Michelle Marini Horikawa

**Caracterização do efeito de uma translocase
de aminofosfolipídio (APLT) de
Leishmania (Leishmania) amazonensis
na exposição de fosfatidilserina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Michelle Marini Horikawa

**Caracterização do efeito de uma translocase
de aminofosfolipídio (APLT) de
Leishmania (Leishmania) amazonensis
na exposição de fosfatidilserina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador:

Prof. Dr. Marcello André Barcinski

Co-Orientador:

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Horikawa, Michelle Marini.

Caracterização do efeito de uma translocase de aminofosfolipídio (APLT) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na exposição de fosfatidilserina
/ Michelle Marini Horikawa. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Marcello Andre Barcinski.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular.

Versão do título para o inglês: Characterization of the effect of an aminophospholipid (APLT) from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* on phosphatidylserine exposure.

Descritores: 1. *Leishmania* 2. Translocase de aminofosfolipídio 3. Fosfatidilserina 4. Apoptose 5. Domínio transmembrana 6. Sequência Kozak I. Barcinski, Marcello Andre II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB050/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Michelle Marini Horikawa.

Título da Dissertação: Caracterização do efeito de uma translocase de aminofosfolipídio (APLT) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na exposição de fosfatidilserina.

Orientador(a): Marcello Andre Barcinski.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **005** nas fls. **53** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Marcello André Barcinski, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Identificação de uma aminofosfolipídio translocase em formas promastigotas de Leishmania(L) amazonensis"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Michelle Marini Horikawa, Heloísa de Jesus Marçal e o pesquisador Gerhard Wunderlich** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **29.04.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de abril de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

*Dedico este trabalho
à memória de meu pai,
Mituo Horikawa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me dar forças e permitir que eu concluísse essa etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcello André Barcinski, pela orientação, pelos ensinamentos e confiança em mim depositada.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Gerhard Wunderlich, pelos ensinamentos, paciência, confiança e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo, companheiro de laboratório, “professor”, Dr. Mário de Freitas Balanco, pela paciência, ensinamentos, companherismo, enfim, por ter me ajudado muito durante o decorrer deste trabalho.

Ao meu amigo Márcio Massao Yamamoto, sem dúvidas um dos responsáveis pelo início do meu mestrado. Muito Obrigada! E também pelo seqüenciamento das minhas “Ns” amostras.

À Prof^a. Dra. Marta Maria Geraldês Texeira e a todos que trabalham neste laboratório, obrigada por sempre permitir que eu utilizasse, e muito, o termociclador de vocês.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter pelos ensinamentos de Bioinformática, que contribuíram e muito para a análise da proteína em questão.

Ao meu amigo e professor Dr. Lincoln Suesdek Rocha, pela contribuição, ensinamentos, pelos bons momentos de descontração e companherismo vivenciados no decorrer do meu mestrado.

À minha amiga: Prof^a. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni pela confiança, ensinamentos, pelos ensaios de PCR em tempo real, pelo companherismo e por tantas outras contribuições feitas no decorrer do projeto.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório Maurício Scavassini Pena pelos momentos de descontração e principalmente pela ajuda nos ensaios de PCR em tempo real.

À Prof^a. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter e ao Dr. Marcos Gonzaga dos Santos pela colaboração e pelos ensaios de transfecção.

À Prof^a. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana pelos ensinamentos e pela literatura fornecida.

Aos professores Dra. Silvia Beatriz Boscardin e Dr. Cláudio Romero Farias Marinho pelos ensinamentos e por todo apoio fornecido.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber e a todos que trabalham neste laboratório, amigos queridos, prestativos, que me ajudaram de forma direta e indireta neste trabalho: Beth, Brian, Inga, Flávia, Jahangir, Josué, Lisvane, em especial duas pessoas que tenho um carinho enorme: Jean Douglas Ferraz Codeiro e Sandra Carla Rocha, meus companheiros de almoço, de discussões científicas, de descontração e de ótimos momentos juntos.

Ao meu amigo Alessandro Aparecido Rodrigues da Silva pelas discussões científicas, momentos de descontração e companherismo.

Aos meus amigos do departamento Eline e Icaro, pelos bons momentos de descontração.

Aos demais professores do departamento, pelo convívio e pelos ensinamentos tanto no dia a dia quanto nas disciplinas e seminários.

A todos os membros do corpo técnico dos Laboratórios de Biociências do Departamento de Parasitologia e aos funcionários responsáveis pela Pós-Graduação, dentre eles, Angela e Wilma, obrigada por todo o apoio e ajuda fornecida.

Aos meus pais, Mituo Horikawa (*in memoriam*) e Estela Clara Horikawa, que nunca mediram esforços para que eu pudesse concluir os meus estudos, graças a vocês consegui chegar onde estou hoje.

Aos meus irmãos: Júlia, Mário, Valéria e Mauricy, indistintamente, e cunhados, por todo apoio, incentivo e carinho fornecido. Em especial, ao meu cunhado Romuald Armelin por me emprestar o computador para a elaboração da parte escrita, muito, muito obrigada, se não fosse esse empréstimo com certeza teria perdido mais noites de sono.

A minha amiga Edna e amigos, por toda a ajuda que me forneceram durante todos os momentos que enfrentei para conseguir concluir esse mestrado.

Aos meus amigos, mais que queridos, Fernanda Aparecida Reis e Ricardo Shiguero Aoki, por sempre torcerem por mim.

E a todos os meus verdadeiros amigos, de fora do departamento, que me ajudaram direta e indiretamente, pelas contribuições, pelo companherismo, carinho, compreensão durante os momentos de altos e baixos no decorrer dessa caminhada, não citarei nomes, mas obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudo concedida.

“Loucura? Sonho? Tudo é loucura ou sonho no
começo. Nada do que o homem fez no mundo
teve início de outra maneira,
mas tantos sonhos se realizaram que não temos o
direito de duvidar de nenhum”

Monteiro Lobato

RESUMO

HORIKAWA, M. M. **Caracterização do efeito de uma translocase de aminofosfolipídio (APLT) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na exposição de fosfatidilserina.** 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O mecanismo responsável pela exposição da fosfatidilserina (PS) nas membranas celulares ainda não está bem definido. Sabe-se que uma atividade dependente de adenosina trifosfato (ATP) está envolvida no processo, provavelmente uma enzima ATPase tipo-P, que constituem uma ampla família de proteínas transmembranares envolvidas no transporte de metais, íons e fosfolipídios, através da membrana plasmática. A família foi dividida em cinco classes, baseadas na estrutura secundária e na especificidade do substrato. Dentro desta família, as ATPases tipo-P classe IV (P4 ATPases) foram implicadas na translocação de aminofosfolipídios (APTLs) especificamente da PS durante a apoptose. No entanto o sentido deste direcionamento ainda não está claramente definido. Os macrófagos reconhecem a PS exposta na superfície das células apoptóticas, por um receptor de PS, esse reconhecimento resulta na inibição da capacidade microbicida dos fagócitos. A análise da sequência nucleotídica do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis*, revelou a presença de uma ORF contendo 3.477 pb, que codifica uma proteína de aproximadamente 130 kDa, composta de oito domínios transmembranares, a princípio ausente de peptídeo-sinal. Níveis superiores e significativos de transcritos de *aplt* foram identificados na fase estacionária dos promastigotas do 6º e do 8º dia e nos amastigotas provenientes da lesão de camundongos BALB/c. As *L. (L.) amazonensis* foram transfectadas com o gene *aplt* e o eventual efeito do gene foi avaliada por citometria de fluxo, comparando-se a exposição de PS entre as *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectadas do 6º dia de cultura por meio da fluorescência da anexina V. A adição de uma “sequência Kozak” foi adicionada anterior ao gene em questão para comparar o efeito na expressão gênica.

Palavras-chave: *Leishmania*. Translocase de Aminofosfolipídio. Fosfatidilserina. Apoptose. Domínio transmembrana. Sequência Kozak.

ABSTRACT

HORIKAWA M. M. **Characterization of the effect of an aminophospholipid (APLT) from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* on phosphatidylserine exposure.** 2010. 112 f. Master thesis (Parasithology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

The mechanism responsible for phosphatidylserine (PS) exposure in biological membranes is still an open subject. It has been described that an ATP-dependent activity, probably mediated by a Type P- ATPase is involved in such a process. Type-P ATPases constitute a large family of transmembrane proteins, involved in the transport of metals, ions and phospholipids across membranes. Based on their secondary structure and their specificity for different substrates, the family has been divided in five different classes. Among the existant classes the Class 4 Type-P ATPases (P4 ATPases) have been implicated in phospholipid transport (APLT) and more specifically of PS during the process of cell death by apoptosis. However the direction (inwards or outwards) of this eventual translocation has not been yet defined. Macrophages recognize externalized PS present on the surface of apoptotic cells, via a still non-characterized receptor(s). This recognition inhibits the leishmanicidal capacity of macrophages. The nucleotide sequence of the *aplt* gene of *Leishmania (L.) amazonensis* revealed the presence of an ORF with 3.477 bp which encodes a protein of approximately 130 kDa, containing eight transmembrane domains and without a clearly identified signal peptide. Significantly higher levels of transcripts of the *aplt* gene where identified during the stationary phase of *in vitro* promastigote cultures (6th to 8th day of culture) and in lesion-derived amastigotes from BALB/c mice. Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* were transfected with the *aplt* gene and its putative effect in inducing PS exposure was evaluated by cytometric analysis of FITC-Annexin V binding. Addition of a “Kozak sequence” has been added upstream to the gene insertion, in order to increase its expression.

Key words: *Leishmania*. Aminophospholipid translocase. Phosphatidylserine. Apoptosis. Transmembrane Domains. Kozak sequence.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
APTLs	Translocases de aminofosfolípídios
ATP	Adenosina trifosfato
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
<i>CIAP</i>	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CMV	Citomegalovírus
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D. O.	Densidade óptica
Da	Daltons
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxiribonuclease
dNTPs	Desoxinucleotídeo-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminoacético
EGTA	Ácido tetra-acético etileno glicol
<i>g</i>	Força gravitacional
<i>g</i>	Grama
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilobases
kDa	Quilodalton
kDNA	Cinetoplasto
l	Litro
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LB	Luria-Bertani

LC	Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose Visceral
M	Molar
MCP	Morte celular programada
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Marcador molecular
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-brometo de difenil tetrazolio)
N	Normal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NEO	Neomicina fosfotransferase
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
ORF	<i>Open reading frame</i>
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial de hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
pmol	Picomol

PS	Fosfatidilserina
PSR	Receptor de fosfatidilserina
QR	Quantificação relativa
Rn	Intensidade de fluorescência
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SV40	Vírus símio 40
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TGF- β	Fator de crescimento transformador-beta
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
Tm	Temperatura de melting
TM	Temperatura média
TNF- α	Fator-alfa de necrose tumoral
TNF- β	Fator-beta de necrose tumoral
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidades de reação da enzima
UV	Ultravioleta
V.	<i>Viannia</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
μ F	Micro Farad
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da leishmaniose.....	26
Figura 2 - Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da leishmaniose.	28
Figura 3 - Distribuição assimétrica de fosfolipídios e glicolipídios na bicamada lipídica da membrana plasmática.....	35
Figura 4 - Perda da assimetria da membrana plasmática, com exposição de PS para a face externa.	36
Figura 5 - Reconhecimento de PS, nas células apoptóticas e nos amastigotas.	37
Figura 6 - Alinhamento do gene <i>aplt</i> de cinco espécies de <i>Leishmania</i> depositadas no GenBank.....	45
Figura 7 - Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	64
Figura 8 - Amplificação do gene <i>aplt</i> (3.477 pb) a partir do DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i> com os oligonucleotídeos das extremidades (TAT-L1 (F) e TAT-L13 (R))	65
Figura 9 - Caracterização físico-química da proteína APLT deduzida de <i>L. (L.) amazonensis</i>	66
Figura 10 - Domínios conservados da sequência de aminoácido APLT de <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
Figura 11 - Representação de potenciais regiões transmembranares da sequência de aminoácidos APLT deduzida de <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
Figura 12 - Análise para verificar se a APLT deduzida de <i>L. (L.) amazonensis</i> possui peptídeo-sinal.....	68
Figura 13 - Alinhamento da sequência de aminoácidos APLT deduzida de <i>L. (L.) amazonensis</i> com outras proteínas APLT de 05 espécies de <i>Leishmania</i> e <i>C. elegans</i> TAT-1	70

Figura 14 - Identificação dos sítios principais capazes de sofrerem modificações pós-traducionais na sequência de aminoácido da APLT deduzida de <i>L. (L.) amazonensis</i>	71
Figura 15 - Predição da estrutura secundária da sequência de aminoácidos APLT deduzida de <i>L. (L.) amazonensis</i>	71
Figura 16 - Predição da ocorrência dos principais domínios funcionais e sítios importantes da sequência de aminoácidos APLT deduzida de <i>L. (L.) amazonensis</i>	72
Figura 17 - Comparação do gene <i>aplt</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i> com os maiores valores de identidade obtidos de 05 espécies de <i>Leishmania</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	73
Figura 18 - Árvore filogenética construída a partir da sequência do gene <i>aplt</i> depositada no <i>GenBank</i> de 06 espécies de <i>Leishmania</i> , <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> e <i>C. elegans (tat-1)</i>	73
Figura 19 - RNA de 1×10^8 promastigotas do 3º ao 8º dia e de amastigotas (Ama) isolados de camundongos BALB/c	74
Figura 20 - Quantificação relativa do gene <i>aplt</i> (razão <i>aplt/arginase</i>) e curva de crescimento (densidade de parasitas) de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em relação à promastigotas do 3º dia	76
Figura 21 - Células CHO-K1 induzidas com 100 μ M de Valinomicina, incubadas por 18 horas a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO ₂ , para a translocação de fosfatidilserina (PS)	77
Figura 22 - Células CHO-K1 transfectadas com o vetor pcDNA3 + <i>gfp</i>	78
Figura 23 - Comparação entre as curvas de crescimento de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> não transfectada e transfectadas com os vetores: pXG1 (vermelho), pXG1 + <i>aplt</i> (azul) e pXG1 + (Kozak) <i>aplt</i> (roxo)	79
Figura 24 - Histograma comparando exposição de PS entre parasitas que sofreram choque térmico por 2 horas a 34 °C e os que não sofreram	82

LISTA DE TABELA E QUADROS

Tabela 1 - Principais espécies de <i>Leishmania</i> e as formas da doença encontradas em humanos.....	25
Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados para identificação do gene <i>aplt</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i>	45
Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene de referência (<i>arginase</i>).....	533
Quadro 3 - Oligonucleotídeos utilizados na construção dos vetores para transfecção.....	56
Quadro 4 - Porcentagem (%) de cada construção de vetor de <i>L. (L.) amazonensis</i> transfectada e não transfectada (selvagem), positiva para Anexina V (AnxV+) e negativa para Iodeto de Propídio (PI-)	80

AMINOÁCIDOS

D	Ácido Aspártico (Asp)
E	Ácido Glutâmico (Glu)
A	Alanina (Ala)
R	Arginina (Arg)
N	Asparagina (Asn)
C	Cisteína (Cys)
F	Fenilalanina (Phe)
G	Glicina (Gly)
Q	Glutamina (Gln)
H	Histidina (His)
I	Isoleucina (Ile)
L	Leucina (Leu)
K	Lisina (Lys)
M	Metionina (Met)
P	Prolina (Pro)
S	Serina (Ser)
Y	Tirosina (Tyr)
T	Treonina (Thr)
W	Triptofano (Trp)
V	Valina (Val)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 A doença Leishmaniose	23
1.2 A Doença Humana	23
1.3 Epidemiologia	25
1.4 O parasita <i>Leishmania</i>.....	27
1.5 Ciclo Biológico e Mecanismo de Transmissão da Leishmaniose	27
1.6 Diagnóstico Laboratorial	29
1.7 Tratamento da Leishmaniose.....	29
1.8 Resposta imune do hospedeiro infectado	30
1.9 Internalização da <i>Leishmania</i> nas células fagocitárias	32
1.10 Estrutura e composição da membrana plasmática	34
1.11 Apoptose ou Morte Celular Programada (MCP)	36
1.12 Translocase de Aminofosfolipídio	38
 2 OBJETIVOS	 40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 41
3.1 Materiais.....	41
3.1.1 Organismos utilizados	41
3.1.1.1 Animais.....	41
3.1.1.2 Bactérias	41
3.1.1.3 Célula de mamífero	41
3.1.1.4 Parasita.....	41
3.1.2 Plasmídeos.....	42
3.1.3 Enzimas de restrição	42
3.1.4 Reagentes.....	43
3.2 Métodos.....	43
3.2.1 Isolamento de formas amastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> de lesões de camundongo BALB/c.....	43

3.2.2 Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
3.2.3 Extração e quantificação do DNA genômico das formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
3.2.4 Identificação e caracterização da APLT de <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
3.2.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos para identificação da seqüência do gene <i>aplt</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
3.2.4.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR) a partir do DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i>	46
3.2.4.3 Eletroforese em gel de agarose	46
3.2.4.4 Purificação dos fragmentos de DNA	46
3.2.4.5 Ligação dos fragmentos de DNA no plasmídeo	47
3.2.4.6 Preparo das células competentes DH10B	47
3.2.4.7 Transformação de células bacterianas com DNA plasmidial	48
3.2.4.8 Seleção das colônias transformadas	48
3.2.4.9 Sequenciamento de DNA	49
3.2.4.10 Análise computacional da seqüência nucleotídica do gene <i>aplt</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i>	49
3.2.5 Extração e quantificação de RNA	50
3.2.5.1 Tratamento com DNase	51
3.2.5.2 Transcrição reversa	51
3.2.5.3 PCR em tempo real	52
3.2.5.4 Padronização, especificidade e adequação dos oligonucleotídeos	52
3.2.5.5 Cálculo da Eficiência	53
3.2.5.6 Reação de PCR em tempo real	53
3.2.5.7 Critérios de Validação	54
3.2.6 Transfecções	54
3.2.6.1 Construções	54
3.2.6.2 Extração de DNA de plasmídeo em larga escala conforme descrito por SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989.	56
3.2.6.3 Transfecção transiente em CHO-K1	57
3.2.6.3.1 Cultivo e contagem das células CHO-K1	57

3.2.6.3.2 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação das células CHO-K1 medida pela redução do sal tetrazólico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-brometo de difenil tetrazolio)	58
3.2.6.3.3 Ensaio com Valinomicina para induzir a apoptose das células CHO-K1	58
3.2.6.3.4 Preparo da placa para transfecção transiente em CHO-K1.....	59
3.2.6.3.5 Transfecção transiente em CHO-K1 com ExGen 500	59
3.2.6.4 Transfecção estável em <i>L. (L.) amazonensis</i>	60
3.2.6.4.1 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> medida pela redução do sal tetrazólico MTT para definir a concentração ideal de Geneticina	60
3.2.6.4.2 Transfecção em <i>L. (L.) amazonensis</i> por eletroporação	60
3.2.6.4.3 Obtenção dos clones	61
3.2.6.4.4 Extração de DNA para recuperar plasmídeo.....	61
3.2.6.4.5 Confirmação da integração do plasmídeo	62
3.2.6.4.6 Curva de crescimento de formas promastigotas transfectadas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62
3.2.6.4.7 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação de formas promastigotas do 6º dia de <i>L. (L.) amazonensis</i> transfectadas e não transfectada medida pela redução do sal tetrazólico MTT após choque térmico	62
3.2.6.4.8 Análise por citometria de fluxo da externalização de fosfatidilserina (PS) em <i>L. (L.) amazonensis</i>	63
 4 RESULTADOS.....	 64
4.1 Determinação da curva de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	64
4.2 Identificação do gene <i>aplt</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i>	64
4.2.1 Sequência do gene <i>aplt</i> e características da sequência deduzida de aminoácidos da APLT de <i>L. (L.) amazonensis</i>	65
4.3 Análise do RNA	74
4.3.1 Padronização da concentração dos oligonucleotídeos para PCR em tempo real	74
4.3.2 Validação interna e eficiência de amplificação das reações de PCR em tempo real	74
4.3.3 Expressão relativa do mRNA da <i>aplt</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i> em relação ao 3º dia.	75
4.4 Transfecção transiente em CHO-K1.....	77

4.4.1 Padronização do uso da Valinomicina para induzir a apoptose das células CHO-K1	77
4.4.2 Transfecção transiente em CHO-K1 com ExGen 500	78
4.5 Transfecção estável em <i>L. (L.) amazonensis</i>	79
4.5.2 Curva de crescimento de formas promastigotas transfectadas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	79
4.5.3 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação de formas promastigotas do 6º dia de <i>L. (L.) amazonensis</i> transfectadas e não transfectadas, medida pela redução do sal tetrazólico MTT após choque térmico	80
4.5.4 Efeito da inserção do gene na exposição de PS	80
4.5.5 Efeito do choque térmico nas <i>L. (L.) amazonensis</i> transfectadas	81
 5 DISCUSSÃO	 83
5.1 O gene <i>aplt</i> , as proteínas APLTs e <i>Leishmania</i> ssp.....	83
5.2 As proteínas APLTs e exposição de PS.....	85
 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	 92
 REFERÊNCIAS	 94
 ANEXOS.....	 108
ANEXO A – APLT de <i>L. (L.) mexicana</i>	109
ANEXO B – APLT de <i>L. (L.) amazonensis</i>	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença Leishmaniose

A Leishmaniose ou Leishmaníase é uma doença infecciosa, cujo agente etiológico pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que compreende dois subgêneros *Leishmania* (L.) e *Viannia* (V.) (LAINSON; SHAW, 1987; KERR, 2006), caracterizada pelo parasitismo do protozoário nos tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), presentes na derme, mucosas e nas vísceras do hospedeiro vertebrado. Pelo menos 20 espécies de *Leishmania* infectam macrófagos humanos (PEACOCK et al., 2007).

A transmissão ocorre por meio da picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos (Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae) pertencentes ao gênero *Lutzomyia* quando nas Américas (Novo Mundo) e *Phlebotomus* nas regiões que englobam o Norte e Oeste da África, Índia, China e região Mediterrânea da Europa (Velho Mundo) (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999). No Brasil o vetor é conhecido popularmente como cangalhinha, birigui, mosquito-palha, asa dura, asa branca, catuqui, catuquira, escangalhado, murutinga, etc.

1.2 A Doença Humana

Leishmania spp. causam um espectro de doenças em humanos, que pode variar de um estado inaparente em que a doença não é detectada, até manifestações que variam de uma infecção cutânea (localizada ou difusa) a formas mucocutâneas e viscerais.

A **Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea (LC)** é a forma clínica mais frequente da doença, causada por diversas espécies de *Leishmania*. A lesão se inicia no local da picada do vetor e pode demorar de 1 a 3 meses para se desenvolver. A úlcera típica da LC é indolor, com formato arredondado ou ovalado, edemaciada e com granulações grosseiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Forma Cutânea Localizada: Representa o acometimento primário da pele, podendo causar lesões ulcerosas ou não, porém limitadas em tamanho e número (até 20 lesões) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000), que geralmente se curam espontaneamente, como resultado da resposta imune adquirida (LYNN; MCMASTER,

2008). Forma Cutânea Difusa (Leishmaniose Cutânea Difusa - LCD) é caracterizada pela presença de nódulos, sem úlceras, com elevado número de macrófagos parasitados e a ausência de células mediadoras da resposta imune anti-*Leishmania*. O principal agente etiológico é a *Leishmania (L.) amazonensis* (Tabela 1) (WHO, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

A **Leishmaniose Mucocutânea (LMC)** resulta em lesões destrutivas das mucosas do nariz, da boca e cavidades da garganta, cujo agente etiológico é a *L. (V.) braziliensis* (Tabela 1) (WHO, 2000). Acredita-se que a forma mucosa da leishmaniose ocorra por disseminação hematogênica das leishmanias inoculadas na pele para a região das mucosas. Na maioria dos casos, a LMC é secundária à lesão cutânea, ou seja, é resultado de uma LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Infecções secundárias e complicações respiratórias aliadas à dificuldade de alimentação podem levar o paciente a óbito. Em geral estas lesões não se curam espontaneamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A **Leishmaniose Visceral (LV)**, também conhecida como Calazar, cursa com comprometimento, essencialmente de baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides (WHO, 2000) órgãos internos pelos quais os parasitas apresentam acentuado tropismo. O parasita é inoculado na pele e migra, via circulação linfática e sanguínea, infectando células do SFM. O período de incubação varia de 2 a 4 meses. A febre é o primeiro sintoma, seguida de alterações funcionais nos órgãos afetados: linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, anemia com leucopenia. A LV é a forma mais severa da doença e se não tratada pode levar a óbito em um período de 2 a 3 anos (WHO, 2000). Em formas mais agudas da doença o óbito pode acontecer entre 06 a 12 meses após a infecção (CUNNINGHAM, 2002). Os principais agentes etiológicos são: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi* (Tabela 1) e eventualmente a *L. (L.) amazonensis* (BARRAL et al., 1991).

