

MARCOS GONZAGA DOS SANTOS

**Papel funcional da fosfatidilserina de *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* na infecção de macrófagos**

Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Parasitologia).

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof. Dra. Lucile Maria Floeter Winter

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello André Barcinski

São Paulo

2008

Resumo

dos Santos MG. Papel funcional da fosfatidilserina de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na infecção de macrófagos [dissertação de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Protozoários do gênero *Leishmania* escapam dos mecanismos de defesa dos macrófagos, parasitando-os quando em seu hospedeiro mamífero. Foi proposto que ocorre exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática como escape às primeiras respostas do macrófago, mimetizando uma célula em apoptose, sem ativar seus mecanismos de defesa. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi elucidar as vias de síntese de fosfatidilserina e seus precursores, assim como os genes envolvidos diretamente na sua produção em *L. (L.) amazonensis*. Ensaio de síntese de fosfatidilserina *in vitro*, com extrato protéico total de promastigotas na presença de diferentes substratos, mostraram que *Leishmania* possui atividade de fosfatidilserina sintetase II (PSS II), e que não possui atividade detectável de fosfatidilserina sintetase I (PSS I). A análise *in silico* do banco de genoma de *L. (L.) major* encontrou apenas uma seqüência similar ao gene de PSSII humana. Por PCR e RT-PCR, o homólogo desse gene foi clonado e seqüenciado. A seqüência de aminoácidos apresentou uma identidade de 38% e uma similaridade de 55% em relação ao seu homólogo humano. Southern blot de DNA genômico indicou que o gene se encontra em uma cópia no genoma de *L. (L.) amazonensis*. O nível de produção de mRNA deve ser muito baixo pois não foi possível detectar o transcrito por Northern blot. Na tentativa de se obter mutantes nocaute para o gene PSS II, foram feitas construções contendo sua fase aberta de leitura interrompida por genes de resistência a higromicina, neomicina ou puromicina, contendo ou não sinais para o amadurecimento individual de mRNA (“*trans-splicing*” e poliadenilação) dos genes de resistência. Apesar das diversas tentativas, não foi possível selecionar nem mesmo um mutante nocaute para uma das cópias do gene de PSS II do genoma diplóide, em *L. (L.) amazonensis*, um forte indício de que o gene é essencial à sobrevivência do parasito. Também foram realizados ensaios de síntese de fosfolipídios fornecendo ortofosfato marcado com ³²P a promastigotas em cultura. Os lipídios foram purificados e analisados em cromatografia em camada delgada. Esses fosfolipídios purificados também foram fornecidos novamente para promastigotas em cultura, e pôde ser observado que promastigotas tomavam fosfatidiletanolamina, substrato da PSS II, do meio.

Ensaaios de incorporação de fosfatidilserina marcada por promastigotas em cultura não permitiram determinar, com exatidão a taxa de incorporação do fosfolípido, no entanto medidas indicam uma incorporação muito baixa, e assim, essa não seria suficiente para suprir as necessidades metabólicas da célula. Também foi feita a caracterização bioquímica do transportador de serina em *Leishmania*, que mostrou a existência de um único transportador com pH ótimo de 7,5, dependente da atividade metabólica da célula, com um Km de 0,826 +/- 0,183 mM e Vmax de 355,37 +/- 19,41 pmol/min * 2 * 10⁷ promastigotas, que se mantém ativo a até 45 °C.

Palavras-chave: Biologia Molecular; Genética Molecular; Protozoologia.

