade de 5x10⁴ células/poço e em placas de 24 poços usa-se 1000 μ L com densidade de 2,5x10⁵ células/poço.

Para melhor entendimento do processo segue os cálculos realizados na montagem da placa de 96 poços utilizado na Iniciação Científica descrita no item 3.1.17.1.

A quantidade de células necessárias foi de 96 poços x 5 x 10⁴ células resultando em 48 x 10⁵ de células THP-1, além disso o volume final foi de 96 poços x 200µL resultando em 19,2mL, considerando a adição de 1,92mL (10% de erro), resultou em 21,12mL. Considerando que a contagem em câmara de Neubauer resultou em 25 x 10⁵ células/mL, temos 48 x 10⁵ células em 1,92mL.

Para finalizar, foi calculado o volume de meio RPMI-1640 necessário para preparar o inócuo, para isso foi utilizado a equação: Volume final = volume do meio RPMI-1640 + volume de células THP-1. Sendo assim, considerando os valores calculados o volume do meio RPMI-1640 final resultou em 19,2mL.

Portanto, foi preparado em um tubo de fundo cônico de 50mL uma solução de 21,12mL de inócuo contendo 1,92mL de células THP-1, 19,2mL de meio RPMI-1640 e 21,12µL de PMA a 100ng/µL. A solução foi homogeneizada e dispensados 200µL/poço na placa e foi incubada na estufa por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂, para que ocorresse a diferenciação.

Para que os macrófagos tivessem maior facilidade de metabolização e fossem facilmente infectados foi realizada a substituição do meio contendo PMA por 1000µL/poço de meio RPMI-1640 suplementado, e a placa foi incubada novamente na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas, esta incubação é denominada de *resting*.

3.1.13 Infecção dos macrófagos com *Leishmania* spp.

Este procedimento foi realizado no LBC em placas contendo macrófagos, providos das células THP-1 previamente diferenciadas (item 3.1.8). Para a infecção foram utilizadas culturas de parasitas de um repique de 6 ou 7 dias, pois os parasitas estavam na fase estacionaria do desenvolvimento.

A quantidade de parasitas necessários é dependente da multiplicidade de infecção (MOI) que corresponde a proporção da quantidade parasitas:macrófago, foi determinado que a MOI para *L. infantum* é de 5:1 e para *L. braziliensis* é de 10:1. Para começar a infecção foi realizada a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e posteriormente calculado o volume de parasitas necessário perante a MOI e após preparada a placa, esta foi incubada na estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 4 horas para que ocorresse a infecção.

A seguir os cálculos para melhor entendimento do processo de quantificação.

Para placas de 96 poços contendo macrófagos que seriam infectados com *L. infantum* foi multiplicado a quantidade de macrófagos/poço pela MOI, ou seja, 5×10^4 macrófagos/poço \times 5 parasitas, resultando em 25×10^4 parasitas.

Considerando que a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer resultou em $1,25 \times 10^7$ parasitas/mL para alcançar os $26,5 \times 10^6$ (foi usado 50 μ L/poço de parasitas, portanto a densidade de parasitas necessária foi de 5×10^6 parasitas/mL multiplicado por 5,3mL) parasitas foi necessário adicionar 2,12 mL da cultura. Essa quantidade foi colocada em tubo de 1,5mL e centrifugado a 1300g por 10 minutos, foi descartado o sobrenadante e adicionado 5,3mL de meio RPMI-1640 sobre os parasitas. Por fim foi retirado o meio de cultura de todos os poços e em seguida adicionado 50 μ L/poço de parasitas e a placa incubada por 4h na estufa a 37°C, 5% CO₂ e umidade, para ocorrer a infecção dos macrófagos pelas *L. infantum*.

Terminado o período de incubação, os poços foram lavados três vezes com meio RPMI-1640 suplementado para que fossem retirados os parasitas que não infectaram as células e foi pipetado 200 μ L/poço de meio RPMI-1640 suplementado. Para que ocorresse a replicação dos parasitas, a placa foi incubada por 48 horas na estufa a 37°C, 5% CO₂ e umidade, após essa incubação as amastigotas intracelulares foram tratadas (item 3.1.14).

3.1.14 Tratamento de amastigotas intracelulares

O tratamento dos macrófagos teve início após 24 horas de infecção destes com *Leishmania* spp. (item 3.1.13) pois nesse momento as células THP-1 estavam com o volume citoplasmático maior permitindo a multiplicação parasitaria. Após feito a escolha da droga foram realizados os cálculos considerando as doses escolhidas do tratamento e as quantidades de poços que o receberiam. No fluxo laminar do LBC as soluções dos tratamentos foram preparadas de acordo com os cálculos e adicionadas 200 μ L/poço. Ao finalizar, placa foi homogeneizada e incubada por 24 horas na estufa a 37°C, 5% CO₂ e umidade.