A **Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)** abrange tanto a forma cutânea e a forma mucocutânea da doença, sendo conhecida popularmente como Úlcera de Bauru, ferida brava ou botão do Oriente.

A leishmaniose pode comprometer a função de um membro, podendo resultar em mutilações. Na falta de tratamento específico à doença pode se tornar fatal (WHO, 2000). A forma clínica e a gravidade da doença dependem da espécie de *Leishmania* infectante, da genética e do estado imunológico do hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002; MCCONVILLE; HANDMAN, 2007).

Tabela 1 - Principais espécies de *Leishmania* e as formas da doença encontradas em humanos.

Doença	Espécies do Novo Mundo	Espécies do Velho Mundo
Cutânea	<div> <i>L. (L.) mexicana</i> complex { <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i> </div> <div> <i>L. (Viannia)</i> subgenus { <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lansoni</i> <i>L. (V.) naiffi</i> <i>L. (V.) lansoni</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> </div>	<div> <i>L. (L.) major</i> complex { <i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> </div>
Cutânea Difusa	<div> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> </div>	<i>L. (L.) aethiopica</i>
Mucocutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i>	
Visceral	<div> <i>L. (L.) donovani</i> complex { <i>L. (L.) chagasi</i> </div>	<div> <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) donovani</i> </div>

FONTE: MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004.

1.3 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença endêmica presente em 88 países da América do Norte, América do Sul, África, Ásia e sul da Europa (WHO, 2000; MCCONVILLE; HANDMAN, 2007; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2008), restrita nas regiões de clima tropical e temperado, regiões estas, que permitem a proliferação do vetor (MCCONVILLE; HANDMAN, 2007; LYNN; MCMASTER, 2008). Atualmente, estima-se que 20 milhões de pessoas estejam infectadas, das quais 500 mil com a forma visceral da doença (MCCONVILLE; HANDMAN, 2007; LYNN; MCMASTER, 2008).

A maior parte dos casos de LV (90%) ocorrem em algumas regiões da Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil; 90% dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Argélia, Irã, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Brasil e Peru (WHO, 2000; CDC, 2008); e 90% dos casos de LMC ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (Figura 1) (WHO, 2000).

Figura 1 - Distribuição geográfica da leishmaniose. Áreas endêmicas da LV marcadas de verde e áreas endêmicas da LC e LMC marcadas de vermelho. A marcação marrom indica a presença de todas as formas clínicas da doença.

FONTE: RAPSODI AGAINST LEISHMANIASIS. Disponível em: <<http://www.fp7-rapsodi.eu/index.php?id=150>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

O número de novos casos de LC, por ano, é de aproximadamente 1.5 milhões de pessoas, enquanto que na LV é de aproximadamente 500 mil (WHO, 2000; MCCONVILLE; HANDMAN, 2007; CDC, 2008). Calcula-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco da infecção (BRACHO et al., 2007; MONZOTE et al., 2007; CDC, 2008). Estes números geram um alto impacto na saúde pública, em diversas regiões, principalmente na Índia, Sudão e no Brasil (DUMONTEIL, 2007).

Os casos de leishmaniose avaliados nos Estados Unidos (Figura 1) refletem os padrões de viagens e imigração, ou seja, são comumente trazidos por soldados que serviram nas guerras e nos destinos turísticos, pelos imigrantes, sendo a LC a principal forma contraída (CDC, 2008; ROUNDY; ALMONY; ZISLIS, 2008).

No Brasil a doença é endêmica por quase todo o país. Pelo menos 35 mil novos casos são notificados por ano (BITTAR et al., 2007), sendo que as principais espécies de importância médica são: *L. (L.) amazonensis*, agente etiológico da LC e LCD; *L. (V.) braziliensis*, agente etiológico da LC e LMC (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989; LUZ et al., 2009); e *L. (L.) chagasi*, agente etiológico da LV (Tabela 1) (GONTIJO; MELO; 2004). A LCD, cujo um dos agentes etiológicos é a *L. (L.) amazonensis*, concentra-se

nas regiões do Norte e do Nordeste, com maior número de casos relatados na região do Estado do Maranhão. A *L. (L.) amazonensis* também foi isolada de pacientes com LV e de pacientes com LMC, embora no Brasil, estas duas manifestações clínicas (LV e LMC) estejam associadas a infecções causadas pela *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2007).

1.4 O parasita *Leishmania*

A *Leishmania* ssp. é encontrada na natureza sob duas formas de diferenciação: promastigotas e amastigotas. Os amastigotas são formas intracelulares arredondadas, com aproximadamente 10 µm de diâmetro, núcleo oval grande e excêntrico, presente nos hospedeiros vertebrados (humanos, cachorros, gatos, lagartos e roedores). Apresentam uma estrutura chamada cinetoplasto (kDNA), uma organela característica dos flagelados da ordem Kinetoplastida, uma extensão da mitocôndria, representada por uma enorme rede compactada de moléculas de DNA circular (500 – 2.500 pares de bases (pb) nos tripanosomatídeos), muito numerosos (5.000 - 10.000 moléculas por kDNA) perfazendo aproximadamente 30% do DNA total do parasita e localizada próximo ao núcleo (SIMPSON, 1968; DE SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUES, 2009; FLEGONTOV et al., 2009).

Os promastigotas são formas extracelulares, alongadas, flageladas, com cerca de 30 µm de extensão, presente nos hospedeiros invertebrados e nas culturas axênicas. O kDNA se encontra próxima a base do flagelo (SIMPSON, 1968; KILLICK-KENDRICK, 1990; FLEGONTOV et al., 2009), na posição anterior ao núcleo. O flagelo se projeta na extremidade anterior do protozoário e consiste de feixes paralelos de microtúbulos, envoltos por uma bainha citoplasmática (VICKERMAN, 1994).

1.5 Ciclo Biológico e Mecanismo de Transmissão da Leishmaniose

A *Leishmania* ssp. são transmitidas pela fêmea do flebotomíneo infectado com as formas promastigotas, que se diferenciam nas formas promastigotas metacíclicas (formas infectivas do parasita), que são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas se ligam a um ou mais receptores dos macrófagos, sendo posteriormente fagocitadas e encapsuladas no vacúolo parasitóforo que se funde com os lisossomos formando o fagolisossoma (BRODSKY et al., 2003). No

fagolisossoma, as formas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, formas intracelulares obrigatórias, que se multiplicam por fissão binária (ALEXANDER; RUSSELL, 1992; MCCONVILLE; HANDMAN, 2007), adaptadas à temperatura corporal dos mamíferos e ao meio ácido dos fagolisossomos (BRODSKYN et al., 2003). Os amastigotas são liberados dos macrófagos e podem invadir células dendríticas e fibroblastos, e também novos macrófagos. O mecanismo de saída dos amastigotas, presentes nos fagócitos infectados, ainda não está bem caracterizado (RITTING; BOGDAN, 2000; HANDMAN; BULLEN, 2002; REAL, 2009). Durante um novo repasto sangüíneo, o flebotomíneo ingere os macrófagos infectados com a forma amastigota. No período de quatro a cinco dias no intestino dos insetos vetores, as formas amastigotas de *Leishmania* se diferenciam na forma promastigota procíclico, forma não infectante, que se multiplica por fissão binária; posteriormente, ocorre à diferenciação em promastigotas metacíclicos, que migram para a região anterior do tubo digestivo do vetor, atingindo o aparelho picador sugador e o ciclo recomeça com a inoculação do parasita no hospedeiro vertebrado (BATES; ROGERS, 2004; SACKS; PERKINS, 1985) (Figura 2). Acredita-se que a saliva do inseto desempenhe um papel potencializador da infectividade da *Leishmania* (NORSWORTHY et al., 2004; ROHOUSOVÁ; VOLFF, 2006).

Figura 2 - Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da leishmaniose.
 FONTE: LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006.

1.6 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico para a leishmaniose é feito, inicialmente, com a obtenção do material retirado por meio da raspagem ou biópsia das lesões ou tecidos afetados. Para a pesquisa do parasita, a partir do material obtido, pode-se, detectar, por meio de esfregaços sanguíneos, as formas amastigotas no interior dos macrófagos, utilizando-se microscópio óptico (CUNNINGHAM, 2002). Amplificações por PCR, dos genes específicos da *Leishmania*, podem ser utilizados no diagnóstico (ULIANA et al., 1991; CUNNINGHAM, 2002; BRUSTOLONI et al., 2007). Cultura *in vitro* de tecido infectado ou inoculação em animais (hamsters ou camundongos) também pode ser realizado para o diagnóstico (CUNNINGHAM, 2002).

Métodos imunológicos também são utilizados, como o teste intradermoreação de Montenegro (IRM), uma reação de hipersensibilidade tardia. Neste ensaio injeta-se na face interna do antebraço, 0,1 ml de extrato solúvel de parasitas mortos e procede-se à leitura após 48 a 72 horas. As reações com diâmetro superior a 5 mm são consideradas positivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; GUARÍN et al., 2006). Nos casos de infecção por *L. (L.) amazonensis* apenas 51,6% são positivas, enquanto que, a positividade nas infecções com outras espécies de *Leishmania* é de 87% (BRODSKYN et al., 2003). Testes de imunofluorescência indireta (IFI) e imunoenzimático (ELISA) também são utilizados para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; FERREIRA et al., 2006).

1.7 Tratamento da Leishmaniose

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) constituem-se nas drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses. Existem quatro formulações usadas em humanos, indicados para o tratamento da LTA e LV, sendo as de maior difusão o antimoniato-N-metilglucamina (Glucantime ®), estibogluconato de sódico (Pentostam ®) e os antimoniais pentavalentes (CHULAY; SPENCER; MUGAMBI, 1985; COSTA et al., 2003). Sua eficácia é conhecida e atua nas formas amastigotas da *Leishmania*, inibindo a síntese, a atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. A toxicidade dos antimoniais, como da grande maioria das drogas, depende da dose acumulada, sendo rapidamente excretado pelos rins. Os efeitos colaterais relatados mais severos são aumento dos níveis de transaminases hepáticas e anormalidades

nas eletrocardiografias, não devendo ser administrado em pacientes com cardiopatias, com doença de Chagas, com hepatopatias, nefropatias, tuberculose pulmonar e gestantes. Os relatos de insuficiência renal aguda são raros (RODRIGUES et al., 1999).

Anfotericina B é um fármaco de segunda escolha, sendo uma alternativa para pacientes que apresentam baixa resposta com os antimoniais pentavalentes, tanto para o tratamento da LV quanto da LTA. Seu mecanismo de ação ocorre a partir da ligação do princípio ativo com ésteres (ergosterol, episterol) da membrana plasmática da *Leishmania*, causando aumento da permeabilidade resultando na morte do parasita. A função renal e cardíaca do paciente deve ser cuidadosamente acompanhada (BERMAN, 1997; CUNNINGHAM, 2002).

A miltefosina foi a primeira droga de uso oral usada no tratamento da LV. Na LV causada por *L. (L.) donovani*, na Índia, os resultados foram bastante promissores. Os mecanismos de ação da miltefosina contra a *Leishmania* ainda não são bem entendidos. Sabe-se que esta droga é capaz de bloquear a síntese e alterar a composição da membrana do parasita, com poucos efeitos adversos, tais como vômitos e diarreias. Em relação à LTA, estudos utilizando a miltefosina no tratamento da forma cutânea da doença resultaram em boa eficácia contra *L. (V.) panamensis*, mas não para *L. (V.) braziliensis* (PÉREZ-VICTORIA et al., 2003; SOTO et al., 2004). São necessários mais estudos com esta medicação para verificar sua eficiência em relação às espécies de *Leishmania* existentes no Brasil.

Outras drogas podem ser implicadas no tratamento da LTA e LV, como a pentamidina, aminosidina, alopurinol e itraconazol. Além dessas drogas o uso de imunoterapia, utilizando-se interferon-gama (INF- γ) associado a antimoniais pentavalentes (BERMAN, 1997).

Novos estudos buscando terapia de combinação com o uso de óleo de essenciais têm sido realizados, como o óleo de *Chenopodium ambrosioides*, que apresentam atividade sinérgica junto com a pentamidina, sobre os promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MONZOTE et al., 2007).

1.8 Resposta imune do hospedeiro infectado

A resposta imune do hospedeiro vertebrado contra a *Leishmania* é mediada por uma resposta celular, pois os parasitas escapam da resposta imune humoral dos hospedeiros por residir no interior dos fagolisossomos dos macrófagos (CUNNINGHAM, 2002).

No decorrer do ciclo biológico ocorre a liberação das formas amastigotas e peptídeos antigênicos das mesmas serão apresentadas ao sistema imune, gerando uma resposta específica. As formas promastigotas não internalizadas no momento da inoculação pelo inseto vetor serão destruídas no meio extracelular pela resposta inata. Peptídeos antigênicos produzidos neste processo poderão ser utilizadas pelas células apresentadoras de antígeno (APC) no processo de reconhecimento antigênico. A importância desta resposta na história natural da doença ainda é controversa. A principal célula efetora da eliminação das amastigotas é o próprio macrófago, após sua ativação por linfócitos T auxiliares (*helper*). Os linfócitos T por meio da secreção das citocinas (mediadores solúveis), dentre elas, IFN- γ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) ativam macrófagos, tornando-os capazes de destruir amastigotas.

Células T *helper* possuem um papel central na resposta imune, promovendo respostas adaptativas adequadas a patógenos específicos. Após a estimulação antigênica, estas células diferenciam-se em duas populações efectoras distintas: linfócitos T *helper* 1 (Th1) e linfócitos T *helper* 2 (Th2). Células Th1 sintetizam IFN- γ , interleucina-12 (IL-12), fator-alfa de necrose tumoral (TNF- α) e fator-beta de necrose tumoral (TNF- β), que estimulam a imunidade celular e protegem contra bactérias, fungos, protozoários e agentes infecciosos. Células Th2 sintetizam principalmente IL-4, IL-5 e IL-10, que estimulam a resposta imune humoral, particularmente a síntese de IgE e IgG1, que participam, principalmente, das alergias e infecções por certos helmintos (SCHARTON-KERSTEN et al., 1995). O aumento de células Th1 protege durante a infecção, enquanto que o aumento de células Th2 agrava a doença (CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN, 1992; CUNNINGHAM, 2002).

A IL-12 tem sido amplamente aceita como essencial para a proteção imunológica contra todas as espécies de *Leishmania* (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). A síntese de IL-12, pelas células dendríticas e macrófagos, faz com que células T *naive* se diferenciem em células Th1 e induz a síntese de IFN- γ pelas células T e células *natural killer* (NK). A combinação de IFN- γ com TNF- α , sintetizados pelos macrófagos infectados, ativa a expressão do gene que sintetiza a enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS), resultando na síntese de óxido nítrico (NO), que é tóxico para o parasita. O aumento de células Th1 inibe a diferenciação das células Th2 (CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN, 1992; CUNNINGHAM, 2002; PAINTLIA et al., 2006).

A síntese de IL-4 regula a diferenciação e a expansão das células Th2, a qual confere a suscetibilidade em algumas espécies de *Leishmania* (CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN,

1992; CUNNINGHAM, 2002). O papel de proteção da IL-4, durante a infecção foi descrito em *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*, mas não ocorreram de uma forma tão clara, durante as infecções por *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

Nos hospedeiros susceptíveis, a *Leishmania* consegue inibir a síntese de IL-12, INF- γ , a expressão do receptor de IL-12 e a síntese de NO pelo macrófago (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

Camundongos de linhagens que naturalmente curam as suas lesões, como por exemplo, os da linhagem C57BL/6, exibem uma resposta Th1 dominante, enquanto que os camundongos que são suscetíveis à infecção, como os da linhagem BALB/c, exibem uma resposta predominantemente do tipo Th2. A diferenciação das células T *helper* em células Th1, para a resistência, e Th2, para a suscetibilidade, sugere que a variação dos níveis de IL-4 e INF- γ , logo após a infecção, são reguladores essenciais para a diferenciação dessas células (SCHARTON-KERSTEN et al., 1995). Recentemente, a síntese de IL-10 pelas células T regulatórias tem sido sugerida para explicar a não-cura em alguns camundongos que exibem uma resposta Th1 (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

Mesmo com tantos mecanismos de defesa, a *Leishmania* é capaz de modular a síntese de citocinas do hospedeiro vertebrado, modificando a resposta imune do mesmo, e conseguindo sobreviver em um ambiente considerado hostil para qualquer organismo patogênico.

1.9 Internalização da *Leishmania* nas células fagocitárias

Fagocitose é uma importante estratégia de defesa do hospedeiro, componente do sistema imune inato. É realizada por “fagócitos profissionais” que fagocitam microrganismos, eliminando-os no seu interior. Entretanto, *Leishmania* spp. desenvolveram mecanismos para burlar a atividade microbicida dos macrófagos, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar no seu interior.

A internalização dos promastigotas ocorre por um processo clássico de fagocitose, tipo zíper, mediado pelo reconhecimento receptor/ligante. O parasita fagocitado é levado ao vacúolo parasitóforo que se funde com lisossomas, formando o fagolisossoma. Nesse processo geralmente participam os receptores para complemento CR1 e CR3 dos macrófagos. O CR1 modula uma adesão momentânea dos promastigotas opsonizados pelo complemento.

Sua atividade rapidamente converte C3b para C3bi. C3b e C3bi se ligam aos receptores de macrófagos CR1 e CR3, respectivamente. Esse é o caminho principal utilizado pelos promastigotas metacíclicos para se internalizarem nos macrófagos (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999). A conversão de C3b em C3bi também pode ser realizada pela protease gp63 presente na superfície dos promastigotas (BRITTINGHAM; MOSSER, 1996). O lipofosfoglicano (LPG) é o glicoconjugado mais abundante presente na superfície dos promastigotas procíclicos e metacíclicos. Nas formas metacíclicas ocorre uma mudança na estrutura da LPG, que resulta na formação de uma barreira que impede o acesso e a inserção do complexo C5b-9 na membrana do parasita, protegendo-o da lise pelo complemento (PUENTES et al., 1990; MCCONVILLE et al., 1992). No entanto, o fator de complemento C3b consegue se depositar na superfície do parasita (PUENTES et al., 1990). Os promastigotas exploraram a opsonização pelo complemento, para auxiliar na entrada e na sobrevivência do parasita no macrófago. Este método confere vantagem de sobrevivência do parasita, uma vez que o CR1 e CR3 promovem a fagocitose sem acionar o “burst” respiratório (MOSSER; EDELSON, 1987; MOSSER et al., 1987).

O “burst” respiratório, caracterizado pelo aumento acentuado no consumo de oxigênio, ocorre nas células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos. Esse aumento resulta na ativação da NADPH oxidase que catalisa a redução do oxigênio a ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) tendo como doador de elétrons o NADPH. O $O_2^{\bullet-}$ é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). A presença $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 destroem os patógenos fagocitados (CURNUTTE, 2004).

Além disso, o receptor CR3 é capaz de inibir a resposta imune celular mediada por IL-12, citocina pró-inflamatória que sinaliza as células fagocitárias (MARTH; KELSALL, 1997; DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

Existem outros receptores no macrófago que facilitam a entrada das formas promastigotas: CR4 (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999), receptor para moléculas glicosiladas (MOSSER et al., 1987), receptor para proteína C-reativa (CULLEY et al., 1996), receptor para fibronectina (RIZVI et al., 1988), receptor para fucose-manose (RUSSEL; WILHELM, 1986; CHANNON; ROBERTS; BLACKWELL, 1984) e receptor para Fc (CHANG, 1981).

Formas amastigotas também utilizam receptor CR3 e receptor de fucose-manose (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999). Amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* utilizam a opsonização por imunoglobulinas como um meio de entrar no macrófago

através do receptor Fc (GUY; BELOSEVIC, 1993; PETERS et al., 1995). A LPG está envolvida na invasão em ambas as formas promastigotas e amastigotas, porém na forma amastigota, por ser menos abundante, e até ausente em *L. (L.) donovani*, é um ligante menos importante do que na forma promastigota (HANDMAN; BULLEN, 2002). Formas amastigotas de *L. (L.) major* podem se ligar no receptor “lectin-like” que reconhece LPG. A gp63 é sintetizada, mas não é exposta na superfície da membrana. As moléculas que predominam na superfície dos amastigotas são as glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999), que podem estar envolvidas na invasão nos macrófagos e na modulação da síntese de óxido nítrico e do “burst” respiratório (SUZUKI et al., 2008).

Além das estratégias acima descritas, ambas as formas, amastigota e promastigota, desenvolveram outro mecanismo capaz de modular a internalização e a ativação macrofágica, por meio da exposição e conseqüente reconhecimento de um aminofosfolipídio, a fosfatidilserina (PS), presente na membrana plasmática do parasita (BALANCO et al., 2001; TRIPATHI; GUPTA, 2003).

1.10 Estrutura e composição da membrana plasmática

As membranas das células são constituídas por duas camadas de lipídios, moléculas longas anfipáticas, que apresentam uma extremidade hidrofílica ou polar (solúvel em meio aquoso) com uma ou duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicos ou apolares (insolúveis em água). As caudas hidrofóbicas estão voltadas para a face interna da bicamada, enquanto que as extremidades hidrofílicas estão voltadas para a superfície intracelular e extracelular da membrana (SINGER, 1990).

Dentre os lipídios freqüentes nas membranas celulares, encontram-se os fosfoglicerídeos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS)), esfingolipídios e colesterol (Figura 3). Os fosfoglicerídeos e os esfingolipídios contêm o radical fosfato e são chamados fosfolipídios. Outro constituinte anfipático importante das membranas celulares são os glicolipídios (Figura 3), designação genérica para todos os lipídios que contêm hidratos de carbono, com ou sem grupos fosfato (PANDE, 2000).

Células eucarióticas são caracterizadas pela distribuição assimétrica dos fosfolipídios na membrana, uma vez que, o aminofosfolipídio PS e PE são normalmente restritos à face citosólica da membrana (o termo aminofosfolipídio se refere exclusivamente a amina primária

presente nos fosfolipídios PS e PE), enquanto que a fosfatidilcolina e esfingolipídios predominam na face externa (Figura 3) (ANDREE et al., 1990; GLEISS et al., 2002; DALEKE, 2003; ALDER-BAERENS et al., 2006; YAMAJI-HASEGAWA; TSUJIMOTO, 2006). Esta distribuição não é aleatória, sendo relativamente estável e depende da dinâmica da atividade das translocases, que move os fosfolipídios, através da membrana, para a face citosólica, referida como “flipase”, ou para a face externa, referida como “flopase” (DALEKE, 2003; STEVENS; MALONE; NICHOLS, 2008). A distribuição não aleatória de fosfolipídios é crucial para muitos processos fisiológicos, incluindo a tradução de sinal, morfologia celular, movimento celulares, atividade das proteínas de membrana e biogênese de vesículas (FOLMER; ELFERINK; PAULUSMA, 2009).

Figura 3 - Distribuição assimétrica de fosfolipídios e glicolipídios na bicamada lipídica da membrana plasmática.
FONTE: ALBERTS et al., 2004.

A perda da assimetria da membrana plasmática resulta na exposição de PS (Figura 4), que está associada a diversos fenômenos fisiológicos e patológicos tais como a macropinocitose a ativação plaquetária e apoptose (FADOK et al., 1992; FOLMER; ELFERINK; PAULUSMA, 2009).