Abstract

dos Santos MG. Functional role of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* phosphatidylserine in macrophage infection [thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Protozoans of the genus *Leishmania* can evade the macrophages defensive mechanisms, and parasite them when in their mammal host. It was proposed that the exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasmatic membrane mimics an apoptotic cell, avoiding the macrophage activation. The objective of this work was to elucidate the synthesis pathway of phosphatidylserine and its precursors, as well as the genes directly involved in its production in *L. (L.) amazonensis*. *In vitro* assays of synthesis of phosphatidylserine using proteic extracts of promastigotes and different substrates showed that *Leishmania* has phosphatidylserine synthase II (PSS II) activity, but lacks phosphatidylserine synthase I (PSS I) activity. *In silico* analysis of the genome bank of *L. (L.) major* showed only one sequence similar to PSS II human gene. The *L. (L.) amazonensis* homolog was cloned by PCR and RT-PCR and sequenced. The amino acid sequence showed an identity of 38% and a similarity of 55% in relation to the human homolog. Southern blot of the genomic DNA indicated that the gene was present in only one copy in the *L. (L.) amazonensis* genome. The level of mRNA production should be very low, as it was not detected by northern blot. In an attempt to generate knockout mutants for the PSS II gene, we made constructs containing its open reading frame interrupted by resistance genes to hygromycin, neomycin or puromycin with or without signals for individual maturation (*trans*-splicing and poliadenilation) of the resistance genes mRNA. Although we tried several times, it was not possible to select knockout mutants, even for one of the copies of the PSS II gene in the diploid genome of *L. (L.) amazonensis*, indicating that the gene must be essential for the parasite survival. Phospholipid synthesis assays were made by feeding a promastigote culture with orthophosphate labelled with ^{32}P . The lipids were purified and analysed in thin layer chromatography. Also, the produced lipids were used to feed promastigotes, showing that they can incorporate phosphatidyletanolamine, substrate for PSS II. Incorporation assays of labelled phosphatidylserine assays by a promastigote culture indicated a very low rate of

incorporation, that did not allow the determination of the exact rate of incorporation of the phospholipid. Anyway, the amount incorporated would not be enough for the metabolic requirement of the cell. The serine transport in *Leishmania* was biochemically characterized and the results showed one single transport system, with an optimal pH of 7.5, dependent of metabolic activity, a Km of 0.826 (+/- 0.183) and Vmax of 355.37 (+/- 19.41) pmol/min * 2 * 10⁷ promastigotes, that remained active up to 45°C.

Key words: Molecular Biology; Molecular genetics; Protozoology.

1 Introdução

1.1 *Leishmania* e leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania*, identificados inicialmente por Ross em 1903 (9, 10), pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São parasitos obrigatórios, que apresentam dois hospedeiros, sendo o ciclo de vida desenvolvido em um inseto (flebotomíneo) e um mamífero.

Quando um flebotomíneo, em um repasto sanguíneo, pica o indivíduo parasitado, retira junto com o sangue macrófagos infectados que se rompem dentro do intestino do inseto e liberam formas amastigotas. Nesse ambiente, as formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas, células alongadas de aspecto fusiforme com flagelo na porção anterior, que colonizam o tubo digestório do hospedeiro invertebrado, multiplicando-se aderidas ao epitélio intestinal. No intestino encontram-se formas variadas, desde amastigotas típicas a formas promastigotas. São encontradas também formas ditas paramastigotas, ovais e mais curtas com o flagelo mais curto, que são capazes de aderir ao epitélio do intestino do flebotomíneo.

Dependendo da espécie de *Leishmania*, elas podem colonizar todo o tubo digestório do inseto (seção peripylaria) ou ficar restritas ao intestino médio e anterior (seção suprapylaria). Esse padrão distinto de desenvolvimento levou à proposta da classificação nos subgêneros *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)*, respectivamente para a colonização peripylaria e suprapylaria.

Quando em grande número, diferenciam-se em promastigotas metacíclicos infectivos soltando-se do epitélio intestinal e invadindo porções anteriores do estômago e proventrículo do mosquito. Em um novo repasto sanguíneo, o inseto, depois do esforço para ingerir sangue, relaxa os músculos encarregados da sucção, causando regurgitação de parte do material aspirado juntamente com muitos flagelados, levando à inoculação das formas infectantes em um novo hospedeiro. No tegumento deste, são fagocitados por macrófagos e diferenciam-se novamente para a forma amastigota. (11)

Quando o homem é infectado, inicialmente é observada uma lesão em forma de pápula no local da infecção, que pode acabar ulcerando para formar uma lesão em forma de

vulcão. A lesão causada pela doença pode permanecer única, mas em alguns casos, macrófagos infectados podem migrar para outras regiões do organismo e instalar lesões secundárias. Esse é o caso particular da *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que tende a produzir essas metástases nas mucosas da boca, nariz, faringe e laringe. Essas lesões podem surgir meses ou mesmo anos após a infecção inicial, quando o paciente já deveria estar curado da doença que pode ser extremamente mutiladora. (12) (13) (14).