3.1.15 Fixação e coloração das células

As células foram fixadas e coradas após as 24h de incubação da placa, pós início do tratamento (item 3.1.14). No fluxo laminar do LBC o meio foi retirado dos poços por pipetagem e foi realizada a lavagem dos poços com 200 μ L/poço de PBS. Em seguida, foi pipetado 50 μ L/poço de metanol absoluto para fixar as células, percorridos cinco minutos o metanol foi retirado e por fim foi acrescentado 100 μ L/poço de corante Hoechst 0,5 μ g/mL, para corar as células e *Leishmania* spp.. Em seguida a placa foi mantida em temperatura ambiente e sob abrigo da luz, até a contagem (item 3.1.16).

3.1.16 Contagem das células

A contagem das células em placas de 96 poços foi realizada em um equipamento de High Content Analysis System, o Operetta CLS™ (FIGURA 14) da PerkinElmer®, consistindo em um microscópio para aquisição automatizada de imagens e análise qualitativa e quantitativa de eventos celulares e subcelulares.

FIGURA 14 – Equipamento Operetta CLS™, PerkinElmer®, localizado na sala de Equipamentos I no Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz em Curitiba/PR.



FONTE: A autora (2018).

Este procedimento foi realizado durante a Iniciação Científica descrita no item 3.1.17.1, onde foram obtidas, através das 25 imagens capturadas em cada poço, a contagem do número total de núcleos das células THP-1, de amastigotas e de células infectadas.

Com esses dados foram determinados as porcentagens de células infectadas, a média do número de amastigotas por célula e o índice de infecção. Este último foi obtido, para os grupos com tratamento, considerando o índice de infecção do controle negativo (CN), sem tratamento, como 100% de viabilidade das amastigotas intracelulares.

3.1.17 Acompanhamento de projetos

Durante o período de estágio no LBC estavam ocorrendo trabalhos de iniciação científica e de doutorado. Como os doutorandos estavam em fase elaboração da tese ou cumprimento carga horária de créditos em disciplinas, serão descritos apenas as atividades relativas aos projetos de Iniciação Científica.

3.1.17.1 “Avaliação *in vitro* da resistência à miltefosina em isolados de *Leishmania (Leishmania) infantum* provenientes de casos caninos e humanos em diferentes áreas endêmicas do Brasil”

Este projeto era desenvolvido pela acadêmica de Ciências Biológicas da UFPR Curitiba, Thais Cristina Tirado. Foi preparada em placas de 96 poços a diferenciação de células THP-1 em macrófagos (item 3.1.8), a infecção destes macrófagos com *L. infantum* (item 3.1.9) provenientes de isolados caninos e humanos, e o tratamento destas células infectadas (item 3.1.10) com MILTEFORAN, uma droga recentemente liberada pelo MS para o tratamento de cães com LVC. As células foram fixadas e coradas (item 3.1.15) e foi realizado a contagem das células no Operetta CLS™, da PerkinElmer® (item 3.1.16). O objetivo deste trabalho foi analisar a quantidade de macrófagos e de amastigotas presentes após o tratamento, observando se há resistência ao medicamento.

3.1.17.2 “Avaliação in vitro da atividade anti-Leishmania do oxido nítrico e própolis brasileira em *Leishmania braziliensis*”

Este projeto era desenvolvido pela acadêmica pela acadêmica de Biomedicina da Universidade Positivo de Curitiba, Victoria Cruz Cavalari. Diferentemente do que está descrito no título, o composto utilizado na avaliação *in vitro* da atividade anti-Leishmania foi o *Caryocar brasiliense* e não o oxido nítrico e própolis brasileiro, devido ao fato da dificuldade encontrada em obter o composto planejado primeiramente.

A acadêmica desenvolveu curvas de crescimento de sete dias com *L. braziliensis* nas formas promastigotas metacíclicas, utilizando vários grupos, sendo eles CN, controle positivo utilizando Anfotericina B 1µg/mL e grupos tratados com *Caryocar brasiliense* 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. Com esses mesmos grupos foram desenvolvidos também o ensaio colorimétrico com MTT em placas de 96 poços, buscando avaliar a viabilidade das *L. braziliensis*.

3.1.19 Projeto de Estágio Obrigatório no ICC utilizando o ensaio colorimétrico MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetitiazol-2-il]-2,5-difenil-2H-tetrazólio) é um método colorimétrico quantitativo e sensível que visa determinar a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Este ensaio consiste na capacidade das enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias ativas de células viváveis, em clivar o anel tetrazólico da solução de MTT, que é um substrato solúvel em água de coloração amarelo pálido, a um produto de cristal de formazan, que é insolúvel em água de coloração azul escuro. Portanto, a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional a quantidade de parasitas vivos, pois apenas estas possuem a capacidade de clivar o MTT, enquanto que as células mortas são completamente negativas, mesmo após a lise (MOSMANN, 1983).