Figura 4 - Perda da assimetria da membrana plasmática, com exposição de PS para a face externa.
 FONTE: ROLAND, 2008. Disponível em: <<http://www.cytographica.com/overheads/index.html>>.
 Acesso em: 22 set. 2008.

1.11 Apoptose ou Morte Celular Programada (MCP)

Apoptose, um tipo de morte celular programada (MCP), é um mecanismo fisiológico capaz de remover células indesejadas e regular o número de células de um organismo multicelular. Este tipo de MCP também ocorre em organismos unicelulares (BARCINSKI; DOSREIS, 1999). Os eventos apoptóticos se iniciam na mitocôndria, com perda de potencial e liberação de citocromo C e a conseqüente ativação de cisteíno-proteinases conhecidas como caspases (Cysteínyl ASPartate-specific proteinASE), enzimas com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico (DONNELLY et al., 2000). A apoptose pode também ser iniciada por ativação de receptores da família do TNF- α (SHAHA, 2006). Uma vez desencadeada, a apoptose evolui com exposição de PS, redução no volume celular, condensação da cromatina e clivagem do DNA por endonucleases, resultando em fragmentos do tamanho de 180 - 200 pb ou múltiplos deles (KOOPMAN et al., 1994; SHAHA, 2006) e na formação de corpos apoptóticos (MOREIRA; BARCINSKI, 2004). Este tipo de morte não induz inflamação e leva à rápida remoção da célula pelos fagócitos (FADOK et al., 2000; BALANCO et al., 2001; WANDERLEY et al., 2005). A presença de cálcio no meio extracelular é necessária para uma eficiente exposição de PS durante a apoptose (HAMPTON et al., 1996; UTHAISANG et al., 2003).

A capacidade microbicida dos fagócitos é inibida quando ocorre o reconhecimento da PS exposta na superfície das células apoptóticas, por um receptor de PS (PSR) (FADOK et al., 2000). Esse reconhecimento induz nos macrófagos, a síntese de citocinas anti-inflamatórias como o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) (Figura 5) e a IL-10 e inibe síntese da citocina pró-inflamatória TNF- α . A interação PS/PSR tem por conseqüência a internalização e a eliminação das células apoptóticas (MCDONALD *et al.*, 1999).

Leishmania, entre outros organismos unicelulares, também sofrem MCP. As formas apoptóticas de promastigotas são sempre destinadas à morte (VAN ZANDBERGEN et al., 2006; WANDERLEY et al., 2009), diferentemente do que ocorre nas formas apoptóticas de amastigotas. Estas últimas expõem PS na superfície, sem necessariamente resultar na morte por apoptose, mas, ao contrário, a exposição de PS permite a internalização e sobrevivência intracelular dos amastigotas. Este processo foi denominado de Mimetismo Apoptótico (Figura 5) (BALANCO et al., 2001; MOREIRA; BARCINSKI, 2004; WANDERLEY et al., 2005). Formas promastigotas de *Leishmania* também expõem PS, porém na fase estacionária, a exposição de PS é significativamente maior, quando comparada com a fase logarítmica de crescimento. A exposição de PS participa da infectividade dos promastigotas, ou seja, na fase estacionária, onde ocorre maior exposição de os PS, estão presentes os promastigotas metacíclicos infectivos (TRIPATHI; GUPTA, 2003).

Figura 5 - Reconhecimento de PS, nas células apoptóticas e nos amastigotas. Formas promastigotas de *Leishmania* são sempre destinadas à morte, enquanto que formas amastigotas sobrevivem no interior dos macrófagos (Mimetismo Apoptótico). A síntese de citocinas anti-inflamatórias pelo macrófago, como o TGF-β, inibe os mecanismos microbicidas, favorecendo a proliferação dos amastigotas
 FONTE: Ilustração: REAL, F.

1.12 Translocase de Aminofosfolipídio

O mecanismo responsável pela exposição da PS ainda não está bem definido. Sabe-se que uma atividade dependente de adenosina trifosfato (ATP) está envolvida no processo, provavelmente uma enzima ATPase tipo-P, que apresenta um estado intermediário fosforilado, daí a nomenclatura “P”. As ATPases tipo-P (também conhecida como E1-E2 ATPases) formam uma grande família de proteínas transmembranares, conservadas, amplamente expressas em procariontes e eucariontes, incluindo: bactérias, fungos, parasitas, nematóides, insetos, plantas e animais. Estão envolvidas no transporte de metais, íons e fosfolipídios, através da membrana plasmática, contra um gradiente de concentração, utilizando ATP como fonte de energia. O ciclo catalítico da enzima envolve uma desfosforilação, gerada pela hidrólise do ATP (HARRIS; ARIAS, 2003; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005).

Todas as ATPases tipo-P são proteínas integrais de membrana, de múltiplos domínios transmembranares (6, 8 ou 10), com massas moleculares variando de 70 - 150 kDa (KÜHLBRANDT, 2004). Tanto o carboxi-terminal como o amino-terminal estão voltados para a face citosólica da membrana. As ATPases tipo-P apresentam uma sequência conservada de sete aminoácidos: DKTGT[L,I,V,M][T,I,S] (KÜHLBRANDT, 2004; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005). Essa sequência inclui um resíduo de ácido aspártico (‘D’), que é essencial no ciclo de reação da proteína, que se torna fosforilado após a hidrólise de ATP (PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005). Com base na homologia de sequências, a família de ATPases tipo-P pode ser dividida em cinco classes, de acordo com a sua estrutura secundária e especificidade do substrato, referidos como tipos I a V (HARRIS; ARIAS, 2003; KÜHLBRANDT, 2004; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005). As ATPases tipo-I estão relacionadas com o transporte de metais pesados tais como cobre, cádmio e zinco; as do tipo-II com o transporte de Na^+/K^+ , H^+/K^+ e Ca^{2+} ; as do tipo-III expressas em plantas e fungos, estão envolvidas com o transporte de H^+ e Mg^{2+} . As do tipo-IV (P4 ATPase) são exclusivamente expressas em células eucarióticas e foram implicadas na translocação das moléculas de fosfolipídio, especificamente da PS e da PE (AXELSEN; PALMGREN, 1998; FLAMANT et al., 2003; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005). Por fim, as do tipo-V, ainda desconhecidas, mas são prováveis candidatos para o transporte de ânions (KÜHLBRANDT, 2004).

Estudos em leveduras, *Arabidopsis*, *Leishmania*, *Caenorhabditis elegans* e mamíferos indicam que as P4 ATPases apresentam atividades essenciais que são importantes no início da biogênese de vesículas, transporte vesicular, e/ou na manutenção da integridade da membrana. Especialmente em leveduras, estudos funcionais mostraram a importância das P4 ATPases nos diferentes caminhos do tráfico intracelular vesicular (FOLMER; ELFERINK; PAULUSMA, 2009).

As P4 ATPases são translocases de aminofosfolipídios (APTLs) que participam preferencialmente, do movimento "flip-flop" de PS. A literatura, ainda contraditória, descreve que em *C. elegans* e nos demais eucariotos, a APLT é responsável por manter a assimetria da membrana impedindo que a PS seja exposta na face externa da membrana (DEVAUX; LÓPEZ-MONTERO; BRYDE, 2006; TYURINA et al., 2007; DARLAND-RANSOM et al., 2008), enquanto que, outros autores postulam que esta enzima transloca a PS para a face externa (ZÜLLIG et al., 2007). Ainda não se sabe se a P4-ATPase purificada é suficiente para catalisar a atividade de translocase (ZHOU; GRAHAM, 2009). Em células HL-60 (células da leucemia promielocítica humana) foi descrito que o estresse nitrosativo inibe a APLT, resultando na externalização de PS que são reconhecidas pelos macrófagos (TYURINA et al., 2007).

Em *L. (L.) donovani* um transportador de Miltefosina (LdMT) foi identificado como uma ATPase tipo-P envolvida na translocação de fosfolipídios, essencial, porém, não suficiente para a atividade de translocar fosfolipídios e de potencializar o efeito da droga (PÉREZ-VICTORIA et al., 2003; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006).

A atividade das APTLs foi primeiro descrito em eritrócitos humanos como dependente de ATP (SEIGNEURET; DEVAUX, 1984). A mesma atividade foi detectada em uma ampla variedade de tipos celulares incluindo plaquetas, linfócitos, fibroblastos, espermatozóides e hepatócitos (DALEKE, 2003), assim como em *C. elegans* (WILLIAMSON; SCHLEGEL, 2002; ZÜLLIG et al., 2007; DARLAND-RANSOM et al., 2008), e no fungo *Saccharomyces cerevisiae* (STEVENS; MALONE; NICHOLS, 2008). As P4 ATPases são altamente conservadas em todas as células eucariotas (ZÜLLIG et al., 2007).

No presente trabalho identificamos, clonamos e transfectamos uma translocase de *Leishmania (L.) amazonensis* com o objetivo de demonstrarmos a sua eventual participação no mecanismo de exposição de PS neste parasita.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar a funcionalidade da APLT em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a sequência do gene da *aplt* de *L. (L.) amazonensis*;
- Definir “in silico” características da putativa proteína APLT de *L. (L.) amazonensis*;
- Comparar os níveis do transcrito da *aplt* na metaciclogênese de formas promastigotas e nos amastigotas recém isoladas de lesões de camundongos BALB/c;
- Avaliar as consequências da superexpressão do gene *aplt* e correlacionar com a exposição da PS em células CHO-K1 e nos promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Organismos utilizados

3.1.1.1 Animais

Camundongos isogênicos fêmeas da linhagem BALB/c com dois a três meses de idade, criados e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/USP. Todos os procedimentos realizados com animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.1.1.2 Bactérias

Escherichia coli da linhagem DH10B, gentilmente cedidas pelo Prof^o. Dr. Gerhard Wunderlich, foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,17 M NaCl).

3.1.1.3 Célula de mamífero

Células de ovário de hamster chinês (CHO) da linhagem CHO-K1, cultivadas em meio RPMI completo pH 7,2 (RPMI 1640 – Cultilab) filtrado à vácuo, com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB – Cultilab) previamente inativado a 60 °C por 1 hora e 20 µg/ml de Gentamicina (GIBCO).

3.1.1.4 Parasita

Leishmania (Leishmania) amazonensis cepa LV79 (WHO type – MPRO/72/M1841), cultivada em meio Warren completo pH 7,2 (37 g/l de Brain Heart Infusion (Difco laboratories, Detroit, MI), suplementado com 0,1 µg/ml de ácido fólico (SIGMA, Chemical

Co. St. Louis, MO, USA), autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Acrescido com 0,01 g/l de hemina (SIGMA), dissolvida em 2 N de NaOH, 20 µg/ml de Gentamicina e 10% SFB.

3.1.2 Plasmídeos

pcDNA3 (Invitrogen): vetor com 5.446 pb, para expressão em células de mamíferos. Possui um promotor de citomegalovírus (CMV) seguido de um sítio múltiplo de clonagem (*polylinker*). Este vetor apresenta um promotor do SV40 que induz a expressão do gene da neomicina fosfotransferase (NEO) que confere resistência a Geneticina (G418) e uma origem de replicação funcional em células de mamíferos (SV40). Também confere resistência a Ampicilina (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich).

pGEM-T Easy (Promega): vetor de 3.018 pb, específico para clonagem de produtos de PCR. Vetor linearizado, apresenta a base nitrogenada, timina nos terminais 3' e presença da região codificadora da enzima β -galactosidase. Confere resistência a Ampicilina.

pTZ57R/T (Fermentas): vetor de 2.886 pb, específico para clonagem, construído com gene *gfp* (proteína verde fluorescente) que codifica a proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*. Presença da região codificadora da enzima β -galactosidase. Confere resistência a Ampicilina (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich).

pXG1: vetor de 6.822 pb, específico para expressão em *Leishmania*. Contém as regiões 5' e 3' do gene dihidrofolato redutase timidilato sintase (DHFRTS) de *L. (L.) major* e confere resistência a Geneticina (gentilmente cedido pela Prof^a. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter).

3.1.3 Enzimas de restrição

As enzimas de restrição utilizadas para clivar o DNA, foram enzimas *FastDigest* (Fermentas). A digestão foi realizada conforme o protocolo descrito pelo fabricante.

3.1.4 Reagentes

AMRESCO: LiCl. **Bio-Rad:** Tris. **Fermentas:** Glicogênio. **GIBCO:** Glicerol, SDS. **Merck:** Clorofórmio, D – Glicose, EDTA, Etanol, Formaldeído 37%, HCl, KCl, KH₂PO₄, MgCl₂, NaCl, NaH₂PO₄, NaOH. **SIGMA:** Ágar bacteriológico, CaCl₂, Extrato de levedura, HEPES, Isopropanol, Triptona. **Synth:** Acetato de Sódio, K₂HPO₄, Na₂HPO₄.

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento de formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* de lesões de camundongo BALB/c

Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram mantidas *in vivo* em camundongos BALB/c inoculados no coxim plantar, com 2×10^6 promastigotas da fase estacionária (7^o dia), em um volume de 50 µl de tampão PBS (2,6 mM NaH₂PO₄; 7,4 mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl) pH 7,2. Após dois a três meses, os animais foram sacrificados e as lesões foram removidas em condições de esterilidade. O tecido foi cortado e homogeneizado em tampão PBS e as células foram ressuspensas e centrifugadas a 1.800 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e novamente ressuspensado em PBS e centrifugado a 1.400 g por 20 minutos a 4 °C, repetindo-se esse procedimento por mais duas vezes. Após a última centrifugação, os parasitas foram ressuspensos em meio RPMI completo com 4% SFB e incubados por 3 horas, em agitação média, a temperatura ambiente, para a liberação das membranas dos vacúolos macrófagos (CHANG, 1980; RABINOVITCH; ZILBERFARB; RAMAZEILLES, 1986).

As formas amastigotas foram lavadas em PBS e centrifugadas a 1.400 g por 10 minutos, e esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após as lavagens, 1×10^8 amastigotas foram ressuspensos em 1 ml de Trizol (Invitrogen) e armazenados a -70 °C, para posterior extração de RNA. Os amastigotas restantes foram ressuspensos em 5 ml de meio Warren completo, e cultivados a 23 °C, para obtenção das formas promastigotas.

O cultivo de promastigotas foi feito em frascos de cultura com 5 ml de meio Warren completo, com repiques a cada sete dias para concentrações de 2×10^6 parasitas/ml.

3.2.2 Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A curva de crescimento dos promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi obtida a partir da cultura *in vitro* conforme descrito acima (3.2.1), a partir de um inóculo inicial de 2×10^6 parasitas/ml. Os parasitas foram fixados com formalina 0,25% (formaldeído 37%; PBS), visualizados em microscópio óptico, em aumento de 400 X e contados a cada 24 horas em câmara de Neubauer, durante nove dias.

3.2.3 Extração e quantificação do DNA genômico das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A extração do DNA genômico de formas promastigotas foi feita no 7º dia de cultura (fase estacionária), com o auxílio do QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, foi feita a quantificação do DNA extraído por meio do aparelho Qubit fluorometer (INVITROGEN).

3.2.4 Identificação e caracterização da APLT de *L. (L.) amazonensis*

3.2.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos para identificação da sequência do gene *aplt* *L. (L.) amazonensis*

Os oligonucleotídeos (Invitrogen) foram construídos baseados no alinhamento e comparação das sequências conservadas do gene *aplt* de: *Leishmania (L.) major* (LmjF34.3220) com 3.474 pb, *Leishmania (L.) donovani* (AAC19127) com 3.471 pb, *Leishmania (L.) infantum* (LinJ34.2740) com 3.474 pb, *Leishmania (V.) braziliensis* (LbrM20_V2.2800) com 1.919 pb e *Leishmania (L.) mexicana* (GQ856287) com 3.477 pb (ANEXO A), depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1990). O alinhamento foi feito utilizando-se o programa *GeneDoc* (NICHOLAS; NICHOLAS; DEERFIELD, 1997). A partir das regiões conservadas foram desenhados 13 oligonucleotídeos, sendo 07 no sentido senso e 06 no sentido antisenso (Figura 6) (Quadro 1), A confirmação da especificidade desses oligonucleotídeos foi feita pelo *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990).

Figura 6 - Alinhamento do gene *aplt* de cinco espécies de *Leishmania* depositadas no *GenBank* (ALTSCHUL et al., 1990), utilizando o *GeneDoc* (NICHOLAS; NICHOLAS; DEERFIELD, 1997): *L. (V.) braziliensis* (nº de acesso: LbrM20_V2.2800), *L. (L.) donovani* (nº de acesso: AAC19127), *L. (L.) infantum* (nº de acesso: LinJ34.2740), *L. (L.) major* (nº de acesso: LmjF34.3220) e *L. (L.) mexicana* (nº de acesso: GQ856287). A linha amarela indica as seqüências dos oligonucleotídeos. A seta (→) indica sentido senso e a seta (←) indica sentido antisenso dos oligonucleotídeos.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados para identificação do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis*. (F): foward (senso) e (R): reverse (antisenso).

Oligonucleotídeos	Tamanho (b)	Seqüência	Posição	TM (°C)
TAT-L1 (F)	20	5' ATG CGA CGC ATA CGC TAC CG 3'	1 a 20	59.0
TAT-L2 (F)	21	5' ATG TTC GTG CGC TTC TTC ATC 3'	1150 a 1170	57.0
TAT-L3 (F)	20	5' ACG GGT GAC AAG GTC GAG AC 3'	2290 a 2309	59.0
TAT-L5 (R)	20	5' TTA CAG TAA CCA CCG CAG CC 3'	2583 a 2602	57.0
TAT-L6 (R)	20	5' ACT GGG CTC ACA TTG TGG CA 3'	1582 a 1601	57.0
TAT-L7 (F)	20	5' CAA CCG TCG CTA CAC GCT CT 3'	345 a 364	59.0
TAT-L8 (R)	20	5' CGA GAT GGG AAT CAT GGA CG 3'	1178 a 1197	57.0
TAT-L9 (F)	21	5' CGA CCT TAT CAA AGC CAT CGT 3'	1157 a 1577	57.0
TAT-L10 (R)	20	5' CAG GTA CTC GAT GCG GCA GT 3'	2351 a 2370	59.0
TAT-L11 (F)	20	5' CCG CCT ACT CGG TGA TAG TG 3'	2540 a 2559	59.0
TAT-L12 (R)	20	5' TCA GCA TCA TGA CCC CTC CT 3'	3093 a 3112	57.0
TAT-L13 (R)	20	5' TCA CGA CCG ACG TCC CAT CC 3'	3455 a 3477	61.0
TAT-L14 (F)	20	5' GGA CGA CCA TGT CTG TCT TC 3'	2888 a 2907	57.0

3.2.4.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR) a partir do DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*

As reações de PCRs foram feitas com 0,1 µg de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*, utilizando-se diferentes combinações dos 13 oligonucleotídeos desenhados, nas concentrações de 0,2 µM de oligonucleotídeo senso e 0,2 µM de oligonucleotídeo antisenso, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 2 U da enzima *Taq Platinum* polimerase, 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl (Invitrogen) e H₂O *nuclease free* (Amresco) na quantidade suficiente para 100 µl. O controle negativo foi feito com a adição de água ao invés de DNA. As reações foram feitas em termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf) com 1 ciclo inicial de desnaturação por 4 minutos a 94 °C, seguido de 34 ciclos de: desnaturação por 30 segundos a 94 °C, associação dos oligonucleotídeos por 45 segundos, em temperaturas entre 48 °C a 64 °C, extensão de 1 a 4 minutos (dependendo do tamanho do fragmento a ser amplificado, respeitando a proporção de 1 minuto para cada 1.000 pb) a 72 °C. Ao término dos 34 ciclos, foi feita incubação a 72 °C por 10 minutos para o término da extensão pela *Taq platinum* polimerase.

3.2.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose (Invitrogen) nas concentrações de 0,8 a 2,0% em tampão TAE (40 mM Tris-acetado e 1 mM EDTA). Uma corrente para gerar uma voltagem de 100 volts foi aplicada ao gel. O gel foi corado com brometo de etídio (0,75 µg/ml) (SIGMA), observado em transiluminador ultravioleta (UV) e fotografado no ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare). Como referência para o tamanho dos fragmentos foi utilizado O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

3.2.4.4 Purificação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA separados por eletroforese foram extraídos do gel de agarose, purificados por centrifugação a 13.000 g por 20 minutos em temperatura ambiente em tubos

para centrífuga com filtro (Spin-X – Costar), adicionou-se 1 µg de glicogênio para cada 250 µl de amostra, 0,1 volumes de 3 M de Acetato de Sódio pH 7,0 e 2,5 volumes de isopropanol gelado. A mistura foi incubada por uma noite a -20 °C. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 11.000 g por 20 minutos a 4 °C, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1 ml de etanol 70% gelado. A mistura foi novamente centrifugada nas mesmas condições, retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em um volume de 20 µl de água H₂O *nuclease free* e quantificadas no Qubit.

3.2.4.5 Ligação dos fragmentos de DNA no plasmídeo

Os produtos purificados foram clonados nos plasmídeos: pGEM-T Easy, pcDNA3 e pXG1. A concentração do inserto para a ligação foi calculado pela fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{razão inserto : vetor} = \text{ng do inserto}$$

Na proporção 1 unidade de massa de plasmídeo para 5 unidades de massa de fragmento de DNA. Para ligação no pGEM-T Easy adicionou-se o inserto na proporção calculada, 5 µl do 2X *Rapid Ligation Buffer* T4 DNA *Ligase*, 25 ng do vetor pGEM-T Easy, 1 µl de T4 DNA *Ligase* e H₂O *nuclease free* em quantidade suficiente para 10 µl. A mistura foi incubada por uma noite a 4 °C. Desta, 6 µl foram utilizados para transformar células competentes DH10B. O mesmo foi feito para a ligação no pcDNA3 e no pXG1, utilizando os vetores correspondentes, no mesmo tampão 2X *Rapid Ligation Buffer* e mesma T4 DNA *Ligase* presente no kit do pGEM-T Easy.

3.2.4.6 Preparo das células competentes DH10B

Para o preparo de células competentes DH10B, uma colônia isolada foi retirada de uma placa de Petri com meio LB, 1,5% de ágar, e transferida para 3 ml de meio LB, e incubada por uma noite sob agitação (200 rpm) a 37 °C. Desta cultura saturada, 0,5 ml foram transferidos para 99,5 ml de meio LB e incubados a 37 °C sob agitação (200 rpm) até atingir

D. O. entre 0,3 e 0,6. As células foram centrifugadas a 900 g por 10 minutos a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 50 ml de 0,1 M CaCl₂ gelado. As células foram incubadas por 4 horas em banho de gelo a 4 °C e posteriormente centrifugadas nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspenso em 4 ml de solução gelada estéril de 0,1 M CaCl₂ e 15% de glicerol. As células foram aliqüotadas em tubos com 200 µl e estocadas a -70 °C.

3.2.4.7 Transformação de células bacterianas com DNA plasmidial

Após a ligação (item 3.2.4.5), 6 µl do DNA foram adicionados a 50 µl de células competentes DH10B e incubados a 4 °C por 20 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida a choque térmico a 42 °C por 45 segundos e os tubos foram transferidos para 4 °C por 2 minutos. Adicionou-se 950 µl de meio SOC (2% tripton; 0,5% extrato de levedura; 8 mM NaCl; 250 mM KCl; 2 M MgCl₂; 20 mM glicose) e incubou-se por 60 minutos a 37 °C sob agitação constante (200 rpm). A cultura foi plaqueada em placas de Petri com meio LB, 1,5% de ágar, contendo 100 µg/ml de Ampicilina. Quando no vetor pGEM-T Easy adicionou-se as placas: 0,8 mg de X-Gal (usb) e 0,8 mg de IPTG (Technologies).

3.2.4.8 Seleção das colônias transformadas

A seleção de clones contendo o fragmento de DNA ligado no plasmídeo pGEM-T Easy foi feita pela análise da cor da colônia. Os clones contendo o fragmento de DNA de interesse geram colônias brancas, enquanto que os clones oriundos de plasmídeos religados sem o fragmento de DNA geram colônias azuis, já que este plasmídeo possui inserção no gene da β-galactosidase.