Outras espécies de *Leishmania* podem causar quadros ainda mais severos em indivíduos que não são capazes de montar uma defesa imunológica plenamente funcional. Esses pacientes desenvolvem grandes quantidades de lesões nodulares espalhadas pelo corpo, e é normalmente chamada de leishmaniose cutânea difusa. Algumas leishmânias associadas a esse tipo de quadro clínico nas Américas são *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) pifanoi* (13).

Ao contrário do que ocorre em humanos, o hospedeiro silvestre normalmente não apresenta qualquer sintoma quando parasitado por organismos desse gênero. Animais domésticos como cães, gatos, cavalos e mulas podem apresentar sintomas, como úlceras na pele, quando infectados, mostrando que, assim como o homem, esses não são hospedeiros naturais desses organismos, apesar de constituírem importantes reservatórios para a doença no homem (15) (16).

No hospedeiro vertebrado, esse organismo é encontrado na forma amastigota, dentro de vacúolos parasitóforos de células do sistema fagocítico mononuclear, os macrófagos e monócitos. Esses parasitos, na forma amastigota, são redondos, com um flagelo rudimentar e multiplicam-se dentro dos vacúolos parasitóforos até romperem a membrana do macrófago, liberando formas amastigotas que irão infectar novos macrófagos. Os hospedeiros vertebrados constituem uma grande variedade de mamíferos, sendo os reservatórios naturais mais comuns roedores e canídeos (17). O homem aparece nesse ciclo como hospedeiro acidental, uma vez que não pertence ao ciclo natural do parasito.

A leishmaniose pode provocar quadros de lesões cutâneas, localizadas nas mucosas ou vísceras. No homem, a progressão da doença é determinada pela espécie do parasito e a suscetibilidade do hospedeiro e pode ser classificada em grupos, de acordo com suas manifestações clínicas:

- Leishmaniose cutânea – caracterizada pela presença exclusiva de lesões cutâneas, ulcerosas ou não. Essas lesões podem se apresentar de maneira disseminada, caracterizando um quadro de leishmaniose cutânea difusa.

- Leishmaniose mucocutânea – Forma que produz ulcerações destrutivas nas mucosas do nariz, boca, faringe e laringe.

- Leishmaniose visceral – Forma visceral, na qual os parasitos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear alojando-se no baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides, causando danos a esses órgãos e freqüentemente levando ao óbito quando não tratada.

Anualmente, são reportados 600.000 novos casos mundialmente, no entanto, este valor é provavelmente muito inferior à realidade. Acredita-se que o número real chegue a 2 milhões de novos casos por ano, com um total de 12 milhões de pessoas infectadas, e uma população de risco de 350 milhões de pessoas (World Health Organization). Esta doença constitui-se, então, em um grande problema de saúde pública, sendo a segunda infecção mais importante causada por protozoários, superada somente pela malária.

No Brasil, dados do Ministério da Saúde reportam um aumento do número de novos casos de leishmaniose nos últimos anos, com uma incidência calculada de 5 casos para cada mil pessoas entre os anos de 1980 e 1984, passando para 25 casos para cada mil pessoas entre os anos de 1987 e 1990 (13). No ano de 2005 foram reportados 26014 novos casos de leishmaniose tegumentar e 3481 novos casos de leishmaniose visceral no país (18). No estado de São Paulo, de acordo com dados do Ministério da Saúde, foram relatados 467 novos casos de leishmaniose tegumentar e 160 novos casos de leishmaniose visceral, no ano de 2005 (18).

1.2 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da doença é feito pela observação de sinais clínicos, e deve ser confirmado pelo diagnóstico laboratorial. O exame parasitológico pode ser feito pela observação, por microscopia, de formas amastigotas em “smears” de pele ou aspirados de tecidos corados, ou pelo isolamento *in vitro* do parasito em meio de cultura específico, ou isolamento *in vivo* através da inoculação em animais suscetíveis. O exame imunológico é

feito através de testes intradérmicos conhecidos como introdermoreação de Montenegro ou por testes sorológicos, como testes imunoenzimáticos de ELISA, sendo esse último pouco utilizado clinicamente, mas freqüente para fins de pesquisa. Finalmente, existem os métodos de detecção por PCR, que, embora ainda não sejam utilizados como rotina nos diagnósticos, apresentam uma sensibilidade maior que os métodos acima citados, além de permitir a determinação da espécie de leishmania presente na lesão, sem o risco de reações cruzadas (19, 20).