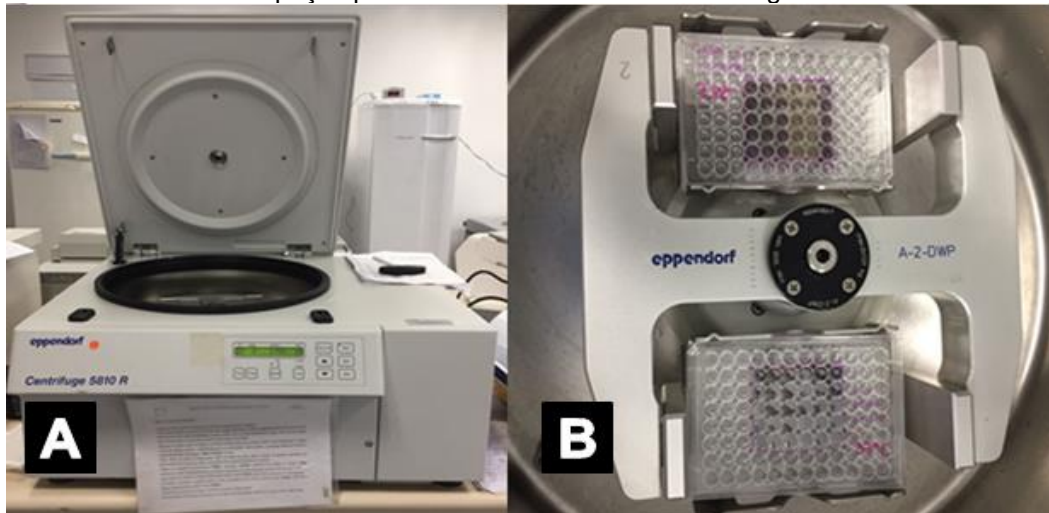
Para testar a atividade da Anfotericina B (Sigma®) contra o crescimento das *Leishmania infatum* cepa referência, foram utilizadas suas formas promastigotas, cultivadas em meio Schneider suplementado (item 3.1.4) em estufa a 25°C com atmosfera controlada de 5% CO₂ e umidade. Para o ensaio colorimétrico foram utilizados repiques semanais (item 3.1.2) de 4-6 dias, pois era desejado encontrar as *Leishmania* spp. em fase exponencial (log) de crescimento.

Para o ensaio, primeiramente, foi realizado a contagem dos parasitas na câmara de Neubauer e centrifugado a quantidade necessária em um tubo estéril de fundo cônico de 15mL, a 3000 rpm por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e ressuspendido o *pellet* em meio Schneider, na quantidade necessária para se pipetar 180µL parasitas/poço. Também foi realizado, o preparo das diferentes concentrações de Anfotericina B diluídas em meio Schneider através do uso da equação $C1 \times V1 = C2 \times V2$.

Os ensaios foram realizados no fluxo laminar do LBC utilizando placas de 96 poços de fundo chato e transparente, contendo 180 µL parasitas/poço na concentração de $4,5 \times 10^7$ (CEOLE, 2017) e 20 µL de diferentes concentrações de Anfotericina B ou 20 µL de meio Schneider para o controle negativo (CN), as placas preparadas foram mantidas por 24h na estufa a 25°C com atmosfera controlada de 5% CO₂ e umidade.

Após incubação, no fluxo laminar do LBC, foram adicionadas 50µL/poço da solução de MTT 10 mg/mL (Sigma, EUA) e as placas foram incubadas protegidas da luz durante 4 horas em estufa a 37°C com atmosfera controlada de 5% CO₂ e umidade. As placas foram submetidas a uma centrifugação (FIGURA 15) durante 10 minutos numa rotação de 1700 rpm em 20°C e seguiram para a retirada de todo sobrenadante através da inversão em um só movimento. Para lisar as células e assim extrair o formazan, foram adicionados 25µL/poço de SDS 10% em HCl 0,01M e incubadas em estufa a 37°C durante 10 minutos. Para solubilizar os cristais de formazan foi utilizado 50 µL/poço de DMSO e novamente incubadas em estufa a 37°C durante 10 minutos. A leitura foi realizada medindo a absorbância em 550nm no espectrofotômetro de leitura múltipla ELISA (Biotek) e os valores interpretados em no programa Graphpad, onde os resultados foram expressos como porcentagem de parasitas vivos em relação ao controle negativo não tratado.