Para identificar se as bactérias transformadas continham o fragmento de DNA de interesse, cada colônia branca foi inoculada em 3 ml de meio LB com 300 µg de Ampicilina e incubada por uma noite sob agitação (200 rpm) a 37 °C. Foi feita a extração do DNA plasmidial em pequena escala, com o auxílio do kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL), seguindo o protocolo do fabricante. Para confirmar a inserção do fragmento de DNA, 100 ng do DNA plasmidial foram clivados com a enzima de restrição *EcoRI* para a

liberação do fragmento de DNA clonado, e com *SspI*, que digere o vetor nas regiões: 2.214 pb, 2.399 pb e 2.423 pb, permitindo desta maneira a extração do gene, sem resquício do vetor.

3.2.4.9 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram feitas com 0,75 µl de Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 5 pmol de oligonucleotídeos (M13 Reverse, M13 Forward e T7) e 100 - 200 ng de plasmidial ou até 100 ng de DNA amplificado por PCR, 0,3 M Tris-HCl pH 9,0, 16 mM MgCl₂ e H₂O *nuclease free* em volume final de 10 µl. As reações foram feitas em termociclador com 1 ciclo de 1 minuto a 96 °C, seguido de 34 ciclos de 96 °C por 45 segundos, 50 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos. Ao final das reações, foram adicionados 90 µl de isopropanol 66%, seguido de incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 g e o sobrenadante removido. Adicionou-se 150 µl de isopropanol 75% e os tubos foram centrifugados a 11.000 g por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco em temperatura ambiente. O precipitado seco foi ressuspensionado em 10 µl de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e desnaturado a 95 °C por 3 minutos, resfriado no gelo por 2 minutos e aplicado no sequenciador (ABI 3100 da Applied Biosystems).

A análise das seqüências foi feita utilizando-se o programa computacional *SeqManII* (DNASTAR – Inc., Madison, WI, U.S.A.) e os alinhamentos foram feitos com o auxílio do programa *MegAlign* (DNASTAR) utilizando o método ClustalV.

3.2.4.10 Análise computacional da seqüência nucleotídica do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis*

Após identificar a ORF (*open reading frame*) da *aplt* de *L. (L.) amazonensis*, foi feita a tradução da seqüência obtida por meio do programa *Translate Tool* (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) (GASTEIGER et al., 2003). Em seguida foi feita a predição teórica das principais características físico-químicas da seqüência de aminoácidos deduzida (massa molecular e pI) pelo programa *ProtParamTools* (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) (WILKINS et al., 1999). A identificação hipotética dos domínios foi obtida pelo programa *SMART* (*Simple Modular Architecture*

Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (SCHULTZ et al., 1998) e a predição de segmentos transmembrânicos foi realizada no programa *TMHMM 2.0* (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0) (SONNHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998). Para verificar se a proteína possuía peptídeo-sinal foi utilizado o programa *SignalP 3.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (EMANUELSSON et al., 2007). O alinhamento das seqüências de aminoácidos de todas as APLT de *Leishmania* e da TAT-1 de *C. elegans* foi feito pelo *GeneDoc* e a comparação das identidades entre elas pelo programa *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990). A predição das modificações pós-traducionais e da estrutura secundária foi realizada pelos programas *PROSITE* (www.expasy.org/tools/scanprosite/) (SIGRIST et al., 2002) e *GORIV* (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) (GARNIER; GILBRAT; ROBSON, 1996), respectivamente. Para confirmar se a proteína APLT de *L. (L.) amazonensis* possuía domínio P4 ATPase, foi feita análise pelo programa *InterPro* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) (APWEILER et al., 2001).

3.2.5 Extração e quantificação de RNA

Promastigotas foram sincronizados com 5 repiques feitas a cada 3 dias de cultura com meio Warren completo. O último repique foi feito com um inóculo inicial de $1,5 \times 10^6$ parasitas/ml. Do 3º ao 8º dia, foram coletados diariamente 1×10^8 parasitas que foram centrifugados a 1.400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, os parasitas foram ressuspensos em PBS e centrifugados a 1.400 g por 10 minutos, repetindo-se esse procedimento por mais duas vezes. Após a última centrifugação, os parasitas foram ressuspensos em 1 ml de Trizol e congelados a -80 °C. As amostras coletadas nos diferentes dias e os amastigotas (item 3.2.1) foram processadas para extração de RNA seguindo instruções do fabricante (manual Trizol - Invitrogen) descrito a seguir. Após descongelamento, as amostras foram mantidas em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio. As misturas foram rigorosamente agitadas por 15 segundos e mantidas em repouso por 3 minutos. Após centrifugação a 13.000 g por 15 minutos a 4 °C, a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro tubo e misturada com 0,5 ml de isopropanol. As amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e o RNA foi recolhido por centrifugação a 13.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 70%, repetindo-se as mesmas

condições da centrifugação anterior. O etanol foi removido e o precipitado seco a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em um volume de 10 µl de água DEPC (Invitrogen), rigorosamente agitadas, aquecidas por 10 minutos a 65 °C e transferidas para gelo. O RNA foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop - Thermo Scientific), no comprimento de onda (λ) de 260 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado por meio da análise da relação entre as leituras a 260 nm e 280 nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão entre 1,8 e 2,0.

Uma alíquota de 0,5 µl de RNA foi aplicada em gel de agarose 2% em tampão TAE para visualizar a integridade do RNA por meio da presença dos RNA ribossômicos 24S α e 24S β (HERNÁNDEZ; DÍAZ-DE LÉON; CASTAÑEDA; 1988) e 18S (WHITE; RUDENKO; BORST, 1986), e também para verificar possíveis contaminações com DNA genômico. Como referência para o tamanho dos fragmentos, foi utilizado 0,24 - 9,5 kb RNA Ladder (GIBCO).

3.2.5.1 Tratamento com DNase

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, 1,5 µg de RNA foi tratado com 1,5 U de DNase I em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 2 mM MgCl₂ e 50 mM KCl (Invitrogen), em H₂O DEPC na quantidade suficiente para 10 µl. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Adicionou-se EDTA (Invitrogen) para concentração final de 3 mM e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65 °C.

3.2.5.2 Transcrição reversa

A transcrição reversa do RNA tratado com DNase I para cDNA foi feita utilizando-se a enzima transcriptase reversa (SuperScript[™] II Reverse Transcriptase – Invitrogen). Para este protocolo foram inicialmente adicionados ao RNA, 50 ng de *random primers*, 250 ng de oligo (dT), 500 µM de dNTP (Invitrogen) em H₂O DEPC na quantidade suficiente para 20 µl. Esta mistura foi aquecida por 5 minutos a 65 °C, e por 2 minutos a 42 °C, em um termociclador. Em seguida, foram adicionados 7 mM DTT, 40 U de inibidor de RNase (RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor), 200 U da enzima transcriptase reversa, tampão 20 mM

Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl (Invitrogen). Essa mistura foi aquecida no termociclador, por 50 minutos a 42 °C e 15 minutos a 70 °C.

3.2.5.3 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços (ThermoFast® 96 PCR Plate Non-Skirted – Thermo Scientific), utilizando o reagente *ABsolute QPCR SYBR Green Mix* (Thermo Scientific) e o equipamento Mastercycler® ep realplex (Eppendorf). A determinação da intensidade de fluorescência (Rn) foi feita pelo aparelho, e o valor da linha de corte (*threshold*) que define o nível de fluorescência detectável, foi determinado automaticamente. O número do ciclo em que a Rn cruza o *threshold* corresponde ao Ct (*cycle threshold*) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade do transcrito de interesse, e quanto menor o seu valor, maior a quantidade deste RNA mensageiro (mRNA) presente na amostra.

O cálculo da quantificação relativa (QR) foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) e o gene normalizador utilizado foi o da *arginase*. Consideramos significativo todo o valor de QR > 2 ou QR < 0,5.

A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) foi:

$QR = 2^{\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}, \text{ e } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$
--

3.2.5.4 Padronização, especificidade e adequação dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação da *aplt* de *L. (L.) amazonensis* foram TAT-L12 (R) e TAT-L14 (F) (item 3.2.4.1), o tamanho do produto de amplificação gerado foi de 225 pb e sua temperatura de melting (Tm) 78,7 °C, calculada com o auxílio do programa *Primer Select* (DNASTar). Para a amplificação do gene da *arginase* foram utilizados os oligonucleotídeos ARG-22Mod e ARG-SC, gentilmente cedidos pela Profª Dra. Lucile Maria Floeter-Winter. O tamanho do produto de amplificação gerado por

este gene foi de 130 pb com Tm 81,5 °C (Quadro 2), também calculada pelo *Primer Select* (DNAsar).

Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene de referência (*arginase*).

Oligonucleotídeos	Tamanho (b)	Seqüência	Posição	TM (°C)
ARG-22Mod	21	5' GTG TCA TAC GAC GTG GAC ACG 3'	1629 a 1649	61.0
ARG-SC	22	5' CGA CAA GAC GAC CGC CAC TCG GC 3'	1737 a 1758	69.0

A concentração de uso de cada par de oligonucleotídeos foi padronizada em reações de PCR em tempo real, descritas no item 3.2.5.6, utilizando as concentrações de 200 nM, 300 nM e 400 nM para cada par de oligonucleotídeos. Após as reações do PCR em tempo real foi escolhida a concentração que correspondia ao menor valor de Ct.

3.2.5.5 Cálculo da Eficiência

O cálculo da eficiência foi realizado como sugerido por Pfaffl e colaboradores (2002). Para cada par de oligonucleotídeos, fizemos um *pool* de cDNA das amostras de 3º ao 8º dia de cultivo de promastigotas nas diluições de 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625, e realizamos ensaios de PCR em tempo real, utilizando cada par de oligonucleotídeos na concentração já padronizada (item 3.2.5.4), nas condições descritas no item 3.2.5.6. A partir dos valores de Ct obtidos foi feito um gráfico de Ct (eixo Y) *versus* o logaritmo das correspondentes diluições de cDNA (eixo X) e por regressão linear foi obtida a melhor linha de tendência e a inclinação da reta. O valor da inclinação da reta foi utilizado para determinar a eficiência dos oligonucleotídeos para o gene de interesse. A fórmula utilizada para a eficiência (E):

$$E = (10^{-1/\text{inclinação}})$$

3.2.5.6 Reação de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata, utilizando por poço 1,97 µl do cDNA diluído 1:10, oligonucleotídeos para *aplt* e para *arginase* nas concentrações

padronizadas (item 3.2.5.4), 7,6 µl de *SYBR Green Mix* e *H₂O nuclease free* em quantidade suficiente para 15 µl. Para confirmar a ausência de qualquer contaminante, foram feitas reações na ausência de cDNA. As condições de amplificação utilizadas foram: 15 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 68 °C por 30 segundos.

A especificidade dos oligonucleotídeos foi confirmada através de uma curva (Curva de Melting), cujo pico correspondente à temperatura de dissociação do produto de amplificação (*amplicon*). Para isso, após a reação a placa foi submetida a um segundo programa que consistiu de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 15 segundos a 95 °C.

3.2.5.7 Critérios de Validação

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: (i) presença de controles negativos adequados, sem amplificação, (ii) curva de amplificação com padrão exponencial e com platô, e com o início de aumento antes de 30 ciclos, (iii) curva de dissociação adequada com pico único, (iv) amplificação do gene de interesse com Ct de até 35, (v) triplicatas do ensaio com diferenças inferiores a 1 Ct, (vi) valores de eficiência da reação (E) próximos de 2,0.

3.2.6 Transfecções

3.2.6.1 Construções

pcDNA3 + *aplt*

Construção contendo a ORF da *aplt* no pGEM-T Easy foi extraída com a enzima de restrição *EcoRI*, e clonada no vetor pcDNA3, também digerido com essa mesma enzima e desfosforilado utilizando-se *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)* (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. A clonagem foi confirmada por fragmentos de restrição utilizando a enzima *BglII* e por seqüenciamento parcial.

pcDNA3 + *gfp*

A ORF da *gfp* foi extraída do vetor pTZ57R/T utilizando-se as enzimas de restrição *XhoI* e *Sall*, e clonada no vetor pcDNA3, digerido com a enzima *XhoI* e desfosforilado

utilizando *CIAP*. A clonagem foi confirmada por fragmentos de restrição, utilizando as enzimas *XbaI* e *XhoI*, e por seqüenciamento parcial.

pcDNA3 + *aplt* + *gfp*

A ORF da *aplt* foi amplificada do vetor pcDNA3 + *aplt* com os oligonucleotídeos TAT-L18 (F) com sítio de clivagem para a enzima *BamHI* e TAT-L16 (R) que exclui o códon de terminação e com sítio de clivagem para *EcoRI* (Quadro 3), para ser inserido anterior a *gfp* no vetor pcDNA3 + *gfp*, digerido com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, e desfosforilado com *CIAP*. Para confirmar a clonagem foi feita a digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*.

pcDNA3 + (Kozak) *aplt* + *gfp*

A ORF da *aplt* foi amplificada do vetor pcDNA3 + *aplt* com os oligonucleotídeos TAT-L19 (F) com sítio de clivagem para a enzima *BamHI* e acrescida de uma trinca de nucleotídeos (ACC), denominada de “seqüência Kozak” (KOZAK, 1999; REQUENA et al., 2003) e TAT-L16 (R) (Quadro 3), para ser inserido anterior a *gfp* no vetor pcDNA3 + *gfp*, digerido com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, e desfosforilado com *CIAP*. Para confirmar a clonagem foi feita a digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*.

pXG1 + *aplt*

A ORF da *aplt* foi amplificada do vetor pcDNA3 + *aplt* com os oligonucleotídeos TAT-L18 (F) e TAT-L20 (R) com sítio de clivagem para *BamHI* (Quadro 3), e clonado no pGEM-T Easy. A ORF da *aplt* foi extraída com a enzima de restrição *BamHI*. A enzima de restrição *SspI* foi utilizada para a mesma finalidade do item 3.2.4.8. O fragmento extraído foi inserido no vetor pXG1 que foi previamente digerido com a enzima *BamHI* e desfosforilado com *CIAP*. A clonagem foi confirmada por fragmentos de restrição, utilizando a enzima *XhoI* e por seqüenciamento parcial.

pXG1 + (Kozak) *aplt*

A ORF da *aplt* foi amplificada do vetor pcDNA3 + *aplt* com os oligonucleotídeos TAT-L19 (F) e TAT-L20 (R) com sítio de clivagem para *BamHI* (Quadro 3), e clonado no pGEM-T Easy. A ORF da *aplt* acrescida com a “seqüência Kozak” (ACC) (KOZAK, 1999; REQUENA et al., 2003) foi extraída com a enzima de restrição *BamHI*. A enzima de restrição

SspI foi utilizada para a mesma finalidade do item 3.2.4.8. O fragmento extraído foi inserido no vetor pXG1 que foi previamente digerido com a enzima *BamHI* e desfosforilado com *CIAP*. A clonagem foi confirmada por fragmentos de restrição, utilizando a enzima *XhoI* e por seqüenciamento parcial.

As ligações dos insertos com os vetores foi descrita no item 3.2.4.5 e os fragmentos correspondentes a digestão foram visualizadas em gel de agarose (item 3.2.4.3).

Quadro 3 - Oligonucleotídeos utilizados na construção dos vetores para transfecção.

Oligonucleotídeos	Tamanho (b)	Seqüência	TM (°C)
TAT-L16 (R)	21	5' GAA TTC CGA CCG ACG TCC AT 3'	61.0
TAT-L18 (F)	24	5' CCG GAT CCA TGC GAC GCA TAC GCT 3'	73.0
TAT-L19 (F)	24	5' CCG GAT CCA CCA TGC GAC GCA TAC 3'	73.0
TAT-L20 (R)	25	5'GGG GAT CCT CAC GAC CGA CGT CCC A 3'	79.0

3.2.6.2 Extração de DNA de plasmídeo em larga escala conforme descrito por SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989.

Após a confirmação dos vetores construídos, as colônias foram inoculadas em 5 ml de meio LB, com 500 µg de Ampicilina e 0,5% de glicose, e mantidas sob agitação (200 rpm) por 4 horas a 37 °C. Desta cultura, 1 ml foi transferida para 250 ml de meio Terrific Broth (TB) (12% triptona; 24% extrato de levedura; 4 ml de glicerol; 0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄), com 25 mg de Ampicilina e mantidas sob agitação (200 rpm) por uma noite a 37 °C. Centrifugou-se a cultura a 1.200 g por 15 minutos a 4 °C; o meio foi descartado e as células foram ressuspensas em 15 ml de tampão 1 (50 mM de glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA). Na suspensão foi adicionado 20 ml de tampão 2 (200 mM NaOH; 1% SDS), e o tubo foi invertido 5 vezes. Acrescentou-se 15 ml do tampão 3 (3M Acetado de Potássio pH 5,5) à solução, novamente o tubo foi invertido 5 vezes e centrifugado a 1.200 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e filtrado. Adicionou-se 60% de isopropanol e a solução foi rigorosamente agitada e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada a 1.200 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco a temperatura ambiente, em seguida foi ressuspensado em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA). Adicionou-se 5 M de LiCl, a solução foi rigorosamente agitada e centrifugada a 1.200 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se o mesmo volume de

isopropanol. Esta solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida foi centrifugada a 1.200 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido com 1 ml de TE e adicionou-se 10 µg de RNase A (Fermentas), em seguida a solução foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Adicionou-se 1 ml de 13% PEG 6000, 1,6 M de NaCl, agitou-se rigorosamente e centrifugou-se 11.000 g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em 500 µl de TE e adicionou-se o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Invitrogen), agitou-se rigorosamente, centrifugou-se a 11.000 g por 5 minutos e retirou-se o sobrenadante, esse procedimento com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foi repetido por mais duas vezes. Ao sobrenadante adicionou-se 0,1 M de Acetato de amônio e 1 ml de etanol, agitou-se rigorosamente e a mistura foi incubada no gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 11.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido com cuidado e o precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 70% e centrifugado a 11.000 g por 10 minutos a 4 °C. O DNA foi ressuspendido em 100 µl de TE e quantificado no Qubit.

3.2.6.3 Transfecção transiente em CHO-K1

3.2.6.3.1 Cultivo e contagem das células CHO-K1

O cultivo de células CHO-K1 foi feito em frascos de cultura com 5 ml de meio RPMI completo, com 5% de SBF. As células foram cultivadas a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO₂. Aguardou-se confluência próxima de 100%, onde as células foram lavadas por duas vezes com tampão PBS. Adicionou-se 500 µl de solução tripsina/EDTA (250 mg – CULTILAB) e 400 µl de PBS. Após o descolamento das células, estas foram transferidas para um tubo cônico. Adicionou-se o mesmo volume de RPMI completo com 5% de SBF, agitou-se rigorosamente e uma alíquota foi diluída em PBS, levadas ao microscópio óptico, visualizadas em aumento de 400 X, e contadas em câmara de Neubauer.

3.2.6.3.2 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação das células CHO-K1 medida pela redução do sal tetrazólico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-brometo de difenil tetrazolio)

Após a contagem das células (item 3.2.6.3.1), estas foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em meio RPMI completo, 5% de SBF, no volume para se obter 2×10^6 células em 100 µl. Em uma placa de 96 poços (Nunc), colocou-se 100 µl de células em cada poço, total de 3 poços (experimento em triplicata). Colocou-se 50 µl de meio RPMI completo, 5% SBF, em 24 poços, 8 para cada triplicata, sendo um dos poços o controle negativo, só com RPMI. A partir desta concentração de células foi feita uma diluição seriada, transferindo 50 µl de células para um novo poço com 50 µl de meio RPMI, homogeneizou-se e transferiu 50 µl para outro poço e assim sucessivamente, na finalidade de se obter a população ideal de células. Adicionou-se em todos os poços, 100 µg de MTT (SIGMA) e a placa foi incubada a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO₂ por 1 hora. Após a incubação as células foram ressuspensas com 100 µl de isopropanol e analisadas em espectrofotômetro para microplacas de cultura (modelo 3550 Bio-Rad, Richmond, CA) para absorbância em 595 nm e referência de 655 nm (MOSMANN, 1983).

3.2.6.3.3 Ensaio com Valinomicina para induzir a apoptose das células CHO-K1

Após definida a viabilidade e a melhor população de células (item 3.2.6.3.2) foi feita a padronização da concentração do uso da Valinomicina (10 mg) (SIGMA) diluída em DMSO (SIGMA), com intuito de induzir a apoptose das células CHO-K1 (ABDALAH et al., 2006). Foram montadas duas placas e adicionou-se, nas células, diferentes concentrações de Valinomicina que variavam entre 100 µM a 5 µM e controle negativo com DMSO e o branco só com o meio RPMI. As placas foram incubadas a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após 5 horas, a primeira placa foi retirada da estufa e adicionou-se 100 µg de MTT, seguindo o mesmo procedimento do item 3.2.6.3.2. O mesmo procedimento foi feito para a segunda placa que foi retirada após 17 horas de incubação.

3.2.6.3.4 Preparo da placa para transfecção transiente em CHO-K1

Em uma placa com 12 poços (TPP) foi colocada uma lamínula circular de 2,5 mm de diâmetro em cada poço. Adicionou-se 2×10^4 de células CHO-K1 (população de células sugerida em relação à área da lamínula descrito no manual do kit ExGen 500 *in vitro* Transfection Reagent – Fermentas), ressuspendidas em 200 µl de RPMI completo, com 5% SBF, o descolamento das células foi descrito no item 3.2.6.3.1. A placa foi mantida em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, para a aderência das células. Adicionou-se 2 ml de meio RPMI completo, com 5% SBF, em todos os poços e a placa foi incubada a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.2.6.3.5 Transfecção transiente em CHO-K1 com ExGen 500

A transfecção transiente foi feita seguindo as instruções do fabricante (manual ExGen 500 *in vitro* Transfection Reagent – Fermentas) descrito a seguir. Após 2 dias, observou-se por meio do microscópio invertido, em aumento de 320 X, confluência próxima de 60%. Foram diluídos 2 µg dos vetores pcDNA3 + *aplt* e pcDNA3 + *gfp* em 100 µl de 150 mM de NaCl, agitou-se rigorosamente e centrifugou-se brevemente. Adicionou-se 6,6 µl de ExGen 500, agitou-se rigorosamente por 10 segundos e incubou as amostras por 10 minutos em temperatura ambiente. Nos poços, retirou-se os 2 ml de meio RPMI e lavou uma vez com PBS, em seguida adicionou-se 1 ml de meio RPMI completo com 5% de SBF. Em cada poço correspondente, adicionou-se sobre as células, 100 µl da solução preparada para transfecção. A placa foi incubada a 37 °C com atmosfera úmida de 5% de CO₂. Para os ensaios com o vetor pcDNA3 + *aplt*, após 24 horas, adicionou-se Valinomicina em 6 poços e incubou a placa novamente nas mesmas condições por 18 horas. O meio RPMI foi retirado de todos os poços, adicionou-se 400 µl de meio RPMI completo com 5% de SBF, 1:200 de anexina V (Alexa Fluor 488 conjugada - Invitrogen) (TRIPATHI; GUPTA, 2003) e 2,5 mM de CaCl₂. A placa foi mantida sob leve agitação, sem contato com a claridade, em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foi incubada a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO₂, por 15 minutos. Após a incubação os poços foram lavados uma vez com PBS, a lamínula foi retirada e colocada invertida em uma lâmina de vidro sobre uma gota de fluoromount G (Southern Biotech). Para os ensaios com o vetor pcDNA3 + *gfp*, foi feito mesmo procedimento acima, porém não foi adicionado Valinomicina e anexina V, na finalidade de confirmar a construção

do vetor e a eficácia da transfecção. As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência, utilizando-se filtro de 488 nm. As imagens foram captadas por uma câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência.

3.2.6.4 Transfecção estável em *L. (L.) amazonensis*

3.2.6.4.1 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* medida pela redução do sal tetrazólico MTT para definir a concentração ideal de Geneticina

Em uma placa de 96 poços, 2×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, na fase estacionária, foram ressuspensos em 100 µl de meio Warren completo e colocados em cada poço, total de 8 poços por experimento (feito em triplicata). Adicionou-se, nos promastigotas, diferentes concentrações de Geneticina (GIBCO) que variavam entre 5 µg/ml a 100 µg/ml, controle negativo sem a Geneticina e o branco só com o meio Warren. As placas foram incubadas a 23 °C por uma semana. Após a incubação, adicionou-se 100 µg de MTT e a placa foi incubada a 23 °C por 40 minutos. Após a incubação os promastigotas foram ressuspensos em 100 µl de SDS 10% e analisadas em espectrofotômetro o mesmo descrito no item 3.2.6.3.2. Em paralelo os parasitas foram acompanhados e visualizados em microscópio óptico 320 X, sem a adição de MTT.