O principal composto utilizado no tratamento das leishmanioses é o antimônio pentavalente conhecido como glucantime, que interfere na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos, e por isso apresenta uma série de efeitos colaterais, o tratamento é longo e a droga deve ser administrada por via intravenosa, requerendo a internação do paciente. Outras drogas utilizadas no tratamento de leishmanioses são a anfotericina-B, pentamidina e paromomicina (21).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um análogo de fosfatidilcolina e é a primeira droga de administração oral utilizada no tratamento de leishmaniose. Ela atua no metabolismo de alquil-lipídios e na biossíntese de fosfolipídios (22). Já foram isolados clones resistentes à droga, cujo mecanismo de resistência parece se basear na inativação da enzima responsável pelo transporte do composto para o interior da célula (23, 24).

1.3 A *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

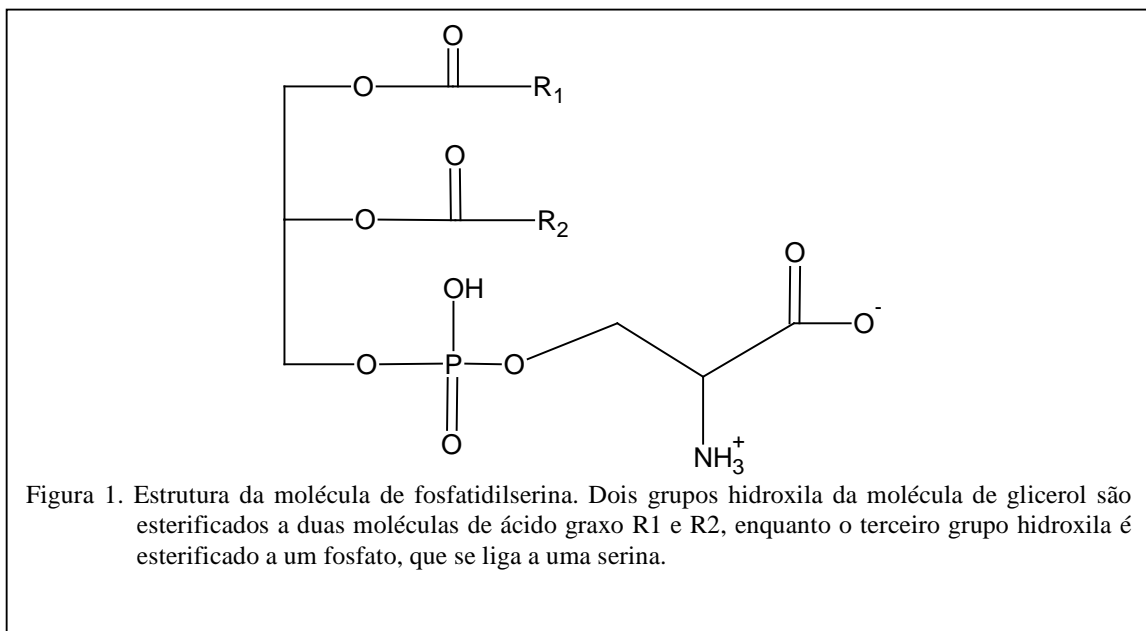
A *L. (L.) amazonensis* já foi detectada no Brasil, Paraguai, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Panamá e Guiana Francesa (25). No Brasil, pode ser encontrado nas florestas primárias e secundárias da Amazônia, estendendo-se pelas regiões Nordeste, Centro-Oeste, e Sudeste, tendo sido recentemente isolada no Estado do Rio de Janeiro (26, 27).

Alguns hospedeiros mamíferos conhecidos são os roedores *Proechimys*, *Oryzomys*, *Neacomys*, *Nectomis* e *Dasyprocta*, marsupiais *Marmos*, *Metachirus*, *Didelphis* e *Philander* e a raposa *Cerdocyon*. Seu principal vetor conhecido é o *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (11, 13).