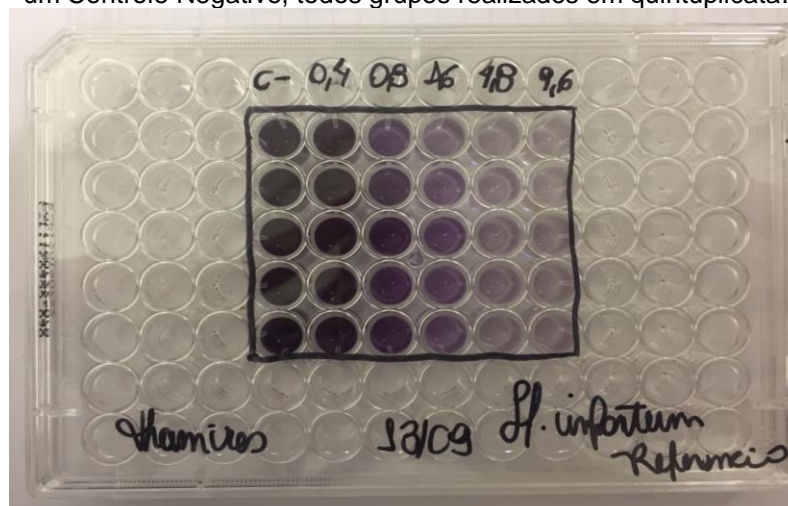
FIGURA 15 – Centrifuga de placas, Eppendorf® modelo 5810 R, localizada na Sala de Equipamentos II no Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz em Curitiba/PR. A- centrifuga; B- placas de 96 poços posicionadas no interior da centrifuga.



FONTE: A autora (2018).

Seguindo os passos descritos anteriormente, foram preparados três ensaios de MTT, realizados com *L. infantum* cepa Referência em placas de 96 poços, cada um dos grupos tratados com diferentes concentrações de Anfotericina B, porém as três placas com o mesmo tratamento. Os tratamentos foram realizados com diferentes concentrações de Anfotericina B, sendo com 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um CN com meio Schneider suplementado (FIGURA 16), todos grupos realizados em quintuplicata. O motivo do mesmo ensaio ter sido realizado três vezes foi para comprovar que os resultados eram fidedignos.

FIGURA 16 – Aspecto visual da placa de 96 poços após finalizado o ensaio de MTT com *Leishmania infantum* cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um Controle Negativo, todos grupos realizados em quintuplicata.

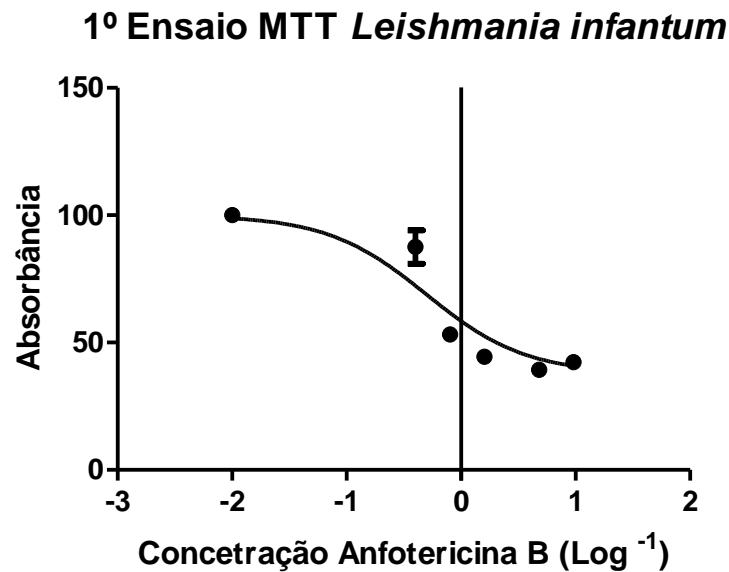


FONTE: A autora (2018).

Após leitura da absorbância, obteve-se como resultados da PLACA 1 os dados demonstrados na Figura 17. Conforme analisados no GraphPad, o R^2 resultou em 0,8309, ou seja, os resultados são considerados confiáveis, já que $R^2 > 0,80$, e a dose terapêutica em 50% dos parasitas (IC50) foi de 3,16 μ g/mL.

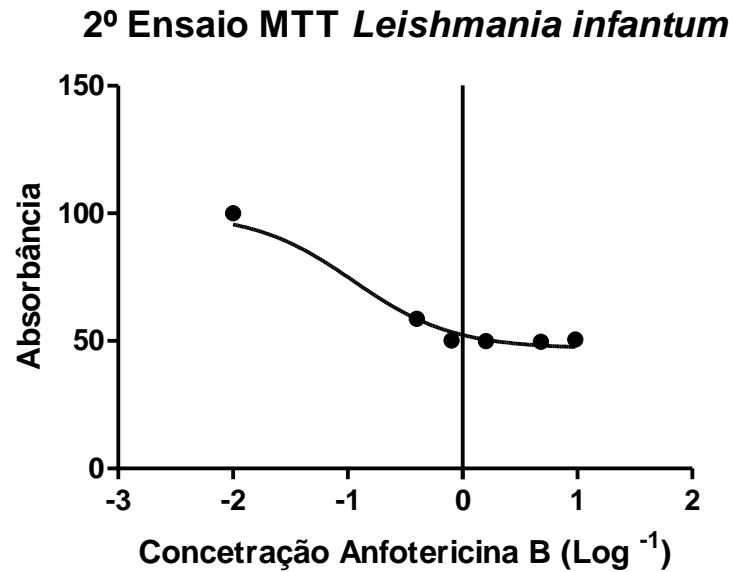
Após leitura da absorbância, obteve-se como resultados da PLACA 2 os dados demonstrados na Figura 18. Conforme analisados no GraphPad, o R^2 resultou em 0,9588, ou seja, os resultados são considerados confiáveis, já que $R^2 > 0,80$, e a IC50 foi de 2,95 μ g/mL.