3.2.6.4.2 Transfecção em *L. (L.) amazonensis* por eletroporação

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* do 7º dia de cultura foram centrifugados a 900 g por 10 minutos e ressuspensos em meio 199 sem vermelho de fenol (Invitrogen) para densidade final de 2×10^8 parasitas/ml. Foram utilizadas 3 cubetas de eletroporação de 4 mm (Bio-Rad) previamente resfriadas, utilizando o eletroporador Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) onde se aplicaram 500 µl dos parasitas e 25 µg do DNA plasmidial: pXG1, pXG1 + *aplt*, pXG1 + (Kozak) *aplt*. As cubetas com a mistura foram incubadas por 10 minutos no gelo. Para a eletroporação utilizou-se pulso calibrado de 2.500 volts, com capacitância de 25 µF, aguardou-se 10 segundos e repetiu a eletroporação. Os parasitas foram ressuspensos em 10 ml de meio Warren completo e levados à estufa 23 °C e somente após 24 horas foram

acrescentadas a droga de seleção (Geneticina) com a concentração estabelecida no item 3.2.6.4.1.

3.2.6.4.3 Obtenção dos clones

Para a obtenção dos clones isolados, as culturas foram plaqueadas em meio Warren, 20% de SBF, 1,5% de ágar e Geneticina na concentração ideal obtida no item 3.2.6.4.1.

Após uma semana, as colônias isoladas foram transferidas para uma placa de 96 poços (Nunc) contendo 200 µl de meio Warren completo e Geneticina na concentração estabelecida. A placa foi incubada a 23 °C por mais uma semana e as culturas foram transferidas para uma placa de 24 poços contendo 1 ml de meio Warren completo e Geneticina, e a placa foi incubada a 23 °C. Após uma semana transferiu-se 1,2 ml de cada cultura para uma garrafa contendo 4 ml de meio Warren completo com Geneticina e as garrafas foram incubadas a 23 °C.

3.2.6.4.4 Extração de DNA para recuperar plasmídeo

Após uma semana, 500 µl das culturas transfectadas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* do 7º dia de cultura foram centrifugadas a 900 g por 5 minutos e ressuspensas em 50 µl de 150 mM de NaCl. Adicionou-se 500 µl de TEF (150 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM; 1% SDS) e homogeneizou-se gentilmente. Adicionou-se 50 µg de proteinase K (QIAGEN) e a mistura foi incubada a 42 °C por 2 horas. Adicionou-se 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, agitou-se rigorosamente, centrifugou-se a 11.000 g por 5 minutos e sobrenadante foi retirado, esse procedimento foi repetido por mais uma vez. Adicionou-se 50 µl de 3 M de Acetato de Sódio pH 7,0, 100 µl de etanol gelado e a mistura foi incubada a -20 °C por uma noite. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 11.000 g por 30 minutos a 4 °C, o precipitado foi ressuspensado com 100 µl de etanol 70% e foi centrifugado a 11.000 g por 5 minutos a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante e o DNA foi ressuspensado em 50 µl de TE e quantificado no Qubit.

3.2.6.4.5 Confirmação da integração do plasmídeo

Após a recuperação dos plasmídeos, foram feitas transformações em bactérias DH10B como descrito no item 3.2.4.7. A presença de colônias foi o indicativo de que a transfecção funcionou. As colônias foram selecionadas como descrito no item 3.2.4.8. Foi feita a digestão com a *EcoRI* para confirmar a presença do vetor pXG1 e a digestão com a enzima de restrição *XhoI*, para confirmar a presença do gene *aplt* no vetor pXG1. Os fragmentos correspondentes foram visualizados em gel de agarose (item 3.2.4.3).

3.2.6.4.6 Curva de crescimento de formas promastigotas transfectadas de *L. (L.) amazonensis*

A curva de crescimento das formas transfectadas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi obtida a partir das culturas *in vitro* e foi comparada com o crescimento da forma não transfectada, a partir de um inoculo inicial de 6×10^5 parasitas/ml. Os parasitas foram fixados com formalina 0,25% (formaldeído 37%; PBS), visualizados em microscópio óptico, em aumento de 400 X e contados a cada 24 horas em câmara de Neubauer, durante nove dias.

3.2.6.4.7 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação de formas promastigotas do 6º dia de *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectada medida pela redução do sal tetrazólico MTT após choque térmico

Em uma placa de 96 poços, 5×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectadas, da fase estacionária do 6º dia, foram ressuspensas em 100 µl de meio Warren completo e foram colocados em cada poço, experimento foi feito em triplicata. A *L. (L.) amazonensis* não transfectada foram utilizadas como controle negativo. A placa foi incubada, a 34 °C por 2 horas (choque térmico). Após a incubação, adicionou-se nos outros poços 5×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectadas (controle negativo), da fase estacionária, ressuspensos em 100 µl de meio Warren completo. O branco só com o meio Warren. Adicionou-se 100 µg de MTT e a placa foi incubada a 23 °C por 50 minutos. Após a incubação os promastigotas foram ressuspensos em 100 µl de SDS 10% e analisadas em espectrofotômetro o mesmo descrito no item 3.2.6.3.2.

3.2.6.4.8 Análise por citometria de fluxo da externalização de fosfatidilserina (PS) em *L. (L.) amazonensis*

2×10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas e selvagens (não transfectadas), do 6º dia (fase estacionária) foram centrifugadas a 4.000 g por 5 minutos e ressuspensas em 100 µl de tampão de anexina (10 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂; 1,8 mM CaCl₂). Adicionou-se 1:200 de anexina V (Alexa Fluor 488 conjugada) e as amostras foram incubadas a 4 °C por 20 minutos. Adicionou-se 900 µl de tampão de anexina e 10 µg de Iodeto de Propídio (PI) (SIGMA). Os controles foram preparados com *L. (L.) amazonensis* transfectadas com o vetor pXG1 da seguinte forma: com anexina V e 100 µM digitonina (SIGMA); com PI e 100 µM de digitonina; com anexina V utilizando-se o tampão para anexina com 10 mM de EGTA ao invés de CaCl₂; e sem marcação (branco). 100.000 eventos de cada amostra, foram recolhidos no citômetro Beckman Coulter modelo SC 500 MPL e analisados no WinMDI versão 2.8. Em paralelo foram preparadas as mesmas amostras que foram incubadas a 34 °C por 2 horas (choque térmico) e preparadas como descrito acima para serem levadas ao citômetro.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

A curva de crescimento dos parasitas cultivados *in vitro* permite a identificação do início da fase estacionária. No caso presente este se deu no 5º dia da cultura (Figura 7).

Figura 7 - Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A seta indica o início da fase estacionária.

A extração do DNA genômico dos promastigotas do 7º dia, resultou na concentração de 200 ng/μl.

4.2 Identificação do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis*

Utilizando-se diferentes combinações dos 13 iniciadores desenhados (item 3.2.4.1), obtiveram-se diferentes tamanhos do fragmento do gene (Figura 8), que foram extraídos do gel de agarose, purificados, precipitados em glicogênio, clonados no PGEM-T Easy, seqüenciados e alinhados pelo programa MegAlign (DNASTar) pelo método ClustalV. Desta maneira foi possível definir o número exato de pares de bases (3.477 pb) e a seqüência completa do suposto gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* (Figura 9) (ANEXO B).

Figura 8 - Amplificação do gene *apt* (3.477 pb) a partir do DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* com os oligonucleotídeos das extremidades (TAT-L1 (F) e TAT-L13 (R)). Gel de Agarose 1%. (MM) Marcador Molecular 1kb; (1) Controle negativo do sistema de PCR; (2-4) Fragmento do gene *apt* amplificado em três diferentes temperaturas: 48 °C, 56 °C e 58 °C, respectivamente.

4.2.1 Seqüência do gene *apt* e características da seqüência deduzida de aminoácidos da APLT de *L. (L.) amazonensis*

A análise da seqüência nucleotídica do gene *apt* de *L. (L.) amazonensis*, revelou a presença de uma ORF contendo 3.477 pb, que codifica potencialmente uma proteína de 1.158 aminoácidos (ANEXO B), de massa molecular de 129.341,8 Da e ponto isoelétrico básico igual a 8,21 (Figura 9).

A proteína deduzida é particularmente predominante em leucina (10,9%) e valina (9,2%) (Figura 9), ambos aminoácidos hidrofóbicos. De forma mais generalizada, a composição em aminoácidos pode ser dividida em: 9,4% de aminoácidos ácidos, 11,5% de aminoácidos básicos, 26,1% de aminoácidos polares e 53% de aminoácidos não polares, sendo que destes 9,8% do total são aromáticos.

Número de aminoácidos: 1158			
Massa Molecular: 129.341,8 Da			
pI teórico: 8.21			
Composição de aminoácidos:			
Ala (A)	88	7.6%	
Arg (R)	81	7.0%	
Asn (N)	35	3.0%	
Asp (D)	56	4.8%	
Cys (C)	30	2.6%	
Gln (Q)	41	3.5%	
Glu (E)	53	4.6%	
Gly (G)	74	6.4%	
His (H)	19	1.6%	
Ile (I)	54	4.7%	
Leu (L)	126	10.9%	
Lys (K)	34	2.9%	
Met (M)	40	3.5%	
Phe (F)	66	5.7%	
Pro (P)	39	3.4%	
Ser (S)	91	7.9%	
Thr (T)	76	6.6%	
Trp (W)	19	1.6%	
Tyr (Y)	29	2.5%	
Val (V)	107	9.2%	

Figura 9 - Caracterização físico-química da proteína APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis* pelo *ProtParamTools* (WILKINS et al., 1999). Marcações em vermelho indicam os dois aminoácidos que predominam na sequência deduzida: leucina (10,9%) e valina (9,2%).

Na sequência deduzida de aminoácidos do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* existe dois potenciais domínios conservados: um entre os aminoácidos 167 a 434 (*E-value* 8,10e⁻⁰⁸; PF00122) e o outro entre os aminoácidos 852 a 932 (*E-value* < 1e⁻¹²; SM00012) (Figura 10). Além disso, oito domínios transmembranares conservadas de alta hidrofobicidade foram identificados (Figura 10 e 11).

Não há evidência de peptídeo-sinal na sequência deduzida. Os valores obtidos com a sequência deduzida foram inferiores aos estabelecidos pelo *cutoff* (Figura 12). Os valores de *cutoff* são fornecidos pelo programa *SignalP*, a padronização foi feita a partir do alinhamento de algumas proteínas secretoras que apresentavam peptídeo-sinal.

Figura 10 - Domínios conservados da sequência de aminoácido APLT de *L. (L.) amazonensis* deduzida pelo SMART (SCHULTZ et al., 1998). O retângulo cinza escuro representa o domínio das ATPases tipo-P (também conhecida como E1-E2 ATPases); retângulo cinza claro representa uma proteína tirosina fosfatase, domínio catalítico com especificidade não definida; em azul estão representados seis dos oito domínios transmembrânicos, os outros dois domínios se encontram na região do domínio ATPase tipo-P; em rosa região de baixa complexidade.

Figura 11 - Representação de potenciais regiões transmembranares da sequência de aminoácidos APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis*, pelo TMHMM 2.0 (SONNHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998). Regiões transmembranares marcadas de vermelho. Amino-terminal (*inside* 1 a 138) marcado de azul e carboxi-terminal (*inside* 1.141 a 1.158) marcado de verde, ambos voltados para a face citosólica.

Figura 12 - Análise para verificar se a APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis* possui peptídeo-sinal pelo *SignalIP 3.0* (EMANUELSSON et al., 2007). Os valores obtidos foram inferiores ao *cutoff* o que indicou ausência de peptídeo-sinal na sequência de aminoácidos.

Um alinhamento entre as sequências deduzidas de aminoácidos APLT de *L. (L.) amazonensis*, com outras 05 espécies de *Leishmania* e TAT-1 de *C. elegans*, foi feito para identificar e comparar as regiões de domínios transmembrânicos. A identidade entre aminoácidos comuns a todas as espécies alinhadas e a sequência conservada de sete aminoácidos [DKTGTLT] na qual o ácido aspártico ('D') é fosforilado após a hidrólise de ATP (Figura 13).

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

C. elegans	:	QALMAADIRVWMLTGDKRETAINTAHSCALC--HTNTELLI-VDKTTYEETQKLEQFVARAIELEKQEGFAMVIDGKS	:	712
L. (L) amazo	:	ETLGMCGIKVWMLTGDKVETATTIGRSTRILIPRHCRIEYLCGMTPADIGHRLYELQEEFCWGVTCSSILPQWTLVLVDGNA	:	830
L. (V) brazi	:	EALGMCISIKVWMLTSGKVETAATIGRSTRILIRHCRIEYLCGMAPPDIDPRLRELQEE	:	635
L. (L) donov	:	ETLGMCGIKVWMLTGDKVETATTIGRSTRILIPRHCRIEYLCGMADADIGHRLHELQEEFCWGVTCGSIVPPWTLVLVDGNA	:	828
L. (L) infan	:	ETLGMCGIKVWMLTGDKVETATTIGRSTRILIPRHCRIEYLCGMADADIGHRLHELQEEFCWGVTCGSIVPPWTLVLVDGNA	:	829
L. (L) major	:	ETLGMCGIKVWMLTGDKVETATTIGRSTRILIPRHCRIEYLCGMADADIGHRLHELQEEFCWGVTCGSIVPPWTLVLVDGNA	:	829
L. (L) mexic	:	ETLGMCGIKVWMLTGDKVETATTIGRSTRILIPRHCRIEYLCGMADADIGHRLHELQEEFCWGVTCSSILPQWTLVLVDGNA	:	830
C. elegans	:	LLHALTGEARKHFGDLALRCHAVVCCRMSPMQKAEVEMVRKLAKHV-VLAIGDGDANDVAMIQAANVGVGISGEEGLQAA	:	791
L. (L) amazo	:	LAYCLSHAS--FFAEVARTAYSIVIVARCSPQKAAVVTVMRDSRCDARVAAIGDGGNDVSMIQAANVGVGISGEEGLQAA	:	908
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	LAYCLSHAS--FFADVARTAYSIVIVARCSPQKAAVVTVMRDSRCDARVAAIGDGGNDVSMIQAANVGVGISGEEGLQAA	:	906
L. (L) infan	:	LAYCLSHAS--FFADVARTAYSIVIVARCSPQKAAVVTVMRDSRCDARVAAIGDGGNDVSMIQAANVGVGISGEEGLQAA	:	907
L. (L) major	:	LAYCLSHAS--SFADVARTAYSIVIVARCSPQKAAVVTVMRDSRCDARVAAIGDGGNDVSMIQAANVGVGISGEEGLQAA	:	907
L. (L) mexic	:	LAYCLSHAS--FFAEVARTAYSIVIVARCSPQKAAVVTVMRDSRCDARVAAIGDGGNDVSMIQAANVGVGISGEEGLQAA	:	908
C. elegans	:	SASDYAIPRFHFLRRLLLVHGAWNHDRSVKVIILYSFYKNICLYIIELWFMFSAWSQGTIFERWTIGMENVIFTAWPPVV	:	871
L. (L) amazo	:	MAADF SITKFSHCLRLIMWHGRNSYQRTCLRSQFIMHRGIVYAVVQTVFVSFLFACTTMSVFNGYLLMGYSTVFTMAPAFA	:	988
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	MAADF SITKFSHCLRLIMWHGRNSYQRTCLRSQFIMHRGIVYAVVQTVFVSFLFACTTMSVFNGYLLMGYSTVFTMAPAFA	:	986
L. (L) infan	:	MAADF SITKFSHCLRLIMWHGRNSYQRTCLRSQFIMHRGIVYAVVQTVFVSFLFACTTMSVFNGYLLMGYSTVFTMAPAFA	:	987
L. (L) major	:	MAADF SITKFSHCLRLIMWHGRNSYQRTCLRSQFIMHRGIVYAVVQTVFVSFLFACTTMSVFNGYLLMGYSTVFTMAPAFA	:	987
L. (L) mexic	:	MAADF SITKFSHCLRLIMWHGRNSYQRTCLRSQFIMHRGIVYAVVQTVFVSFLFACTTMSVFNGYLLMGYSTVFTMAPAFA	:	988
C. elegans	:	LGLFDHPVPAEQIMKYPALYA--	:	892
L. (L) amazo	:	L-VLDEDFNESDVHEYPLYKDLLKARSMNTRTFLQVWVASFFQGGVMMLMALQLFKSDMFQFVTIAYTSLITELVIVG	:	1067
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	L-VLDEDFNESDVHEYPLYKDLLKARSMNTRTFLQVWVASFFQGGVMMLMALQLFKSDMFQFVTIAYTSLITELVIVG	:	1065
L. (L) infan	:	L-VLDEDFNESDVHEYPLYKDLLKARSMNTRTFLQVWVASFFQGGVMMLMALQLFKSDMFQFVTIAYTSLITELVIVG	:	1066
L. (L) major	:	L-VLDEDFNESDVHEYPLYKDLLKARSMNTRTFLQVWVASFFQGGVMMLMALQLFKSDMFQFVTIAYTSLITELVIVG	:	1066
L. (L) mexic	:	L-VLDEDFNESDVHEYPLYKDLLKARSMNTRTFLQVWVASFFQGGVMMLMALQLFKSDMFQFVTIAYTSLITELVIVG	:	1067
C. elegans	:	ATAHLRILWRERRARFFFLCSEVVSLLMFFLAVVVLDPDTFDRDFFFSWSCWWRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYILFDP	:	1147
L. (L) amazo	:	ATAHLRILWRERRARFFFLCSEVVSLLMFFLAVVVLDPDTFDRDFFFSWSCWWRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYILFDP	:	1147
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	ATAHLRILWRERRARFFFLCSEVVSLLMFFLAVVVLDPDTFDRDFFFSWSCWWRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYILFDP	:	1145
L. (L) infan	:	ATAHLRILWRERRARFFFLCSEVVSLLMFFLAVVVLDPDTFDRDFFFSWSCWWRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYILFDP	:	1146
L. (L) major	:	ATAHLRILWRERRARFFFLCSEVVSLLMFFLAVVVLDPDTFDRDFFFSWSCWWRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYILFDP	:	1146
L. (L) mexic	:	ATAHLRILWRERRARFFFLCSEVVSLLMFFLAVVVLDPDTFDRDFFFSWSCWWRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYILFDP	:	1147
C. elegans	:	---SFQNRASFIGNFSLWIGLAIVHSLSLFFLTATMEHQVVDWNGLTGGWMLMLGNCAITFVVATVCFKALL	:	961
L. (L) amazo	:	RIAVSWMGRRS	:	1158
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	RIAVSCMGCRT	:	1156
L. (L) infan	:	RIAVSCMGCRT	:	1157
L. (L) major	:	RIAVSCMGCRT	:	1157
L. (L) mexic	:	RIAVSWMGRRS	:	1158
C. elegans	:	ECDSWTWPVVVACIGSIGLWIVFVIVYSLVFPHGIGGIGADMAGMAAIDMSSSYTFWLALLFIPLATLLWDLVIKSLFTIAM	:	1041
L. (L) amazo	:	---	:	---
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	---	:	---
L. (L) infan	:	---	:	---
L. (L) major	:	---	:	---
L. (L) mexic	:	---	:	---
C. elegans	:	PTPRELAVMYNKRTTSFNGFERLASYSNNVLENMRLTSSLRGTTGSTRSRTASEASLALAEQTRYGFASFQDESSAVA	:	1121
L. (L) amazo	:	---	:	---
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	---	:	---
L. (L) infan	:	---	:	---
L. (L) major	:	---	:	---
L. (L) mexic	:	---	:	---
C. elegans	:	QTELIRNVDSREKPTGR-	:	1139
L. (L) amazo	:	---	:	---
L. (V) brazi	:	---	:	---
L. (L) donov	:	---	:	---
L. (L) infan	:	---	:	---
L. (L) major	:	---	:	---
L. (L) mexic	:	---	:	---

70

Na proteína APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis* foram identificados dois sítios passíveis de sofrerem modificações pós-traducionais: 1 sítio para E1-E2 ATPases fosforilado (PS00154), nas posições 444 a 450, e 1 sítio de zinco carboxipeptidase (PS00133), nas posições 612 a 622 (Figura 14).

Figura 14 - Identificação dos sítios principais capazes de sofrerem modificações pós-traducionais na sequência de aminoácido da APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis* pelo PROSITE (SIGRIST et al., 2002). E1-E2 ATPases fosforilado (PS00154) e zinco carboxipeptidase (PS00133).

A estrutura secundária predominante, da APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis* é α -hélice (31,95%), podendo ocorrer também enovelamento aleatório (*random coil*) (40,41%) e folha β -extendida (*extended strand*) (27,63%) (Figura 15).

Figura 15 - Predição da estrutura secundária da sequência de aminoácidos APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis*, pelo GORIV (GARNIER; GILBRAT; ROBSON, 1996). Representação simplificada global da relação entre a estrutura primária e secundária da proteína: em azul α -hélice; em vermelho folha β -extendida; em roxo enovelamento aleatório. A estrutura α -hélice apresenta-se como a estrutura secundária predominante.

Além dos domínios E1-E2 ATPases e zinco carboxipeptidase, outros domínios também estão presentes: transportador de cátion ATPase (PTHR11939) e principalmente ATPase transportador de fosfolipídio (P4 ATPase) (TIGR01652) (Figura 16).

Figura 16 - Predição da ocorrência dos principais domínios funcionais e sítios importantes da sequência de aminoácidos APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis*, pelo *InterPro* (APWEILER et al., 2001).

Comparando-se a sequência do gene *aplt* *L. (L.) amazonensis*, com as demais sequências do gene *aplt* depositadas no *GenBank*, verificamos que a mesma apresenta 22% de identidade com o gene de *C. elegans*; 74% e 68%, respectivamente com *T. cruzi* e *T. brucei*; 78% de identidade com a *L. (V.) braziliensis*, 92% com a *L. (L.) major*, 93% com a *L. (L.) donovani* e 93% com a *L. (L.) infantum* e 99% com a *L. (L.) mexicana* (Figura 17 e 18).

Figura 17 - Comparação do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* com os maiores valores de identidade obtidos de 05 espécies de *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. brucei*, pelo *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1990).

Figura 18 - Árvore filogenética construída a partir da sequência do gene *aplt* depositada no *GenBank* de 06 espécies de *Leishmania*, *T. cruzi*, *T. brucei* e *C. elegans* (*tat-1*), pelo MegAlign (DNASTar) utilizando o método ClustalV.

4.3 Análise do RNA

Todas as amostras foram extraídas a partir de 1×10^8 parasitas, e foram feitos três experimentos independentes. A integridade do RNA e a ausência de contaminações com DNA foi visualizada em gel de agarose 2%. Observamos maior abundância de transcritos (RNA total) sempre no 3º dia, quando comparado com os demais dias e com RNA extraído de amastigotas de lesão de BALB/c (Figura 19).

Figura 19 - RNA de 1×10^8 promastigotas do 3º ao 8º dia e de amastigotas (Ama) isolados de camundongos BALB/c, em gel de agarose 2%. Presença dos RNAs ribossômicos 24S α , 24S β e 18S. Note-se a ausência de DNA. (MM) Marcador Molecular 0,24 - 9,5 kb.

4.3.1 Padronização da concentração dos oligonucleotídeos para PCR em tempo real

A concentração ideal para o par de oligonucleotídios TAT-L12 (R) e TAT-L14 (F) usados para a amplificação da *aplt* de *L. (L.) amazonensis* foi de 300 nM, enquanto que a concentração para o par de oligonucleotídeos ARG-22Mod e ARG-SC usados para amplificação do gene da *arginase* foi de 200 nM.