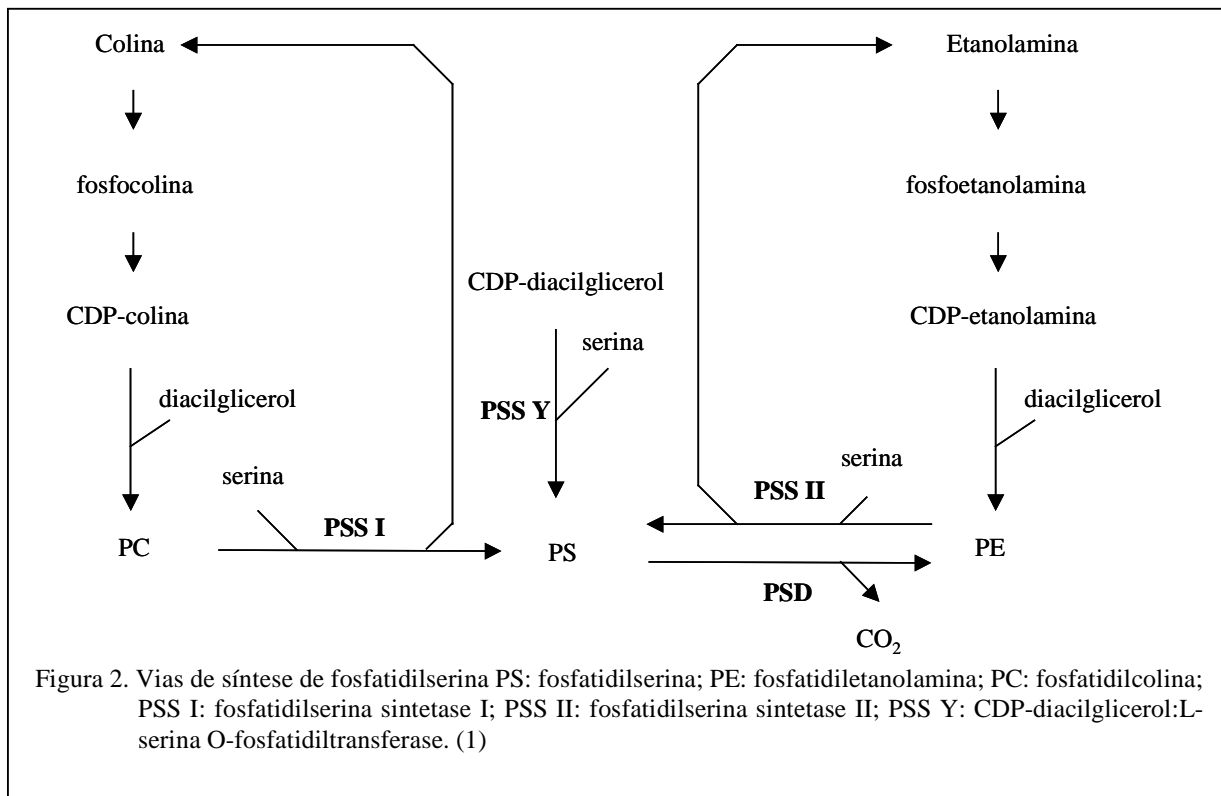
O parasito leva a um quadro de leishmaniose cutânea que normalmente apresenta uma única ferida, com borda elevada, fundo granuloso e indolor, mas pode se manifestar com a presença de mais feridas ou evoluir para um quadro de leishmaniose cutânea difusa anérgica em indivíduos deficientes em uma resposta imunológica mediada por células. Embora exista a descrição de visceralização de *L. (L.) amazonensis* (28), normalmente o parasito não se instala nos tecidos viscerais, e, mesmo em pacientes que apresentaram a forma cutânea difusa anérgica da doença durante vários anos, o paciente não apresenta sintomas de leishmaniose visceral, e o parasito não pode ser detectado nas vísceras, mesmo sendo possível sua detecção em grande quantidade nas lesões cutâneas (13).