FIGURA 17 – Resultados da PLACA 1 analisados no GraphPad sobre o ensaio de MTT com *Leishmania infantum* cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4 μ g/mL, 0,8 μ g/mL, 1,6 μ g/mL, 4,8 μ g/mL e 9,6 μ g/mL, e um Controle Negativo, demonstradas na figura em Log⁻¹.



FONTE: A autora (2018).

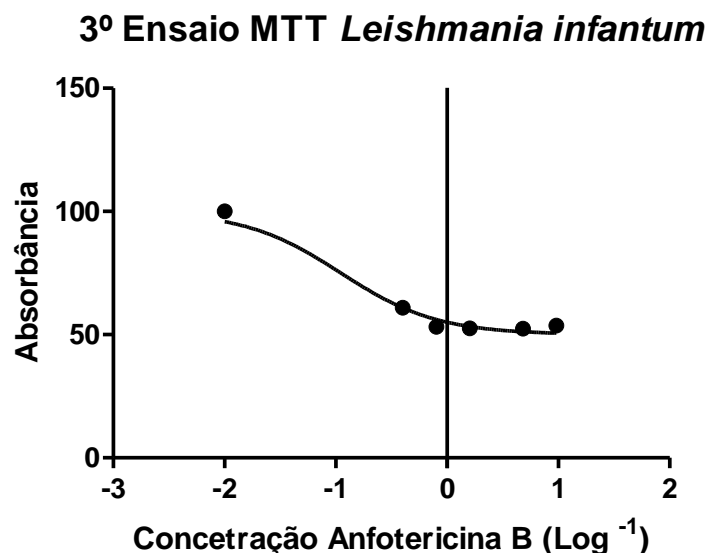
FIGURA 18 – Resultados da PLACA 2 analisados no GraphPad sobre o ensaio de MTT com *Leishmania infantum* cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um Controle Negativo, demonstradas na figura em Log⁻¹.



FONTE: A autora (2018).

Após leitura da absorbância, obteve-se como resultados da PLACA 3 os dados demonstrados na Figura 19. Conforme analisados no GraphPad, o R² resultou em 0,9611, ou seja, os resultados são considerados confiáveis, já que R²>0,80, e a IC50 foi de 2,93µg/mL.

FIGURA 19 – Resultados da PLACA 3 analisados no GraphPad sobre o ensaio de MTT com *Leishmania infantum* cepa Referência, tratadas com concentrações de Anfotericina B de 0,4µg/mL, 0,8µg/mL, 1,6µg/mL, 4,8µg/mL e 9,6µg/mL, e um Controle Negativo, demonstradas na figura em Log⁻¹.



FONTE: A autora (2018).

Conforme os resultados foi concluído que a *Leishmania infantum* cepa Referência quando tratada com Anfotericina B, possui como dose terapêutica mínima de 2,93 a 3,16µg/mL.

3.2 Biotério Central UFPR - Curitiba

Os animais de laboratório são utilizados a mais de um século para pesquisas biomédicas, permitindo um grande avanço na ciência e tecnologia. Os biotérios atuais podem contar com estruturas adequadas, contendo barreiras físicas contra patógenos, climatização apropriada, pessoais capacitados e profissionais treinados, rações e condições sanitárias apropriadas além de animais geneticamente definidos, garantindo assim que os resultados experimentais sejam de extrema confiança. Esta denominação de animais definidos diz conferir a estes animais qualidade genética e higiênica, ou seja, são criados e produzidos sob condições ideais e mantidos em ambiente controlado e com genética conhecida pelas técnicas de engenharia genética e biologia molecular (ANDRADE, 2002).

Muitas são as contribuições atribuídas ao uso dos animais de laboratório, como a prevenção e cura de doenças, desenvolvimento de novas técnicas de tratamentos cirúrgicos, de novas vacinas, avaliação e controle de produtos biológicos, estudos de farmacologia, toxicologia, bacteriologia, virologia, parasitologia, imunologia, transplantes, entre outros.

Assim, entende-se a importância e responsabilidade do bioterismo, pois as contribuições descritas acima são, atualmente, necessárias serem realizadas antes nos animais previamente à experimentação em humanos.