4.3.2 Validação interna e eficiência de amplificação das reações de PCR em tempo real

As curvas de amplificação foram obtidas com padrão exponencial e com platô, com o início do aumento antes de 30 ciclos. O Ct do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* variou entre 22 a 26, enquanto que o Ct do gene da *arginase* variou entre 22 a 27. As triplicatas de cada amostra apresentaram diferenças inferiores a 1 Ct.

A eficiência dos oligonucleotídeos foi calculada pela fórmula descrita no item 3.2.5.5, que resultou no valor de eficiência da reação em 1.997 para o gene *aplt* e 1.932 para o gene da *arginase*.

4.3.3 Expressão relativa do mRNA da *aplt* de *L. (L.) amazonensis* em relação ao 3º dia

Os valores de Ct obtidos no PCR em tempo real foram utilizados na fórmula descrita no item 3.2.5.3 para calcular a quantificação relativa (QR) do transcrito de *aplt* dos promastigotas do 4º ao 8º dia e dos amastigotas, em relação ao mRNA dos promastigotas do 3º dia, utilizando a *arginase*, como o gene normalizador. Os dados de QR (apresentados como razão *aplt/arginase*) e a curva de crescimento (densidade de parasitas) dos três experimentos independentes são mostrados na Figura 20.

A

B

C

Figura 20 - Quantificação relativa do gene *apt* (razão *apt/arginase*) e curva de crescimento (densidade de parasitas) de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em relação à promastigotas do 3º dia. Três experimentos independentes (A, B e C) são mostrados. Valores significativos para razões acima de 2 e abaixo de 0,5 (Delimitados por linha vermelha tracejada).

Comparando-se a expressão relativa do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* obtida nos três gráficos observou-se que as amostras do 6º e o 8º dia, que correspondem à fase estacionária, apresentaram valores significativamente aumentados em todos os gráficos, (Figura 20). As duas amostras de amastigotas analisadas também apresentaram valores aumentados de *aplt* em relação à promastigotas do 4º ao 8º dia, embora apresentem variações quantitativas (dados não mostrados).

As curvas de crescimento dos três experimentos também diferiram, principalmente quando se comparam as fases estacionárias do 1º e do 3º experimento (dias 6 a 8), nos quais as curvas não permaneceram lineares, como ocorreu no 2º experimento (Figura 20).

4.4 Transfecção transiente em CHO-K1

4.4.1 Padronização do uso da Valinomicina para induzir a apoptose das células CHO-K1

A padronização do ensaio da atividade enzimática mitocondrial, medida pelo ensaio colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983) demonstrou maior sensibilidade com o uso de 1×10^5 células CHO-K1 em 100 µl/poço. A concentração ótima de Valinomicina obtida pelo ensaio colorimétrico do MTT, para induzir a apoptose das células CHO-K1 foi de 100 µM, após 18 horas de incubação a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO₂ (Figura 21).

Figura 21 - Células CHO-K1 induzidas com 100 µM de Valinomicina, incubadas por 18 horas a 37 °C, com atmosfera úmida de 5% de CO₂, para a translocação de fosfatidilserina (PS). Anexina V foi usada para detectar a translocação de PS da face citosólica para a face externa da membrana plasmática. (A) Células não induzidas; (B) Controle DMSO; (C) 100 µM de Valinomicina. Aumento de 400 X.

As células que não foram induzidas apresentam marcações pontuais com a anexina V, e mantiveram-se com formato alongado e aderido, enquanto que a amostra controle, com DMSO, e a amostra com 100 µM Valinomicina, as marcações contornaram a membrana das

células, ocorreu mudança no formato das células que se tornaram arredondadas e muitas se desprenderam do fundo da placa. Não foram visualizadas diferenças fenotípicas, nas células marcadas com a anexina V, entre a amostra controle e a amostra com 100 μ M de Valinomicina (Figura 21).

4.4.2 Transfecção transiente em CHO-K1 com ExGen 500

Na transfecção com o vetor pcDNA3 + *aplt* não foram observadas diferenças significativas no fenótipo, quando comparada com as células não transfectadas. A morfologia celular e a marcação com anexina V não foram alteradas quando comparadas com as células não induzidas, controle com DMSO e com 100 μ M de Valinomicina (Figura 21).

Para verificar a eficiência da transfecção e identificar as células transfectadas foi construído o vetor pcDNA3 + *gfp*. Após a transfecção observou-se a fluorescência emitida pela proteína GFP no interior das células CHO-K1, indicando positividade da transfecção (Figura 22).

Figura 22 - Células CHO-K1 transfectadas com o vetor pcDNA3 + *gfp*, aproximadamente 20% das células foram transfectadas. Fluorescência emitida pela proteína GFP.

As construções dos vetores pcDNA3 + *aplt* + *gfp* e pcDNA3 + (Kozak) *aplt* + *gfp* estão ainda sendo realizadas.

4.5 Transfecção estável em *L. (L.) amazonensis*

A atividade enzimática mitocondrial, medida pelo ensaio colorimétrico do MTT utilizando 2×10^6 *L. (L.) amazonensis* viáveis da fase estacionária, em 100 μ l/poço, resultou na morte dos parasitas com o uso de 75 μ g/ml de Geneticina. A morte de todos os promastigotas ocorreu no período de uma semana e foi confirmada por meio da visualização em microscópio óptico.

4.5.2 Curva de crescimento de formas promastigotas transfectadas de *L. (L.) amazonensis*

A partir de um inóculo inicial de 6×10^5 parasitas/ml foi feita a contagem das culturas com os parasitas transfectados e não transfectados (selvagem) no período de nove dias. Foram observadas diferenças no padrão de crescimento dos parasitas (Figura 23).

Figura 23 - Comparação entre as curvas de crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não transfectada e transfectadas com os vetores: pXG1 (vermelho), pXG1 + *aplt* (azul) e pXG1 + (Kozak) *aplt* (roxo).

Os parasitas transfectados iniciaram a fase estacionária de forma mais tardia, no 7º dia, quando comparado com os parasitas não transfectados (selvagem) que iniciaram a fase estacionária no 6º dia. As *L. (L.) amazonensis* transfectadas com o vetor pXG1 e com vetor

pXG1 + (Kozak) *aplt* não entraram em fase estacionária pelo menos até o 9º dia de cultura (Figura 23).

4.5.3 Avaliação da viabilidade celular e/ou proliferação de formas promastigotas do 6º dia de *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectadas, medida pela redução do sal tetrazólico MTT após choque térmico

A atividade enzimática mitocondrial, medida pelo ensaio colorimétrico do MTT utilizando o mesmo número de *L. (L.) amazonensis* viáveis do 6º dia (5×10^6), resultou na diminuição das porcentagens de células viáveis, após o choque térmico de 34 °C por 2 horas. As porcentagens de células viáveis obtidas, após o choque térmico, foram as seguintes: *L. (L.) amazonensis* não transfectadas 44%; transfectadas com o vetor pXG1 70%; transfectada com o vetor pXG1 + *aplt* 49,2% e com o vetor pXG1 + (Kozak) *aplt* 49,2%.

4.5.4 Efeito da inserção do gene na exposição de PS

O efeito da inserção do gene na exposição de PS foi avaliado por citometria de fluxo, com as *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectadas (6º dia) por meio da fluorescência da anexina V (canal FL1) de cada célula, totalizando 100.000 células (eventos) para cada amostra (3 clones por amostra) (Quadro 4) incluindo-se apenas as células negativas para Iodeto de Propídio (PI).

Quadro 4 - Porcentagem (%) de cada construção de vetor de *L. (L.) amazonensis* transfectada e não transfectada (selvagem), positiva para Anexina V (AnxV+) e negativa para Iodeto de Propídio (PI-) em um total de 100.000 eventos.

Clone	Selvagem	pXG1	pXG1 + <i>aplt</i>	pXG1 + (Kozak) <i>aplt</i>
1	0,36%	1,5%	0,44%	1,38%
2	0,59%	1,77%	0,53%	1,32%
3	0,62%	1,58%	0,68%	1,25%

As transfecções com pXG1 e pXG1 + (Kozak) *aplt* foram as que resultaram na maior porcentagem de exposição de PS, enquanto que nas células não transfectadas (selvagem) e nas transfectadas com pXG1 + *aplt* e apresentaram valores próximos de exposição de PS.

4.5.5 Efeito do choque térmico nas *L. (L.) amazonensis* transfectadas

Segundo a literatura (Shaha, 2006) o choque térmico pode resultar na morte por apoptose dos parasitas, com a exposição de PS na superfície da membrana. O efeito do choque térmico foi avaliado por citometria de fluxo, com as *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectadas do 6º dia, comparando-se as amostras que sofreram ação do choque térmico (34 °C por 2 horas) com as amostras que não sofreram, pela exposição de PS, pela fluorescência da anexina V (canal FL1) de cada célula, totalizando 100.000 eventos para cada amostra (3 clones por amostra) (Figura 24).

Continua

Conclusão

Figura 24 - Histograma comparando exposição de PS entre parasitas que sofreram choque térmico por 2 horas a 34 °C (vermelho) e os que não sofreram, de três clones correspondentes a cada construção e três amostras não transfectada (selvagem), todas as amostras da fase estacionária do 6º dia. Avaliada por citometria de fluxo, pela fluorescência da anexina V de cada célula (100.000 eventos), canal FL1. (A): *L. (L.) amazonensis* selvagem (não transfectada); (B) *L. (L.) amazonensis* transfectada com o vetor pXG1; (C): *L. (L.) amazonensis* transfectada com o vetor pXG1 + *aplt*; (D): *L. (L.) amazonensis* transfectada com o vetor pXG1 + (Kozak) + *aplt*.

Em todas as amostras observou-se, em pelo menos dois clones, aumento da exposição de PS nas *L. (L.) amazonensis* que sofreram ação do choque térmico (Figura 24). A porcentagem de aumento, após o choque térmico, não variaram entre as *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectada (selvagem) (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

5.1 O gene *aplt*, as proteínas APLTs e *Leishmania* spp.

As adenosinas trifosfatases (ATPases) tipo-P, constituem uma ampla família de proteínas transmembranares envolvidas no transporte de metais, íons e fosfolipídios, através da membrana plasmática, utilizando ATP como fonte de energia. A família foi dividida em cinco classes, baseadas na estrutura secundária e na especificidade do substrato. Dentro desta família, as ATPases tipo-P classe IV (P4 ATPase) foram implicadas na translocação de aminofosfolipídios (APTLs) especificamente da fosfatidilserina (PS) durante a apoptose (KOOPMAN et al., 1994; AXELSEN; PALMGREN, 1998; FLAMANT et al., 2003; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005; SHAHA, 2006), porém o sentido do direcionamento ainda não está claramente definido. Os macrófagos reconhecem a PS exposta na superfície das células apoptóticas, por um receptor de PS (PSR); esse reconhecimento resulta na inibição da capacidade microbicida dos fagócitos (FADOK et al., 2000). As P4 ATPases são altamente conservadas e presentes em todos eucariotos (ZÜLLIG et al., 2007).

Nas leishmanias o gene *aplt*, até o presente momento, foi seqüenciado em 6 espécies: *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *Leishmania* (L.) *donovani*, *Leishmania* (L.) *infantum*, *Leishmania* (L.) *major*, *Leishmania* (L.) *mexicana* e *Leishmania* (V.) *braziliensis*. A partir da seqüência do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* com 3.477 pb e com o alinhamento de sua seqüência de aminoácidos deduzida com outras proteínas APLT foi possível obter informações quanto à identidade com as demais *aplt*, presença das regiões conservadas, domínios transmembranares e uma seqüência conservada de sete aminoácidos [DKTGTLT] (Figuras 10, 11, 13, 14, 17 e 18) (ANEXO B).

A comparação entre gene *aplt* da *L. (L.) amazonensis* com *aplt* da *L. (L.) mexicana*, revelou 99% de identidade entre essas duas espécies (Figuras 17 e 18). O nível elevado de identidade entre as duas espécies, reforça o fato de ambas pertencerem ao mesmo subgênero *Leishmania*, com 34 cromossomos e rearranjos entre os cromossomos 8 + 29 e 20 + 36, característica das espécies das Américas (BRITTO et al., 1998) As duas espécies são agentes etiológicos da leishmaniose cutânea e da leishmaniose cutânea difusa (BERZUNZA-CRUZ et al., 2000; WHO, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; OLIVEIRA et al., 2007), mas diferem entre si no vetor transmissor: *Lutzomyia flaviscutellata* é o vetor transmissor da espécie *L. (L.) amazonensis* e *Lu. olmeca*, o vetor transmissor da espécie *L. (L.) mexicana* (SACKS; KAMHAWI, 2001).

O gene *aplt* da *L. (L.) amazonensis* e os de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (Figuras 17 e 18), apresentam também identidade alta (93%). De fato as três espécies pertencem ao mesmo subgênero, mas diferem: no número de cromossomos, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* possuem 36 cromossomos cada uma (BRITTO et al., 1998; PEACOCK et al., 2007); estão presentes nas regiões que englobam o Norte e Oeste da África, Índia, China e região Mediterrânea da Europa (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999); nos vetores, os principais são: *Phlebotomus alexandri* e *P. ariasi*, respectivamente; e na forma clínica da doença que causam sendo agentes etiológicos da forma visceral ao invés da forma cutânea. (SACKS; KAMHAWI, 2001). Existem, porém relatos de que a *L. (L.) amazonensis* pode, eventualmente, transmitir também a forma visceral da doença (BARRAL et al., 1991). A identidade com a *aplt* de *L. (L.) major* foi de 92% (Figura 17 e 18). De fato, ambas são espécies pertencentes ao mesmo subgênero e são os agentes etiológicos de leishmaniose cutânea. No entanto diferem no número de cromossomos, a *L. (L.) major* possui 36 cromossomos (BRITTO et al., 1998; PEACOCK et al., 2007); na localização, espécie presente nas regiões que englobam o Norte e Oeste da África, Índia, China e região Mediterrânea da Europa (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999); e no vetor, sendo o *P. papatasi* o principal vetor transmissor da *L. (L.) major* (SACKS; KAMHAWI, 2001). No presente contexto, a discussão da relação *Leishmania*/vetor se torna importante em função da caracterização pelo nosso grupo de exposição de PS durante a metaciclogênese de promastigotas no trato digestivo do vetor (WANDERLEY et al., 2009) com eventual importância na infectividade do parasita.

A porcentagem da identidade obtida entre a sequência do gene *aplt* da *L. (L.) amazonensis* com a *aplt* da *L. (V.) braziliensis* foi de 78% (Figuras 17 e 18), identidade alta, porém a mais baixa entre as demais espécies de *Leishmania*. As duas espécies estão presentes nas Américas e são os agentes etiológicos da leishmaniose cutânea, contudo diferem: no subgênero, a *L. (V.) braziliensis* pertence ao subgênero *Viannia*; no número de cromossomos, possui 35 cromossomos, rearranjo entre os cromossomos 20 + 34 (BRITTO et al., 1998; PEACOCK et al., 2007); no vetor transmissor, ambos são do mesmo gênero, mas diferem na espécie *Lu. wellcomei* (SACKS; KAMHAWI, 2001). A *L. (V.) braziliensis* também é o agente etiológico da leishmaniose mucocutânea (WHO, 2000; SACKS; KAMHAWI, 2001).

A *aplt* de outros tripanossomatídeos como de *T. cruzi* e *T. brucei*, quando comparada com a *aplt* da *L. (L.) amazonensis*, apresentaram 74% e 68% de identidade (Figuras 17 e 18), respectivamente. Ambos são protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae. Com a

tat-1 de *C. elegans* a identidade foi de 22%, também considerada alta. Assim sendo podemos concluir que os genes das *aplt* são de fato altamente conservados (ZÜLLIG et al., 2007) pelo menos nos eucariotos analisados.

Duas importantes eventuais modificações pós-traducionais podem ser preditas na APLT de *L. (L.) amazonensis* a partir da sequência deduzida de aminoácido: E1-E2 ATPases fosforiladas e zinco carboxipeptidases (Figuras 10, 14 e 16). As E1-E2 ATPases fosforiladas (também conhecidas como ATPases tipo-P), formadas por uma sequência conservada de sete aminoácidos: DKTGT[L,I,V,M][T,I,S] (KÜHLBRANDT, 2004; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005), com o resíduo de ácido aspártico ('D') fosforilado após a hidrólise de ATP, que é essencial no ciclo de reação da proteína (PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005). As zinco carboxipeptidases (carboxipeptidases dependentes de zinco), nas quais o aminoácido histidina ('H') é um ligante de zinco que atua na função co-catalítica, podendo aumentar ou diminuir a catálise (VALLEE; AULD, 1993).

O alinhamento da sequência peptídica das proteínas APLT de *Leishmania* e TAT-1 de *C. elegans*, identificou uma sequência conservada de sete aminoácidos: DKTGTLT (KÜHLBRANDT, 2004; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005), interessante ausente na *L. (V.) braziliensis* (Figura 13).

5.2 As proteínas APLTs e exposição de PS

As proteínas de membrana podem ser divididas em duas populações principais: proteínas periféricas e proteínas integrais. As proteínas periféricas podem ser dissociadas das membranas, não se ligam a lipídeos e associam-se à superfície da membrana por meio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. As proteínas integrais são fortemente ligadas às membranas por meio de interações hidrofóbicas, ligando-se fortemente a lipídeos (HUNT et al., 1997). Muitas dessas proteínas atravessam completamente a membrana plasmática e são chamadas proteínas transmembranares, com domínios que consistem em uma série de 15 a 30 aminoácidos hidrofóbicos (não polares). Geralmente regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana possuem uma conformação α -hélice, que permite que as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos projetem-se para a face externa da hélice e interajam com os lipídeos de membrana, formando uma estrutura estável (HUNT et al., 1997; KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2004). Por causa da interação dos lipídios com estes domínios transmembranares, as proteínas integrais não podem ser isoladas e purificadas bioquimicamente sem prévia dissolução com detergentes.

Todas as ATPases tipo-P são proteínas integrais de membrana que apresentam números pares de segmentos transmembranares, com o terminal carboxila e o terminal amina voltados para a face citosólica da membrana e massa molecular que pode variar entre 70 - 150 kDa (KÜHLBRANDT, 2004; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005). A discriminação entre proteínas de membrana e proteínas solúveis pode ser realizada através de diferentes programas para predição de domínios transmembranares. Os programas mais eficientes predizem não só os domínios transmembrana individuais, mas também a topologia da proteína, como por exemplo, o número de domínios transmembranares e a orientação destas em relação à membrana. Pelo programa *ProtParamTools* caracterizou-se a ORF da APLT de *L. (L.) amazonensis* como uma proteína composta de 1.158 aminoácidos, de massa molecular de 129.341,8 Da (Figura 9). O programa *TMHMM 2.0* identificou a presença de 8 domínios transmembranares, com as regiões carboxi-terminal e amino-terminal voltados para a face citosólica da membrana (Figura 11). Estes dados confirmam os descritos na literatura. Na APLT de *L. (L.) amazonensis* a estrutura secundária predominante é a α -hélice (31,95%), uma das características das proteínas integrais (Figura 15) (HUNT et al., 1997; KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2004).

O ponto isoelétrico teórico de 8,21 (Figura 9) e as demais predições físico-químicas constituem informações úteis para as estratégias de purificação protéica visando estudos funcionais e estruturais.

Os peptídeos-sinais podem ser encontrados nas proteínas secretadas e na maioria das proteínas de superfície de membrana, tanto em eucariotos como em procariotos (RAPOPORT, 1992; NAKAI, 2000; ZHANG; HENZEL, 2004). A presença de peptídeo-sinal pode alterar as propriedades conformacionais da proteína, fazendo com que se dobre mais lentamente. Na presença de segmentos hidrofóbicos, o peptídeo-sinal também pode auxiliar na inserção da proteína na membrana (RAPOPORT, 1992). Peptídeo-sinal não é estritamente necessário para secreção, mas a maior parte das proteínas exportadas o contém. Proteínas que vão ser exportadas tendem a adquirir sua conformação mais lentamente, seja pela seqüência sinal ou pela própria seqüência das proteínas. Em geral, os peptídeos-sinais compreendem de 15 a 40 resíduos de aminoácidos da região amino-terminal da cadeia polipeptídica e são clivados enquanto a proteína é translocada através da membrana (NAKAI, 2000; ZHANG; HENZEL, 2004). A estrutura comum do peptídeo-sinal de várias proteínas é descrita como uma região amino-terminal carregada positivamente, seguida por uma região central hidrofóbica rica em resíduos como Phe, Ile, Leu, Met, Val e Trp e uma região carboxi-terminal neutra, mas polar,

onde se localiza o sítio de clivagem (VON HEIJNE, 1983). A análise através o programa *SignalIP 3.0* da APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis* indicou ausência de peptídeo-sinal na sequência de aminoácidos deduzida (Figura 12). Käll, Krogh e Sonnhammer (2004) salientam que a região hidrofóbica presente no peptídeo-sinal pode ser facilmente confundida com uma região transmembrana pelos programas de predição de estrutura, portanto, pode ser que a APLT deduzida de *L. (L.) amazonensis* possua peptídeo-sinal, porém, esta sequência pode ter sido identificada como sendo um dos domínios transmembranares pelos programas *SignalP 3.0* e *TMHMM 2.0* (Figuras 10 e 11).

Os mecanismos de transcrição e de tradução em tripanossomatídeos diferem dos operando nas demais células eucarióticas, por possuírem mecanismos únicos de expressão gênica, tais como: transcrição policistônica, *trans-splicing*, participação da enzima RNA polimerase I na síntese do mRNA e edição do pré mRNA, onde as sequências são alteradas, mais freqüentemente com inserções do que com deleções do nucleotídeo uridina (STUART et al., 2005; VANHAMME, 2008; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010). Além disso, a maioria dos genes que codificam proteínas em tripanossomatídeos não possui íntrons e *cis splicing* só foi demonstrado para o gene que codifica a polimerase poli-A (MAIR et al., 2000; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

A técnica de PCR em tempo real permite a quantificação relativa da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições, apresentando uma boa reprodutibilidade e um maior grau de sensibilidade que o PCR convencional (ZARLENGA; HIGGINS, 2001). Os resultados são normalizados com genes de expressão constitutiva (*housekeeping genes* - genes com expressão estável). O gene normalizador utilizado foi o da *arginase*, uma enzima que utiliza como substrato L-arginina, formando uréia e L-ornitina (ZHANG et al., 2001). Em *Leishmania* spp. o papel biológico da enzima pode estar envolvido na modulação da síntese de NO nos macrófagos infectados (DA SILVA et al., 2008). O gene *aplt* mostrou variações nos níveis de transcritos no decorrer dos dias da cultura e variações entre os três experimentos, que podem estar relacionadas com o comportamento das curvas de crescimento. É importante lembrar que apesar das culturas terem sido semi-sincronizadas as variações entre as diferentes amostras são inevitáveis. Ainda assim os resultados mostram claramente um aumento de transcritos de *aplt* na fase estacionária dos promastigotas do 6º e do 8º dia nos três experimentos independentes (Figura 20). Segundo a literatura (TRIPATHI; GUPTA, 2003; WANDERLEY et al., 2009), na fase estacionária, a exposição de PS dos promastigotas é significativamente superior, quando comparada com a fase logarítmica de crescimento. Os

níveis mais significativos de transcritos da *aplt* na fase estacionária podem corresponder a uma expressão mais elevada da APLT, que estejam contribuindo para a simetria da membrana, como sugerido por Züllig et al. (2007). Obviamente estes dados devem ser confirmados avaliando-se a expressão da proteína com o uso de anticorpos correspondentes e idealmente com a medida da atividade funcional da APLT. As duas amostras de amastigotas provenientes de BALB/c analisadas apresentaram valores aumentados de *aplt* em relação à promastigotas do 4º ao 8º dia, embora apresentassem variações quantitativas (dados não mostrados). Nos amastigotas a exposição de PS na superfície da célula não necessariamente vai resultar na morte por apoptose, como ocorre nos promastigotas, mas é muito pronunciada. Nos amastigotas a exposição de PS permite a internalização e a sobrevivência intracelular dos parasitas nos macrófagos. Este processo foi denominado de Mimetismo Apoptótico (Figura 5) (BALANCO et al., 2001; MOREIRA; BARCINSKI, 2004; WANDERLEY et al., 2005). Os amastigotas apresentaram níveis de transcritos da *aplt* superiores aos do promastigotas da fase estacionária, o que pode significar que a expressão da APLT esteja ainda mais elevada nos amastigotas do que nos promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e os produtos desta expressão estejam contribuindo para a exposição de PS (ZÜLLIG et al., 2007). Como já dito o *Western blot* utilizando-se anticorpos específicos para APLT de *L. (L.) amazonensis* poderia confirmar a presença da proteína em questão e comparar quantitativamente os níveis da proteína entre os diferentes dias da cultura dos promastigotas e dos amastigotas provenientes de camundongos BALB/c.