1.4 A fosfatidilserina e sua síntese

A PS, cuja estrutura está apresentada na figura 1, é um fosfolípídeo composto de dois ácidos graxos e um grupo polar ligados a uma molécula de glicerol. Esse grupo polar é composto de um grupo fosfato, que se liga à molécula de glicerol, e uma molécula de serina ligada ao fosfato através do grupamento hidroxila de seu grupo radical.



Em mamíferos, a síntese de PS ocorre a partir de fosfolipídios pré-existentes, em reações de troca, nas quais o grupo polar dos fosfolipídios pré-existentes é substituído. Nesses organismos, a PS pode ser sintetizada a partir de fosfatidilcolina (PC) e serina, gerando PS e colina, reação catalisada pela fosfatidilserina sintetase I, ou a partir de fosfatidiletanolamina (PE) e serina, gerando PS e etanolamina, reação catalisada pela fosfatidilserina sintetase II, como apresentado na figura 2 (29).



Em eucariotos, a PS, assim como os outros fosfolipídios, é sintetizada no retículo endoplasmático, em membranas associadas às mitocôndrias (30) (31), e então exportada para a membrana plasmática através de vesículas.

Bactérias e leveduras possuem uma via de síntese de PS distinta, que sintetiza fosfatidilserina a partir de CDP-diacilglicerol e serina, gerando fosfatidilserina e CMP, reação catalizada pela CDP diacilglicerol:L-serina O-fosfatidiltransferase (Figura 2). Plantas complexas possuem as três vias de síntese citadas (1).

1.5 A fosfatidilserina e seu equilíbrio na membrana plasmática

Em eucariotos complexos, a PS se encontra constitutivamente na face interna da membrana plasmática, sendo exposta na face externa da membrana plasmática somente quando a célula entra em um processo de morte celular programada ou necrose. Em eucariotos complexos, existem enzimas responsáveis por manter o equilíbrio de fosfolipídios na membrana plasmática, mantendo as moléculas de PS na face interna da mesma, e também enzimas responsáveis por desfazer esse equilíbrio quando a célula entra em apoptose (32).

Existe um grupo de enzimas, conhecidas como flipases, capazes de transportar fosfolipídios da face externa para a interna da membrana plasmática. Essas enzimas realizam esse transporte com gasto de energia, e normalmente possuem grande especificidade, tendo grande afinidade por PS e PE (33). Esses transportadores também são muito eficientes, fazendo com que praticamente não haja PS na face externa da membrana plasmática. Alguns membros dessa família já foram caracterizados em mamíferos, e pertencem à família de proteínas dos translocadores de aminofosfolipídios (APLT) (34).

O grupo das flopases possui a função inversa ao das flipases, transportando fosfolipídios da face interna para a externa da membrana plasmática. Assim como as flipases, elas gastam energia para realizar esse transporte. Elas possuem uma baixa especificidade para os diferentes tipos de fosfolipídios, transportando todos eles sem diferenciá-los pelo seu grupo polar. Os membros dessa classe de enzimas já caracterizados pertencem à família de proteínas ABC (ATP binding cassette), uma família de enzimas com

grande número de membros, das quais alguns membros também estão envolvidos com resistência a drogas de células tumorais (35, 36).

Finalmente, existe o grupo das escramblases que são as enzimas ativadas quando a célula entra em apoptose. Essas enzimas são ativadas pelo aumento da concentração de cálcio intracelular, e permitem a livre passagem de fosfolipídios de uma face à outra da membrana plasmática, sem gasto de energia e desempenham papel fundamental na exposição de PS durante o processo de apoptose (33, 37). O aumento de cálcio intracelular também inibe a atividade das flipases, contribuindo para o acúmulo de PS na face externa da membrana plasmática.

1.6 O equilíbrio de PS na membrana de leishmânias

Foram analisadas as atividades de translocação de fosfolipídios em promastigotas de *L. (L.) tropica*, utilizando-se análogos de alguns fosfolipídios (38). Os resultados indicam atividades de flipase de PE, PC e PS dependente de ATP, e atividade de flopase de PE, PC e PS, mesmo na ausência de ATP. A ausência de translocação de lipídios da face externa para a interna sugere que não há uma escramblase clássica ativa nas condições ensaiadas, que permitiria a livre passagem de fosfolipídios entre as faces da membrana plasmática. A atividade de flopase na ausência de ATP, no entanto indica a presença de uma translocase diferente das descritas para organismos complexos.