Segundo Andrade (2002), por definição, um biotério consiste em uma instalação onde animais são criados ou mantidos atendendo suas exigências de bem-estar e saúde para que estes possam se desenvolver e reproduzir, respondendo de maneira satisfatória aos testes que passarão. Estes animais seguem um modelo com características em comum, como: fácil manejo, prolificidade, docilidade, pequeno porte, baixo consumo alimentar, fisiologia conhecida e ciclo reprodutivo curto.

Os biotérios podem ser classificados por três critérios, de acordo com sua finalidade, *status* sanitário e *status* genético dos animais. Quanto à finalidade, pode-se classificar em biotério de criação e/ou manutenção e/ou experimentação (CARDOSO, 2002). O Biotério Central da UFPR é classificado como de criação e para maior segurança e redução dos riscos de contaminações sua estrutura física, os trabalhadores e o material utilizado são independentes dos demais laboratórios.

Neste tipo de biotério há salas de reprodução onde são mantidas as matrizes reprodutoras que irão originar toda a produção, estas são mantidas nas salas de crescimento e serão fornecidas aos pesquisadores conforme especificação. O biotério visa controlar e definir, antes dos animais serem encaminhados, características dos animais como: estado de saúde, carga genética, manuseio, ambiente adequado além de outros fatores que possam ocasionar estresse, podendo influenciar na resposta esperada nos experimentos (CARDOSO, 2002).

Os animais do biotério podem receber a classificação quanto seu *status* sanitário, podendo ser considerados animais gnotobióticos ou animais livres de germes patogênicos específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF) ou animais convencionais (CARDOSO, 2002). Os animais do Biotério Central da UFPR são classificados como animais convencionais, ou seja, são animais que por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas possuem sua microbiota indefinida.

A maioria dos animais utilizados na pesquisa são convencionais, pois o custo para reproduzir e manter é menor em razão de sua criação necessitar apenas de princípios básicos de higiene, onde é realizado somente a limpeza e desinfecção do ambiente e do material utilizado e os trabalhadores realizam apenas a troca de uniforme e uso de luvas para procedimentos.

Já quanto a classificação do *status* genético dos animais, podem ser classificados em dois grupos os não consanguíneos ou *outbred* e os consanguíneos ou *inbred* (CARDOSO, 2002). Os animais do Biotério Central da UFPR são classificados como não consanguíneos, ou seja, esses animais apresentam alta heterozigose, possuindo assim uma grande diversidade genética, pois não há parentescos acasalados.

Durante o estágio obrigatório foi possível acompanhar a rotina cumprida no Biotério. O biotério é classificado como de criação e nele são reproduzidas duas espécies de animais sendo uma delas ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar e a outra camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss.

3.2.1 Rotina de manejo dos animais

Os ratos e camundongos eram mantidos em salas de criação (macroambiente) separadas, alojados em caixas de polipropileno (microambiente),

na proporção de 49x34x16cm para os ratos e camundongos em crescimento e de 30x20x13cm para os camundongos em reprodução, e ainda alguns ratos em reprodução eram mantidos nas caixas de *racks* ventiladas (FIGURA 20).

Os animais permaneciam num ambiente controlado, climatizado ($20 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), sob ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração comercial peletizada NUVILAB, da empresa QUIMTIA S/A e água *ad libitum*.

Para todas as caixas a reposição de ração e água era diária e a troca de maravalha era realizada todas segundas, quartas e sextas-feiras nas caixas de animais em crescimento, nas segundas e quintas-feiras nas caixas de animais de reprodução e nas quintas-feiras nas caixas das *racks* ventiladas. Neste último a troca era apenas uma vez na semana, pois nesse sistema há uma maior qualidade sanitária devido ao controle da ventilação, temperatura, umidade e troca de ar, tendo uma concentração de amônia e gás carbônico consideravelmente menor do que a das caixas de polipropileno.

FIGURA 20– Sistema de *racks* ventiladas para manutenção de ratos em reprodução/maternidade no Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.



FONTE: A autora (2018).

Além disso, a quantidade de animais destinados ao crescimento mantidos por caixa, era para os ratos desde o pós-desmame até 40 dias de idade agrupados em até 6 animais por caixa e dos 41 aos 60 dias de idade em até 4 animais por

caixa. Já os camundongos eram agrupados em até 23 animais por caixa, porém é importante ressaltar que devido ao temperamento desta espécie após os machos serem agrupados numa caixa, pós-desmame, não deveriam ser inseridos novos machos nesta caixa.

O Biotério seguia uma regra onde os animais só eram fornecidos para uso exclusivo na docência e pesquisa e com a idade mínima de 21 dias, ou seja, a partir do desmame, e com no máximo 60 dias de idade, quando atingem a maturidade sexual.

3.2.2 Manejo reprodutivo

As fêmeas dessas espécies são poliéstricas com duração do ciclo estral de quatro a cinco dias e com período de gestação de 18 a 23 dias. O sistema de acasalamento era intensivo feito por dois métodos, um deles denominado de casal consistindo em manter em uma caixa um macho e uma fêmea e o outro de hárem mantendo um macho e duas fêmeas em uma caixa.