A avaliação preliminar da superexpressão do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* foi feita com sistema de expressão heteróloga em células CHO-K1. As células foram induzidas a apoptose com Valinomicina, que segundo a literatura (ABDALAH et al., 2006) induz o efluxo de potássio do meio intracelular para o meio extracelular resultando na morte celular por apoptose. Na transfecção com o vetor pcDNA3 + *aplt* não foram observadas diferenças significativas no fenótipo, quando comparada com as células não transfectadas (Figura 21). Como foi feita transfecção transiente, sem a utilização de alguma droga de seleção, não ficou comprovado se a transfecção foi eficiente e não permitiu a identificação, por seleção das células efetivamente transfectadas. Por conta disto a importância de se construir um vetor de transfecção com o gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis* fusionado com o gene *gfp* (proteína verde fluorescente) que codifica a proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*. Esta estratégia experimental permitiria a identificação e até a purificação das células transfectadas. Esta construção foi parcialmente concluída (Figura 22), faltando inserir o gene *aplt* sem o

códon terminal anterior ao gene *gfp*. A adição de uma trinca de nucleotídeos (ACC), denominada de “sequência Kozak” anterior ao códon iniciador (ATG) do gene *aplt* de *L. (L.) amazonensis*, ligada ao gene *gfp*, essa construção foi sugerida, com a finalidade de aumentar a expressão da proteína em questão. Esta sequência no mRNA é reconhecida pela menor subunidade do ribossomo, que se liga para iniciar o processo de tradução protéica (KOZAK, 1999; REQUENA et al., 2003), porém para a transfecção transiente em CHO-K1, essa construção ainda não foi concluída.

A “sequência Kozak” foi escolhida baseando-se nas comparações dos nucleotídeos anteriores ao códon iniciador ATG, de 100 sequências de genes em *Leishmania*. Como resultado desta análise a sequência $^{-4}\text{c(A/G)CCATGN}^{+4}$ surgiu como consenso flanqueando o sítio de iniciação (ATG) dos genes de *Leishmania* (REQUENA et al., 2003). Para as construções dos vetores com a “sequência Kozak” foi escolhido o códon composto pela sequência nucleotídica ACC, segundo Requena et al. (2003), em *Leishmania*, a porcentagem de genes com A (adenina) na posição -3 foram de 53%, enquanto que 33% dos genes apresentavam o G (guanina) na posição -3. A adenina também prevalece na posição -3 nos demais organismos como, por exemplo, vertebrados (KOZAK, 1987), plantas (JOSHI et al., 1997), *Drosophila* (CAVENER, 1987), *T. gondii* (SEEBER, 1997), etc. Devido à alta porcentagem encontrada de adenina na posição -3, nas leishmanias e nos demais organismos, esta foi a escolhida para compor o códon juntamente com a citosina (posições -2 e -1) anterior ao ATG. As posições -2 e -1 apresentaram C (citosina) nas porcentagens de 56% e 54%, respectivamente (REQUENA et al., 2003).

Na tentativa de identificar o papel funcional do gene *aplt* foi feita transfecção estável em *L. (L.) amazonensis*. Como descrito em outros organismos, (AXELSEN; PALMGREN, 1998; FLAMANT et al., 2003; PAULUSMA; OUDE ELFERINK, 2005) a *aplt*, é responsável pela translocação da PS apesar das discordâncias na literatura acerca do direcionamento desta translocação. Assim sendo, o eventual efeito do gene foi avaliada por citometria de fluxo, comparando-se a exposição de PS entre as *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectadas do 6º dia de cultura por meio da fluorescência da anexina V, proteína com alta afinidade pelo PS quando em presença de cálcio. A análise fluorocitométrica foi feita com um “gate” que inclui apenas as células PI negativas. (Quadro 4). Promastigotas do 6º dia foram escolhidos porque apresentaram níveis superiores de transcritos nesse dia (Figura 20). As transfecções com o vetor vazio (pXG1) e pXG1 + (Kozak) *aplt* foram as que resultaram na maior porcentagem de exposição de PS. As células transfectadas com o gene (pXG1 + *aplt*)

apresentaram valores próximos das células não transfectadas. Estes resultados são de difícil explicação no momento sendo a hipótese mais provável é a de que a expressão do gene não tem efeito na exposição espontânea de PS em um processo de morte natural programada. Caso gene *aplt* operasse na apoptose espontânea conforme descrito (WANDERLEY; BARCINSKI, 2010) o resultado esperado seria a de um comportamento parecido na exposição de PS entre os promastigotas selvagens e transfectados com pXG1 devido a ausência do gene em questão e um efeito semelhante entre os promastigotas transfectados com pXG1 + *aplt* e pXG1 + (Kozak) *aplt*. A exposição de PS foi superior nas transfectadas com a “seqüência Kozak”, o que pode ser eventualmente até o resultado do aumento da expressão da proteína (KOZAK, 1999; REQUENA et al., 2003) com aumento de PS na superfície dos promastigotas (Quadro 4). No entanto, como já dito, a transfecção com o vetor vazio teve um efeito semelhante. As transfecções parecem ter alterado o comportamento dos promastigotas em relação à curva de crescimento (Figura 23); se compararmos as semelhanças entre os padrões das curvas obtidas entre as amostras selvagens e transfectadas (Figura 23) com as semelhanças dos dados da exposição de PS (Quadro 4) podemos concluir que a exposição de PS foi superior nos promastigotas com uma eventual entrada tardia na fase estacionária, ou seja, nos promastigotas transfectados com os vetores pXG1 e pXG1 + (Kozak) *aplt*. Este resultado pode ser interpretado como contraditório com os dados descritos na literatura (TRIPATHI; GUPTA, 2003, WANDERLEY et al., 2009), onde a exposição de PS dos promastigotas na fase estacionária é significativamente superior, quando comparada com a fase logarítmica de crescimento. Com os resultados em princípio negativos para a exposição programada de PS, fomos então verificar o efeito das transfecções em um sistema de apoptose induzida.

A exposição de PS nos promastigotas é uma das características da morte celular por apoptose (KOOPMAN et al., 1994; SHAHA, 2006), alguns agentes são capazes de antecipar a apoptose nestes parasitas, como por exemplo, as drogas anti-*Leishmania*: antimônio, anfotericina B, pentamidina e miltefosina. Outros agentes, como choque térmico e o tratamento com estaurosporina, também podem resultar na morte por apoptose dos parasitas (SHAHA, 2006). Nos ensaios de citometria de fluxo para comparar células induzidas e não induzidas a apoptose, o choque térmico foi a metodologia escolhida, pela facilidade de aplicação e pelos resultados já obtidos. O choque térmico induz a modulação de cálcio nos promastigotas, que morrem em maior quantidade na presença do que na ausência deste íon (MOREIRA et al., 1996). O choque térmico aplicado foi de 34 °C por 2 horas, para induzir a apoptose dos promastigotas selvagens e transfectados, na finalidade de comparar a exposição

de PS por citometria de fluxo com os promastigotas não induzidos. O tempo de incubação de 2 horas foi escolhido com base nos resultados obtidos por Moreira et al. (1996). Segundo esses autores a incubação por 1 hora a 34 °C é incapaz de induzir morte dos parasitas e a incubação por 4 horas a 34 °C induz morte por necrose. Com o objetivo de induzir a apoptose sem resultar na morte, foi escolhido à incubação de 2 horas. Em todas as amostras observou-se, em pelo menos dois clones, aumento da exposição de PS nas *L. (L.) amazonensis* que sofreram ação do choque térmico (Figura 24). Esses dados não permitiram determinar se a APLT está realmente relacionado com a translocação de PS na apoptose por choque térmico, já que em todas as amostras a porcentagem de aumento, após o choque térmico, não variaram entre as *L. (L.) amazonensis* transfectadas e não transfectada (selvagem), dados não mostrados.

Até o presente momento, não foi possível determinar a funcionalidade da APLT de *L. (L.) amazonensis*, sendo necessários ajustes, principalmente na etapa de transfecção nos promastigotas, por meio do aumento gradativo da concentração de Geneticina, que conseqüentemente selecionará melhor os promastigotas transfectados e resultará em situações de estresse ao parasita, que segundo Cruz, Titus e Beverley (1993) o parasita consegue amplificar o gene de interesse. Ajustes metodológicos, principalmente no enriquecimento em formas transfectadas assim como a temperatura e o tempo de incubação do choque térmico são absolutamente necessários.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

aplt são genes altamente conservados em *Leishmania*, *T. cruzi*, *T. brucei* e *C. elegans*.

A APLT de *L. (L.) amazonensis*:

- ✓ Apresenta as características das proteínas integrais de membrana, tais como: presença de domínios transmembranares, formados por seqüências de 15 a 30 aminoácidos, sendo a maior parte desses aminoácidos hidrofóbicos e com predomínio de α -hélice com estrutura secundária;
- ✓ Apresenta as características das enzimas ATPases tipo-P, tais como: número pares de domínios transmembranares com terminal-carboxila e terminal-amina voltados para a face citosólica da membrana e presença da seqüência de sete aminoácidos conservados: DKTGTLT;
- ✓ Ausência aparente de peptídeo-sinal;
- ✓ Transcrição aumentada de *aplt* na fase estacionária em cultura de promastigotas (6º ao 8º dia) que pode corresponder a uma expressão mais elevada da APLT, contribuindo para a simetria da membrana;
- ✓ Amastigotas provenientes de lesões de BALB/c apresentaram níveis de transcritos superiores aos dos promastigotas o que pode significar que a expressão da APLT esteja ainda mais elevada nos amastigotas do que nos promastigotas e os produtos desta expressão estejam contribuindo para a exposição de PS;
- ✓ Os dados obtidos até o momento não permitem concluir definitivamente sobre a participação da proteína APLT na regulação da translocação de PS na membrana de *Leishmania* spp. Neste sentido, a presente dissertação deve ser considerada como a da obtenção de dados preliminares, a serem aprofundados para qualquer conclusão sobre a funcionalidade da proteína APLT na movimentação transmembranar de PS, seja durante o processo de morte programada, seja pela morte induzida pelo choque térmico.

Assim sendo as perspectivas para o presente trabalho, no que se refere à atividade funcional da proteína APLT, são as que seguem:

- Concluir as construções dos vetores: pcDNA3 + *aplt* + *gfp* e pcDNA3 + (Kozak) *aplt* + *gfp* e transfectar em células CHO-K1;
- Testar outra “sequência Kozak”, sugerida pela literatura, nas construções dos vetores, substituindo o códon ACC pelo GCC, caso não seja comprovado o aumento da expressão gênica com o códon ACC;
- Empregar estratégias que permitam selecionar os promastigotas transfectados, com GFP ligado ao APLT, e assim aumentar a sensibilidade das técnicas para detecção do efeito da APLT na modulação da mobilização transmembranar de PS, tanto na morte natural quanto na morte induzida dos parasitas;
- Produzir anticorpos policlonais anti-peptídeos, para serem utilizados nos ensaios de *Western blot*, com intuito de confirmar a presença da proteína em questão e comparar quantitativamente os níveis da proteína entre os diferentes dias da cultura dos promastigotas e dos amastigotas provenientes de lesões de camundongos BALB/c;
- Desenvolver ensaio para medida da atividade funcional da APLT utilizando-se fosfolipídios marcados e medindo a sua mobilização na membrana;
- Desenvolver experimentos de nocaute da proteína APLT ou desenvolver um transgênico onde a APLT fique sob controle do domínio de desestabilização (dd) (BANASZYNSKI L. A. et al., 2006; MADEIRA DA SILVA et al., 2009) na tentativa de identificar o papel funcional desta proteína.

REFERÊNCIAS

ABDALAH, R. et al. Valinomycin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. **Neurosci. Lett.**, v. 405, n. 1-2, p. 68-73, 2006.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. São Paulo: ArtMed, 2004.

ALDER-BAERENS, N. et al. Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. **Mol. Biol. Cell**, v. 17, n. 4, p. 1632-42, 2006.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasitol.**, v. 31, p. 175-254, 1992.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.**, v. 18, p. 2993-3002, 1999.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

ANDREE, H. A. et al. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 9, p. 4923-8, 1990.

APWEILER, R. et al. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 1, p. 37-40, 2001.

AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. **J. Mol. Evol.**, v. 46, n. 1, p. 84-101, 1998.

BALANCO, J. M. F. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 23, p. 1870-3, 2001.

BANASZYNSKI, L. A. et al. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 995-1004, 2006.

BARCINSKI, M. A.; DOSREIS, G. A. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 4 p. 395-401, 1999.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-46, 1991.

BATES, P. A., ROGERS, M. E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Inf. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BERZUNZA-CRUZ, M. et al. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. **Exp. Parasitol.**, v. 95, n. 4, p. 277-84, 2000.

BITTAR, R. C. et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 625-630, 2007.

BRACHO, C. O. et al. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 549-554, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção Leishmania-HIV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 11, p. 444-7, 1996.

BRITTO, C. et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v. 222, n. 1, p. 107-17, 1998.

BRODSKY, C. et al. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. **Exp. Rev. Vaccines**, v. 2, n. 5, p. 705-17, 2003.

BRUSTOLONI, Y. M. et al. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 497-500, 2007.

CAVENER, D. R. Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, n. 4, p. 1353-61, 1987.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Parasitic Disease Information**, 2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm>. Acesso em: 10 dez. 2009.

CHANG, K. P. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, n. 2, p. 334-39, 1981.

CHANG, K. P. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**, v. 209, n. 4462, p. 1240-42, 1980.

CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 345-55, 1984.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **J. Immunol.**, v. 148, n. 4, p. 1182-7, 1992.

CHULAY, J. D.; SPENCER, H. C.; MUGAMBI, M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (Sodium Stibogluconate). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 4, p. 702-9, 1985.

COSTA, J. M. et al. Fatal case during treatment of american tegumentary leishmaniasis with sodium stibogluconate bp 88 (Shandong Xinhua). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 295-8, 2003.

CRUZ, A. K.; TITUS, R.; BEVERLEY, S. M. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, n. 4, p. 1599-603, 1993.

CULLEY, F. J. et al. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. **J. Immunol.**, v. 156, n. 12, p. 132-41, 1996.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

CURNUTTE, J. T. Superoxide production by phagocytic leukocytes: the scientific legacy of Bernard Babior. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 8, p. 1054-7, 2004.

DA SILVA, E. R. et al.. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 159, n. 2, p. 104-11, 2008.

DALEKE, D. L. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. **J. Lipid Res.**, v. 44, n. 2, p. 232-42, 2003.

DARLAND-RANSOM, M. et al. Role of *C. elegans* TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry. **Science**, v. 320, n. 5875, p. 528-31, 2008.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, n. 10, p. 2069-80, 2009.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-52, 1999.

DEVAUX, P. F.; LÓPEZ-MONTERO, I.; BRYDE, S. Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. **Chem. Phys. Lipids**, v. 141, n. 1-2, p. 119-32, 2006.

DONNELLY, E. T. et al. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 7, p. 1552-61, 2000.

DUMONTEIL, E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2007, n. 6, p. 1-11, 2007.

EMANUELSSON, O. et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 4, p. 953-71, 2007.

FADOK, V. A. et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature**, v. 405, n. 6782, p. 85-90, 2000.

FADOK, V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.**, v. 148, n. 7, p. 2207-16, 1992.

FERREIRA, M. P. et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. brasiliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 215-17, 2006.

FLAMANT, S. et al. Characterization of a putative type IV aminophospholipid transporter P-type ATPase. **Mamm. Genome**, v. 14, n. 1, p. 21-30, 2003.

FLEGONTOV, P. N. et al. Selective amplification of maxicircle classes during the life cycle of *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 165, n. 2, p. 142-52, 2009.

FOLMER, D. E.; ELFERINK, R. P.; PAULUSMA, C. C. P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1791, n. 7, p. 628-35, 2009.

GARNIER, J.; GIBRAT, J. F.; ROBSON B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. **Methods Enzymol.**, v. 266, p. 540-53, 1996.

GASTEIGER, E. et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 13, p. 3784-8, 2003.

GLEISS, B. et al. Fas-triggered phosphatidylserine exposure is modulated by intracellular ATP. **FEBS Lett.**, v. 519, n. 1-3, p. 153-8, 2002.

GONTIJO, C. M. F.; Melo M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

GUARÍN, N. et al. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. **Biomedica**, Suppl 1, p 38-48, 2006.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 4, p. 1553-8, 1993.

HAMPTON, M. B. et al. Involvement of extracellular calcium in phosphatidylserine exposure during apoptosis. **FEBS Lett.**, v. 399, n. 3, p. 277-82, 1996.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 8, p. 332-4, 2002.

HARRIS, M. J.; ARIAS, I. M. FIC1, a P-type ATPase linked to cholestatic liver disease, has homologues (ATP8B2 and ATP8B3) expressed throughout the body. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1633, n. 2, p. 127-31, 2003.

HERNÁNDEZ, R.; DÍAZ-DE LÉON, F.; CASTAÑEDA, M. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 27, n. 2-3, p. 275-9, 1988.

HUNT, J. F. et al. A biophysical study of integral membrane protein folding. **Biochemistry**, v. 36, n. 49, p. 15156-76, 1997.

JOSHI, C. P. et al. Context sequences of translation initiation codon in plants. **Plant. Mol. Biol.**, v. 35, n. 6, p. 993-1001, 1997.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **J. Mol. Biol.**, v. 338, n. 5, p. 1027-36, 2004.

KERR, S. F. Molecular trees of trypanosomes incongruent with fossil records of hosts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 25-30, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 65, Suppl 1, p. 37-42, 1990.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-20, 1994.

KOZAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, n. 20, p. 8125-48, 1987.

KOZAK, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 187-208, 1999.

KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 4, p. 282-95, 2004.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, K. *The leishmaniasis in Biology and Medicine: Volume I Biology and Epidemiology*. **Academic Press**, London, p. 1-120, 1987.

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nat. Rev. Genet.**, v. 7, n. 4, p. 294-305, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LUZ, Z. M. et al. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 62-6, 2009.

LYNN, M. A.; MCMASTER, W. R. *Leishmania*: conserved evolution-diverse diseases. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 3, p. 103-5, 2008.

MADEIRA DA SILVA, L. et al. Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, n. 18, p. 7583-8, 2009.

MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, p. 163-9, 2000.

MARTH, T. KELSALL, B. L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 11, p. 1987-95, 1997.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, n. 525241, Epub 2010.

MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **EMBO J.**, v. 11, n. 10, p. 3593-600, 1992.

MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 10, p. 1047-51, 2007.

MCDONALD, P. P. et al. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 163, n. 11, p. 6164-72, 1999.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immun. Rev.**, v. 201, p. 206-24, 2004.

MONZOTE, L. et al. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 257-60, 2007.

MOREIRA, M. E. C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 76, n. 1, p. 93-115, 2004.

MOREIRA, M. E. et al. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J. Cell Physiol.**, v. 167, n. 2, p. 305-13, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M. et al. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. **J. Exp. Med.**, v. 165, n. 1, p. 140-5, 1987.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. **Nature**, v. 327, n. 6120, p. 329-31, 1987.

NAKAI, K. Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. **Adv. Protein Chem.**, v. 54, p. 277-344, 2000.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, JR. H. B.; DEERFIELD, D. W. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **EMBNET news**, v. 4, p. 1-4, 1997.

NORSWORTHY, N. B. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1240-1247, 2004.

OLIVEIRA, J. P. C. et al. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 6, p. 1-8, 2007.

PAINTLIA, A. S., et al. IL-4-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation inhibits NF-kappaB trans activation in central nervous system (CNS) glial cells and protects oligodendrocyte progenitors under neuroinflammatory disease conditions: implication for CNS-demyelinating diseases. **J. Immunol.**, v. 176, n. 7, p. 4385-98.

PANDE, G. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, n. 5, p. 569-74, 2000.

PAULUSMA, C. C.; OUDE ELFERINK, R. P. The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1741, n. 1-2, p. 11-24, 2005.

PEACOCK, C. S., et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 7, p. 839-47, 2007.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 50, p. 49965-71, 2003.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 33, p. 23766-75, 2006.

PETERS, C. et al. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 3715-24, 1995.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **J. Immunol.**, v. 145, n. 12, p. 4311-6, 1990.

RABINOVITCH, M.; ZILBERFARB, V.; RAMAZEILLES, C. Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes within macrophages by lysosomotropic amino acid esters. **J. Exp. Med.**, v. 163, n. 3, p. 520-35, 1986.

RAPOPORT, T. A. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. **Science**, v. 258, n. 5084, p. 931-6, 1992.

RAPSODI AGAINST LEISHMANIASIS. **Distribuição geográfica da leishmaniose**. Disponível em: <<http://www.fp7-rapsodi.eu/index.php?id=150>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

REAL F. [Comunicação pessoal]. São Paulo, 2009. Comunicação feita para demonstrar o mecanismo de internalização de formas amastigotas em macrófagos murinos.

REQUENA, J. M. et al. Conserved nucleotides surrounding the trans-splicing acceptor site and the translation initiation codon in *Leishmania* genes. **Exp. Parasitol.**, v. 103, n. 1-2, p. 78-81, 2003.

RITTING, M. H.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 7, p. 292-97, 2000.

RIZVI, F. S. et al. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. **Eur. J. Immunol.**, v. 18, n. 3, p. 473-76, 1988.

RODRIGUES, M. L. O. et al. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 33-37, 1999.

ROHOUSOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitol. (Praha)**, v. 53, n. 3, p. 161-171, 2006.

ROLAND, J. **Perda da assimetria da membrana plasmática, com exposição de PS para a face externa**, 2008. Disponível em: <<http://www.cytographica.com/overheads/index.html>>. Acesso em: 22 set. 2008.

ROUNDY, S.; ALMONY, J.; ZISLIS, T. Cutaneous leishmaniasis of the lower lip in a United States soldier. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 7, p. 1513-5, 2008.

RUSSEL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **J. immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2613-20, 1986.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 3, p. 456-59, 1985.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-83, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SCHARTON-KERSTEN, T. et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 154, n. 10, p. 5320-30, 1995.

SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 11, p. 5857-64, 1998.

SEEBER, F. Consensus sequence of translational initiation sites from *Toxoplasma gondii* genes. **Parasitol. Res.**, v. 83, n. 3, p. 309-11, 1997.

SEIGNEURET, M.; DEVAUX, P. F. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, n. 12, p. 3751-55, 1984.

SHAHA, C. (2006). Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 233-44, 2006.

SIGRIST, C. J. et al. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **Brief. Bioinform.**, v. 3, n. 3, p. 265-74, 2002.

SIMPSON, L. Effect of acriflavin on the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. Mode of action and physiological correlates of the loss of kinetoplast DNA. **J. Cell Biol.**, v. 37, n. 3, p. 660-82, 1968.

SINGER, S. J. The structure and insertion of integral membrane protein. **Ann. Rev. Cell Biol.**, v. 6, p. 247-96, 1990.

SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.**, v. 6, p. 175-82, 1998.

SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 9, p. 1266-72, 2004.

STEVENS, H. C.; MALONE, L.; NICHOLS, J. W. The putative aminophospholipid translocases, DNF1 and DNF2, are not required for 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-phosphatidylserine flip across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 50, p. 35060-9, 2008.

STUART, K. D. et al. Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, n. 2, p. 97-105, 2005.

SUZUKI, E. et al. Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1780, n. 3, p. 362-9, 2008.

TRIPATHI, A.; GUPTA, C. M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 128, n. 1, p. 1-9, 2003.

TYURINA, Y. Y. et al. Nitrosative stress inhibits the aminophospholipid translocase resulting in phosphatidylserine externalization and macrophage engulfment: implications for the resolution of inflammation. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 11, p. 8498-509, 2007.

ULIANA, S. R. et al. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence the 18s ribosomal RNA sequence. **Exp. Parasitol.**, v. 72, n. 2, p. 157-163, 1991.

UTHAISANG, W. et al. Phosphatidylserine exposure in Fas type I cells is mitochondria-dependent. **FEBS Lett.**, v. 545, n. 2-3, p. 110-4, 2003.

VALLEE, B. L.; AULD, D. S. New perspective on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes. **Biochemistry**, v. 32, n. 26, p. 6493-500, 1993.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 37, p. 13837-42, 2006.

VANHAMME, L. Trypanosome RNA polymerases and transcription factors: sensible trypanocidal drug targets? **Curr. Drug. Targets**, v. 9, n. 11, p. 979-96, 2008.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int. J. Parasitol.**, v. 24, n. 8, p. 1317-31, 1994.

VON HEIJNE, G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. **Eur. J. Biochem.**, v. 133, n. 1, p. 17-21, 1983.

WANDERLEY, J. L. et al. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 6, p. 807-12, 2005.

WANDERLEY, J. L. et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5733, 2009.

WANDERLEY, J. L.; BARCINSKI M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. **Cell Mol. Life Sci.**, 2010. Epub ahead of print.

WHITE, T. C.; RUDENKO, G.; BORST, P. Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. **Nucleic Acids Res.**, v. 14, n. 23, p. 9471-89, 1986.

WILKINS, M. R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Mol. Biol.**, v. 112, p. 531-52.

WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R. A. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1585, n. 2-3, p. 53-63, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **The leishmaniasis and leishmania/HIV co-infections**. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact116.html>>. Acesso em: 22 set. 2008.

YAMAJI-HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, M. Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 8, p. 1547-53.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Vet. Parasitol.**, v. 101, n. 3-4, p. 215-30, 2001.

ZHANG, C. et al. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. **FASEB J.**, v. 15, n. 7, p. 1264-6, 2001.

ZHANG, Z.; HENZEL, W. J. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. **Protein Sci.**, v. 13, n. 10, p. 2819-24, 2004.

ZHOU, X.; GRAHAM, T. R. Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, n. 39, p. 16586-91, 2009.

ZÜLLIG, S. et al. Aminophospholipid translocase TAT-1 promotes phosphatidylserine exposure during *C. elegans* apoptosis. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 11, p. 994-9, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Leishmania mexicana aminophospholipid translocase (APLT) gene, complete cds

Features	Sequence
LOCUS	GQ856287 3477 bp DNA linear INV 05-OCT-2009
DEFINITION	Leishmania mexicana aminophospholipid translocase (APLT) gene, complete cds.
ACCESSION	GQ856287
VERSION	GQ856287.1 GI:260108371
KEYWORDS	.
SOURCE	Leishmania mexicana
ORGANISM	Leishmania mexicana Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae; Leishmania.
REFERENCE	1 (bases 1 to 3477)
AUTHORS	Horikawa,M.M., Wunderlich,G., Barcinski,M.A. and Balanco,J.M.F.
TITLE	Identification of a putative aminophospholipid translocase in promastigotes of Leishmania (L.) amazonensis
JOURNAL	Unpublished
REFERENCE	2 (bases 1 to 3477)
AUTHORS	Horikawa,M.M., Wunderlich,G., Barcinski,M.A. and Balanco,J.M.F.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (28-AUG-2009) Parasitology, University of Sao Paulo - Institute of Biomedical Science, Avenue Prof. Lineu Prestes, 1374 Room 20, Sao Paulo, SP 05508-900, Brazil
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..3477 /organism="Leishmania mexicana" /mol_type="genomic DNA" /db_xref="taxon:5665"
gene	<1..>3477 /gene="APLT"
mRNA	<1..>3477 /gene="APLT" /product="aminophospholipid translocase"
CDS	1..3477 /gene="APLT" /codon_start=1 /product="aminophospholipid translocase" /protein_id="ACX32071.1" /db_xref="GI:260108372" /translation="MRRIRYRTLHNGADDENSQSCSSGTANVSTRSAHGQQLPQRCCR RSDRLVIVDSLSSGAAGSVLAVPQKRRSLRRWLREMLHLPIAPSPDNREIPFGYFPG EWSPPVGYPSSNAVMNRRYTLLTFLPLALLRQFQNFNLFYFLAFSQVIPVLKVGFI YFSPLMMVVCLSLMKDALDEWKRFRDRIANVEVFEKLTAGGDVVTVRSSHIRVGDLL ILHQDQRPVADCVVLHTSEKSGTTFIRTDQLDGETDWKLRYPNLSKSLAYAELGTLR FNVHCGAPHKDIYSFAGSLELANGQSESIITMENAVWSSCVVATGTLVVAVVYTGSETR SALNSTSPRNKLG LIERELNLIAYLCFVLLLLLSFLLVAQQQFRGDFAVMFVRFFILL SSMIPISM RVNVVDVGR LWYSYDMSHDPNIPGAVARNANLPEELGRLRFLFSDKTGTLT KNKMKFRVMQVGPDTVLTDRFTDQLAGALQEYFGTGNGETGARLMFGNVSARLSVRNT KQWSRDVQRVGDLIKAI V LCHNVSPVVVEE PDVLD TDETMVPGRGAVATAPAPTNIT SEPTDYQASSPDEVALVKFCRSLGIVLTYRDLTSIAFTVGGGAQLHTCTIVKVFPFSS ERKCMGII LRERTGSCSGVNAQETVKFYMKGADV KMASVLRQSEWLDECCQELAQMGL RTL VFASRTLSEEVLGAFLQQYEA AISILGEGRTAAIETAMK LLETDMTTLTGVTGVED ELQDDVVVCLET LGMCGIKVWMLTGDKVETATTIGRSTR LIPRHCR IEYL CGMGPAD I GHR LHELQEEFCWG MTCSSILPQWSLVLDGNALAYCLSHASFFAEVARTAYSIVIVARC SPTQKAAVVTVMRDS CRDARVAAIGDGGNDVSMIQAANVGIGIEGVEGKQASMAADFS ITKFSHCLRLIMWHGRNSYQRTCLRSQFIMHRGIVYAVVQTVFSVLFAGTMSVFNGY LLMGYSTVFTMAPAFALVLD EDFNESDVHEY PFLYKDLLKARSMNTRTFLQVWVASF QGGVMMMLMALQLFKSDMFQFVTIAYTSL LITELVIVGATAHLRILWRERRARFFFLFC SEVVSLLMFFLAVVVL P DTFDRDFFFSWSCWWRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYILFD PRIAVSWMGRRS"

ORIGIN

```

1 atgcgacgca tacgctaccg gacgctgcac aatgggtgccg atgatgaaaa ctgcgagagt
61 tgcagcagcg gtaccgccaa tgtctccacg agaagcgcac atgggtccca gctgccacag
121 cgggtgctgcc ggcgggtcacg tgatctcgtg attgtcgact cccttagcag tggcgcgggcg
181 ggggtccgtat tggcggttcc gcagcggaaag aaacgcagtc tgcggcggtg gctgcgggaa
241 atgctacatc tgcgattgc accgtctccc gacaaccgcg aaatcccgtt tggctacttc
301 cccggtgagt ggtcgccggt cggctatccg agcaaccgcg tgaacaaccg tcgctacacg
361 ctcttgacgt ttctgccact ggcgctgtta cgtcagtttc agaacttctt taacctcttc
421 tacctctttc tggccttttc gcaggtcatt ccagtgcgta aggtcgggtt tatcgtcact
481 tactttttcac cgctaattgat ggtgggtgtgc ctctcactga tgaaggacgc gctcgatgag
541 tggaaagcgt tccggcggtg tcgcatcgcc aacgtcgagg tgttcgagaa actcacagcc
601 ggcggcgacg tggtcacggt ggcgtcgtcg cacattcggg taggagatct gctcatcctg
661 catcaagatc aacgtgtgcc ggcgactgc gtcgtgttgc acacctccga gaagtccggc
721 acgacgttca tccgcaccga ccaacttgac ggcgaacggt attggaagct gcgctacccg
781 ttgaactcta ccaagagtct agcatagccc gaacttggtg cgctgcgctt caacgtgcac
841 tgtggcgcac ctacacaaga catctacagc ttcgcccgtc ccctcgaatt ggcacaacgga
901 cagagcaggt cgatcacgat ggagaatgcc gtctggtcgt cgtgtgtggt ggcgacgggg
961 acgctggtgg tgcgctcgt atacacgggt agcgagacgc gcagcgccct caactcgaca
1021 agcccgcgta acaagcttgg cctcatcgag cgcgagctca acctgatcgc ggttctgtgc
1081 ttcgtgctgc ttctgctgct ttcttttctt cttgtagcac aacaacagtt ccgtggagac
1141 tttggcgcca tgtttgtgcg cttcttcac ctcctgtcgt ccattgattcc catctcgatg
1201 cgcgtgaacg tcgacgtcgg tcgcctctgg tactcgtacg atatgtcgca tgaccccaac
1261 atccctggcg ctgtggctcg caacgcaaat cttccggagg aactgggtcg gctgcgcttt
1321 ctctctctccg acaagaccgg cacactcaca aagaacaaga tgaagtctcg cgtgatgcag
1381 gtgggacccg acacggttct aacggaccgc ttcactgac agctggcggg agcgctgcag
1441 gactactttg gcacaggcaa tggggaaact ggggctcgac tcattgttcg caacgtctcc
1501 gcacgactca cgtgagaaa tacgaagcag tggagccgtg atgtgcagcg cgttggcgac
1561 cttatcaaa ccatcgtcct gtgccacaat gtgagcccg tgggtgtgga ggagccggac
1621 gtccttgaca cgcagcaga aacaatggtg ccgggtcgcg gtgcgggtggc gactgcaccg
1681 gccccaaact atataacgag tgagccgact gactaccaag cctcctcgcc agacgaggtt
1741 gcgctggtca agttctgcgg ctccctcggc attgtattga catatcgca cctcacgtcg
1801 atagcgttca ccgtcgcgcg cgggtgcgag ctgcacacct gcaccatcg caaagtgttc
1861 ccgttctcat cggagcgcaa gtgcattggc atcatcctgc gcgagcgcac tgggagctgc
1921 agcggcgctca acgcccagga gaccgtcaag ttctatatga aaggcgcgag cgtgaagatg
1981 gcgtcggtgt tgcgccaatc ggagtggtcg gatgagtgct gccaggagct ggcgagatg
2041 gggctgcgaa cgtcgtgtt tgccagtcga acgctcagcg aggaggtgct cggcgcttc
2101 ctgcagcagt acgaagccgc catttcgatc cttggtgaag gtgcaccgc agcaatcgag
2161 acggcgatga aactattgga gacggatatg acgctgacag gggtgacggg agtgaggagac
2221 gagctgcaag acgacgttgt cgtctgtctc gagacacttg gcatgtgcgg catcaaggtg
2281 tggatgctca cgggtgacaa ggtcgagact gccaccacca ttggccggtc gactcggctc
2341 attccccgcc actgcccgat cgagtacctg tgtgggatgg gtccggcaga cattggtcac
2401 cgctgcagtg agctgcagga ggagttttgc tggggcatga cgtgcagcag catattgccc
2461 caatggtccc tggttctgga tggaaacgcg ctggcgact gcctctcgca cgctctctc
2521 ttcgcggaag tggccagaac cgccactcgc gtgatagtgg cgcgatgctc cccgacgcag
2581 aaggctgcgg tggttactgt aatgcgcgat agctgcgtg acgcgcgct cgcggccatc
2641 ggtgacggag gcaacgacgt gtcgatgac caggcccgca acgttgggat cggatttgag
2701 ggggtggagg gaaagcaagc aagcatggcc gctgatttct ccattacca gttctctcac
2761 tgcctacggc tcatcatgtg gcacggcgcg aactcatacc agcgacgtg tcgactcagc
2821 cagttcatca tgcaccgcg catcgtctac gcggttgtgc agacggtctt ctcggtgctg
2881 tttgcccggg cgaccatgct tgtcttcaac ggttatctac tgatggggta ctccaccgtg
2941 tttacaatgg cgcagcctt cgccttggtg cttgacgaag acttcaatga gtcggacgtg
3001 cagagttacc cgtttctcta caaagatttg ctcaaggccc gctccatgaa cccccgacc
3061 tttctgcagt ggggtgtgggc gtccttcttt caaggagggg tcattgatgt gatggcgcta
3121 cagctcttca agtcggacat gttccagttt gtcacgatcg cctacacgtc acttctcatc
3181 acagaactgg tcactgttgg cgccaccgcg catcttcgca ttctctggcg agagcgccgt
3241 gctcgcttct ttctcttctt gtgctctgag tgggtgtctc tgctgatgtt ttctctcgt
3301 gtcgtcgtgt taccgcacac gtttgatagg gactttttct tttcgtggag ctgctgggtg
3361 cgcgtcggg taatctgcct atccagcatt gtaccactca tgatatttca gatgattggc
3421 aagtacatct tgttcgaccc gcgcatcgcc gtcctctgga tgggacgtcg gtcgtga

```

//

[Write to the Help Desk](#)

[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

[Department of Health & Human Services](#)

[Privacy Statement](#) | [Freedom of Information Act](#) | [Disclaimer](#)

ANEXO B

Leishmania amazonensis strain LV79 aminophospholipid translocase (APLT) gene, complete cds

Features	Sequence
LOCUS	GQ856286 3477 bp DNA linear INV 05-OCT-2009
DEFINITION	Leishmania amazonensis strain LV79 aminophospholipid translocase (APLT) gene, complete cds.
ACCESSION	GQ856286
VERSION	GQ856286.1 GI:260108369
KEYWORDS	.
SOURCE	Leishmania amazonensis
ORGANISM	Leishmania amazonensis Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae; Leishmania.
REFERENCE	1 (bases 1 to 3477)
AUTHORS	Horikawa,M.M., Wunderlich,G., Barcinski,M.A. and Balanco,J.M.F.
TITLE	Identification of a putative aminophospholipid translocase in promastigotes of Leishmania (L.) amazonensis
JOURNAL	Unpublished
REFERENCE	2 (bases 1 to 3477)
AUTHORS	Horikawa,M.M., Wunderlich,G., Barcinski,M.A. and Balanco,J.M.F.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (28-AUG-2009) Parasitology, University of Sao Paulo - Institute of Biomedical Science, Avenue Prof. Lineu Prestes, 1374 Room 20, Sao Paulo, SP 05508-900, Brazil
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..3477 /organism="Leishmania amazonensis" /mol_type="genomic DNA" /strain="LV79" /db_xref="taxon:5659"
gene	<1..>3477 /gene="APLT"
mRNA	<1..>3477 /gene="APLT" /product="aminophospholipid translocase"
CDS	1..3477 /gene="APLT" /codon_start=1 /product="aminophospholipid translocase" /protein_id="ACX32070.1" /db_xref="GI:260108370" /translation="MRRIRYRALHNGADDENSQSCSSGTTNVSTRSAHGQPQLPQRCCR RSRDLVIVDSLSGGAAGSVLAVPQRKKRSLRRWLREMLHLPIAPSPDNRKIPFGYFPS EWSPVGYPSNAVNRRYTLTFLPLALLRQFQNFNLFYFLAFASQVIPVLKVGFIVT YFSPLMVVCLSLMKDALDEWKRFRDRRIANVEVFEKLTAGGDVVTVRSSHIRVGDLL ILHQDQRPADCVVLHTSEKSGTTFIRTDQLDGETDQKLRYPNLSKSLAYAEGLTLR FNVHCAAPHKDIYSFAGSLELANGQSEITMENAVWSSCVVATGTLVVAVVYTGSETR SALNSTSPRNKGLIERELMLIAVLCFVLLLLLSFLLVAQQQFRGDFAVMFVRFFILL SSMIPISM RVNVVDVGRWYSYDMSHDPNIPGAVARNANLPEELGRLRFLFSDKTGTLT KNKMKFRVMQVGPDTVLTDRFTDQLAGALQEYFGTNGETGARLMFGNV SARLSVRNS KQWSRDVQRVGD LIAIVLCHNVSPVVVEEPDVLDTDDET MVPGCGAVATAPATNIT SEPTDYQASSPDEVALVKFCSRLGIVLT YRDLT SIAFTVGGGAQLHTCTIVKVFPFSS ERKCMGIILRERTGSCSGGNAQETVKFYMKGADV KMASVLRQSEWLDECCQELAQMGL RTL VFASRTLSEEV LGAFLQQYEAAISILGEGRTAAIETAMKLL ETDMTLTGVTGVED ELQDDVVVCLET LGMCGIKVWMLTGDKVETATTIGRSTR LIPRHCRIEYLCGMTPADI GHRLYELQEEFCWGVTCSSILPQWTLVLDGNALAYCLSHASFFAEVARTAYSIVARC SPTQKAAVVTVMRDS CRDARVAAIGDGGNDVSMIQAANVGIGIEGVEGKQASMAADFS ITKFSHCLRLIMWHGRNSYQRTCLRSQFIMHRGIVYAVVQTVFVSVL FAGTTMSVFNGY LLMGYSTVFTMAPAFALV LDEDFNESDVHEY PFLYKDLLKARSMNTRTFLQVWVASF QGGVMMMLMALQLFKSDMFQFVTIAYTSL LITELVIVGATAHLRILWRERRARFFLFLC SEVVSLLMFFLAVVVL PDFTDRDFFFSWSCWVRVAVICLSSIVPLMIFQMIGKYLFD PRIAVSWMGRRS"

ORIGIN

```

1 atgcgacgca tacgctaccg ggcgctgcac aatgggtgccg atgatgaaaa ctgcgagagt
61 tgcagcagcg gtaccaccaa tgtctccacg agaagcgcac atggtcctca gctgccacag
121 cgggtgctgcc ggcgggtcacg tgacctcgtg attgtcgact ccttagcag tggcgcgggcg
181 ggggtccgtgt tagccgttcc gcagcggaaag aaacgcagtc tgcggcggtg gctgcgggaa
241 atgctacatc tgcgattgac accgtctccc gacaaccgca aaatcccgtt tggctacttc
301 cccagtgagt ggtgcgggtg cggctatccg agcaacggcg tgaacaaccg tcgctacacg
361 ctcttgacgt ttctgccact agcgtctgta cgtcagtttc agaacttctt taacctcttc
421 tacctctttc tggccttttc gcaggtcatt ccagtgctga aggtcgggtt catcgtcact
481 tactttttcac cgctaattgat ggtggtgtgc ctctcactga tgaaggacgc gctcgatgag
541 tgggaagcgat tccggcgtag tgcgcatgcc aacgtcgagg tgttcgagaa actcacagcc
601 ggcggcgacg tggtcacggg gcggctcgtc cacattcggg taggagatct gctcatcctg
661 catcaagatc aacgtgtgcc ggcggactgc gtcgtgttgc acacctccga gaagtccggc
721 acgacgttca tccgcaccga ccaacttgac ggcgaacggc attggaagct gcgctaccgg
781 ttgaactcta ccaagagtct agcatacgcc gaacttggtg cgtgcgctt caactgcac
841 tgtgcgcgac ctcaaaaga catctacagc ttgcgcggct cctcgaatt ggccaacgga
901 cagagcgagt cgatcacgat ggagaatgcc gtctggtcgt cgtgtgtggt ggcgacgggg
961 acgctagtgg tcgcgctcgt atacacgggt agcgagacgc gcagcgccct caactcgaca
1021 agcccgcgta acaagcttgg cctcatcgag cgcgagctca acctgatcgc ggttctgtgc
1081 ttctgtcgtc ttctgctgct ttcttttctt ctgtagcac aacaacagtt ccgtggagac
1141 tttgcgctca tgtttgtgct cttctctatc ctctgtcgt ccatgattcc catctcgatg
1201 cgggtgaacg tcgacgtcgg tcgcctctgg tactcgtacg atatgtccca tgaccccaac
1261 atccctggcg ctgtggctcg caacgcaaat cttccggagg aactgggtcg gctgcgcttt
1321 ctcttctccg acaagaccgg cacactcaca aagaacaaga tgaagtttcg cgtgatgcag
1381 ttggggaccg acacggttct aacggaccgc ttcactgac agctggcggg agcgtcgag
1441 gagtactttg gcacaggcaa tggggaaact ggggctcgac tcatgttcgg caactctcc
1501 gcacgactca gcgtgagaaa ttcgaagcag tggagccgtg atgtgcagcg cgttggcgac
1561 cttatcaaa ccatcgtcct gtgccacaat gtgagcccg tgggtggtgga ggagccggac
1621 gtccttgata ccgacgacga aacaatggtg ccgggttgcg gtgcgggtgc gactgcaccg
1681 gccccaacta atataacgag tgagccgact gactaccaag cctctcgcgc agacgaggtt
1741 gcgctggtca agttctgccc ctccctcggc attgtattga catatcgaga tctcacatcg
1801 atagccttca ccgtcggcgg cgggtgcgcag ctgcacacct gcaccatcgt caaagtgttc
1861 ccgttctcat cggagcgcaa gtgcgatggc atcatcctgc gcgagcgac tgggagctgc
1921 agcggcgcca acgcccagga gaccgtcaag ttctacatga aaggcgacga cgtgaagatg
1981 gcgtcgggtg tgcgccaatc ggagtggtcg gatgagtgct gccaggagct ggcgcagatg
2041 gggctgcgaa cgctcgtggt tgcagtcga acgctcagcg aggaggtgct cggcgccctc
2101 ctgcagcagt acgaagccgc catttcgatc cttggtgaag gtgcaccgc agcaatcgag
2161 acggcgatga aactatttga gacggatatg acgctgacag gggtgacggg agtgaggagac
2221 gagctgcaag acgacgttgt cgtctgtctc gagacacttg gcatgtgcgg catcaagggtg
2281 ttgatgctca cgggtgacaa ggtcgagact gccaccacca ttggccggtc gactcggctc
2341 attccccgcc actgccgat cgagtacctg tgtgggatga ctccggcaga cattgggtcac
2401 cgctgtatg agctgcagga ggagttttgc tggggcgtga cgtgcagcag catattgccc
2461 caatggaccc tggttctgga tggaaacgcg ctggcgtaact gcctctcaca cgcctccttc
2521 ttgcgggaag tggccagaac cgcctactcg gtgatagtgg cgcgatgctc cccgacgcag
2581 aaggctcggg tggttactgt aatgcgcgat agctgcggtg acgcgcgctg cgcggccatc
2641 ggtgacggag gcaacgacgt gtcgatgatc caggccgcca acgttgggat cggattagag
2701 ggggtggagg gaaagcaagc aagcatggcc gctgatttct ccattaccaa gttctctcac
2761 tgctacggc tcatcatgtg gcacgggcgg aactcatacc agcgcacgtg tcgactcagc
2821 cagttcatca tgcaccgagg catcgtctac gcggttgtgc agacggtctt ctcggtgctg
2881 tttgccggga cgaccatgtc tgtcttcaac ggttatctac tgatggggta ctccaccgtg
2941 tttacaatgg cgccagcctt cgccttgggt cttgacgaag acttcaatga gtcggacgtg
3001 cagcagttac cgtttctcta caaagatttg ctcaaggccc gctccatgaa caccggaacc
3061 tttctgcagt ggggtgtggc gtccttcttt caaggagggg tcatgatgct gatggcgcta
3121 cagctcttca agtcggacat gttccagttt gtcacgatcg cctacacgtc acttctcatc
3181 acagaactgg tcacgtttgg cgccaccgcg catcttcgca ttctctggcg agagcgccgt
3241 gctcgtctct ttctctcttt gtgctctgag gtggtgtctc tgcgtatggt tttctcgcgc
3301 gtcgtcgtgt tacccgacac gtttgatagg gactttttct tttcgtggag ctgctggtgg
3361 cgcgtcgcgg taatctgcct atccagcatt gtaccactca tgatatttca aatgattggc
3421 aagtacatct tgttcgaccc gcgtatcgcc gtctctgga tgggacgtcg gtcgtga

```

//

[Write to the Help Desk](#)

[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

[Department of Health & Human Services](#)

[Privacy Statement](#) | [Freedom of Information Act](#) | [Disclaimer](#)