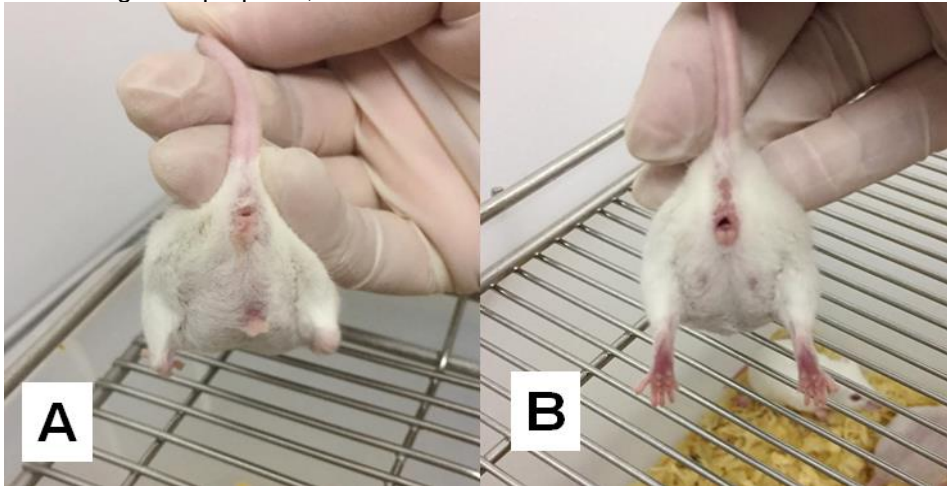
Todas as caixas de reprodução possuíam uma identificação contendo informações sobre qual grupo seriam os filhotes, quantidades de partos ocorridos, datas que houve sexagens com a quantidade de machos e fêmeas nascidas, data de desmame e informações adicionais que os funcionários consideravam relevantes.

Na reprodução os animais eram classificados como não consanguíneos, apresentando uma grande diversidade genética, pois não havia parentescos acasalados. Para que nenhum erro acontecesse, como o acasalamento de animais consanguíneos, o Biotério Central seguia o Sistema Poiley, onde os animais são classificados em 5 grupos, denominados A, B, C, D e E, e os cruzamentos acontecem da seguinte maneira:

MACHO		FÊMEA		GRUPO FORMADO
A	↔	B	→	C
B	↔	C	→	D
C	↔	D	→	E
D	↔	E	→	A
E	↔	A	→	B

O desmame era realizado todas segundas e quintas-feiras com os filhotes contendo 21 a 23 dias de idade e a sexagem era realizada todas terças e sextas-feiras nos neonatos. A sexagem era realizada baseada na distancia ano-genital (FIGURA 21), onde em fêmeas era observado uma menor distância do que em machos.

FIGURA 21 – Realização de sexagem pela distancia ano-genital, em camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss. A- Observa-se uma distancia ano-genital grande, conferindo a este animal a característica de um macho. B- Observa-se uma distância ano-genital pequena, conferindo a característica de uma fêmea.



FONTE: A autora (2018).

3.2.3 Eutanásia

Uma vez que no biotério era priorizado manter para o crescimento apenas os machos, as fêmeas eram eutanaziadas com sobredose de isoflurano logo após realizadas as sexagens dos neonatos. Além disso, as fêmeas e os machos destinados a reprodução, também eram eutanasiados com sobredose de isoflurano, quando completavam de 10 a 15 partos, em casos de problemas reprodutivos e por poucas habilidades maternas.

4. DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA

4.1 Instituto Carlos Chagas – (ICC/Fiocruz)

Durante o estágio no ICC diversas atividades foram acompanhadas e desenvolvidas. Todas foram contabilizadas, conforme exhibe a Tabela 1.

TABELA 1 - Casuística acompanhada durante o estágio obrigatório no Instituto Carlos Chagas - ICC/Fiocruz em Curitiba/PR.

ATIVIDADES	FREQUENCIA
Repique de células THP-1	36
Repique <i>Leishmania</i> spp.	185
Preparo meio NNN	1,5 Litros
Preparo de meio Schneider suplementado	3 Litros
Preparo de meio RPMI -1640 suplementado	2 Litros
Suplementação de Meio Schneider	3,5 Litros
Congelamento de Células THP-1	6 criotubos
Congelamento de e <i>Leishmania</i> spp.	16 criotubos
Descongelação de células THP-1	5 criotubos
Descongelação de <i>Leishmania</i> spp.	10 criotubos
Preparação do composto <i>Caryocar braziliense</i>	6
Preparo de SDS 10% com HCl 0,01M	100mL
Contagem para curva de crescimento	180
Teste rápido DPP®	420 testes
Diferenciação de células THP-1 em macrófagos	6 placas
Infecção de macrófagos com <i>Leishmania</i> spp.	6 placas
Tratamento das amastigostas intracelulares	6 placas
Fixação e coloração das células	4 placas
Contagem das células no Operetta CLS™	2 placas
Aferição do pH	20
Ensaio MTT	23 placas

FONTE: A autora (2018).

4.2 Biotério Central UFPR- Curitiba

Durante o estágio no Biotério Central da UFPR diversas atividades foram acompanhadas e desenvolvidas, porém as atividades de sexagem e desmame receberam maior atenção. Segue abaixo a Tabela 2 que contempla a casuística acompanhada da sexagem e desmame dos animais.

TABELA 2 - Casuística acompanhada durante o estágio obrigatório no Biotério Central da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba/PR.

ROTINA BIOTÉRIO CENTRAL DA UFPR				
QUANTIDADE	FÊMEAS (F)	MACHOS (M)	TOTAL (M+F)	CAIXAS
SEXAGEM				
RATOS	489	433	922	123
CAMUNDONGOS	102	98	200	27
DESMAME				
RATOS	205	424	629	85
CAMUNDONGOS	86	103	189	24

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio proporcionou grandes experiências e aprendizados, trazendo uma nova visão da realidade, auxiliando no desenvolvimento da relação interpessoal e um grande aprimoramento profissional. A primeira parte do estágio, realizada no ICC/Fiocruz, foi desafiadora, porém também trouxe uma nova visão de um instituto com uma grande estrutura e com equipamentos de alta qualidade. Na segunda parte, ocorrida no Biotério Central da UFPR, foi possível acompanhar a rotina completa do manejo dos animais, principalmente o reprodutivo, proporcionando uma visão diferenciada sobre como funcionam biotérios de criação.

Assim pode ser dito que os locais escolhidos para a realização do estágio obrigatório superaram as expectativas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Antenor. O Bioterismo: evolução e importância. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro: p.19-22, 2002.
- BLANCO, V. R.; NASCIMENTO JÚNIOR, N. M.. **Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas**. Revista Virtual de Química, São Paulo, v. 9, n. 3, p.861-876, abr. 2017.
- CARDOSO, Celia. V. P. Classificação de Biotérios quando à finalidade. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p.29-32, 2002.
- CEOLE, L. F.; CARDOSO, M. G.; SOARES, M. J.; **Nerolidol, the main constituent of Piper aduncum essentialoil, has anti-Leishmania braziliensis activity**. Revista de Parasitologia da Universidade de Cambrigde. Ed. 9, V. 144, p. 1179–1190, 2017.
- DELORENZI, Jan Carlo; **Doenças Tropicais Negligenciadas**. Maxpress – oficina de comunicação. São Paulo. 2018. Disponível em: <https://www.maxpress.com.br/Conteudo/1,945903,Doencas_Tropicais_N%20negligenciadas__Leishmaniose__Por_Prof_Dr_Jan_Carlo_Delorenzi_,945903,9.htm> . Acesso em 20 set. 2018.
- Disponível em: <<http://www.icc.fiocruz.br/sobre-o-instituto/>>. Acesso em: 12 jul. 2018.
- Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s9895?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 18 set. 2018.
- Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r1383pis.pdf>. Acesso em: 18 set.2018.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. **Leishmaniose visceral no Brasil**. no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol., v. 7, p. 338-349, 2004.
- JÚNIOR, C. F. C.; ROCHA, S. L.; SANTOS, W. G dos ; PAULA, T. O. M de ; SANTOS, A. M.; ARAÚJO, C. B.; MARTINS, E. R.; LOPES, P. S. N.. **Ecogeografia e etnobotânica do Caryocar brasiliensis no Norte de Minas Gerais**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p.477-479, 2007.
- LAURENTI, M.D.; de SANTANA LEANDRO, M.V. Jr.; TOMOKANE, T.Y.; de LUCCA, H.R.; ASCHAR, M.; SOUZA, C.S.; SILVA, R.M.; MARCONDES, M.; da MATTA, V.L..**Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine**

serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. Revista de Parasitologia Veterinária, vol. 205, p.444-450, 2014.

Leishmaniasis - World Health Organization. **Status Endemicity of cutaneous and visceral leishmaniasis worldwide.** World Health Organization. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 10 set. 2018.

MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.** Journal of Immunological Methods, v. 65, p. 55-63, 1983.

ROCHA, G. P.; PETRONI, T. F. **Leishmaniose visceral e tegumentar americana.** Revista Saúde UniToledo, Araçatuba, SP, v. 01, n. 02, p. 40-55, 2017.

SILVA, D.B.; et al. **Avaliação do potencial de produção do “pequizeiro-anão” sob condições naturais na região sul do estado de Minas Gerais.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.23, n.3, p.726-729, 2001.

TR DPP@LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ, 2017.