Os resultados do trabalho também sugerem que a presença de PS observada na face externa da membrana plasmática de células em fase estacionária é resultado de um ligeiro desequilíbrio entre as atividades de flipase e flopase de fosfatidilserina em promastigotas, sendo detectada uma atividade de flipase de fosfatidilserina ligeiramente menor, quando as células entram em fase estacionária, e que poderia levar a um acúmulo de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (38).

A caracterização molecular de uma enzima com atividade de flipase foi feita por um grupo que buscava mecanismos de resistência a miltefosina em *L. (L.) donovani*. Os autores perceberam que a linhagem de leishmânia resistente a miltefosina possuía uma deficiência em sua atividade de flipase de alguns fosfolipídios, e, praticamente, uma ausência dessa atividade para PS (24). Essa caracterização foi complementada em 2006,

com a descrição de uma segunda subunidade dessa enzima, necessária para a atividade da enzima (39).

1.7 Metacicloênese e moléculas de superfície

A metacicloênese é o processo no qual os parasitos na forma promastigota procíclica, não infectiva, que colonizam o tubo digestório do inseto vetor se diferenciam para a forma promastigota metacíclica, infectiva. Esse processo de diferenciação coincide com o período de um novo repasto do vetor, aumentando a probabilidade de um inóculo em um novo hospedeiro vertebrado (40).

No processo de metacicloênese, o parasito apresenta uma série de modificações morfológicas, como a redução do volume e do comprimento do corpo celular e o alongamento do flagelo. Essas modificações morfológicas são acompanhadas de uma série de modificações bioquímicas, como modificações na estrutura dos lipofosfoglicanos (LPG) (41) e aumento na expressão das metaloproteases de superfície majoritárias (MSP), conhecidas como gp63 (42). Essas alterações na superfície das leishmânias diminuem sua afinidade pelo epitélio intestinal do vetor, levando a um desligamento do mesmo e permitindo sua migração para as porções anteriores do tubo digestório (21).

As MSPs podem degradar diversas proteínas, atuando como uma endopeptidase, sem atividade de exopeptidase. Essas enzimas provavelmente possuem funções diversas nas diferentes fases de vida do parasito (42).

1.8 O macrófago

Os macrófagos são células de defesa dos mamíferos que se originam a partir de monócitos que migram da corrente sanguínea para diferentes tecidos e em conjunto com os monócitos constituem o sistema de fagócitos profissionais do organismo. Os fagócitos profissionais são capazes de internalizar e matar microorganismos invasores em compartimentos lisossomais.

Os macrófagos possuem diversas formas de combater mecanismos invasores. A fagocitose de corpos estranhos leva à ativação da enzima NADPH oxidase, que transfere

prótons para moléculas de oxigênio, formando superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, todos altamente reativos. Os macrófagos também são capazes de ativar próton ATPases e assim alterar o pH das vesículas fagocíticas formadas, tornando-as extremamente ácidas o que leva à desnaturação das proteínas, deixando-as suscetíveis à ação de hidrolases (21).

Outra enzima muito importante na defesa do macrófago é a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que quando ativada sintetiza óxido nítrico a partir da oxidação do aminoácido L-arginina em citrulina e óxido nítrico, sendo esse último uma molécula altamente reativa e efetora no combate a infecções (43).

A arginase possui o mesmo substrato da iNOS e degrada L-arginina em uréia e ornitina, sendo essa última substrato para a ornitina descarboxilase, principal enzima na via das poliaminas (44). A iNOS e a arginina podem ser induzidas em macrófagos murinos por citocinas antagonistas. A citocina pró-inflamatória interferon- γ induz uma resposta do tipo Th1 e aumenta a atividade da iNOS, enquanto as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 induzem uma resposta tipo Th2 e induz um aumento na atividade da arginase (45). TGF- β 1 também é capaz de induzir a atividade de arginase e aumentar a síntese de poliaminas (46).

Além do papel no combate a microorganismos invasores, os macrófagos também atuam na remoção de células que entraram em processo de morte celular, seja por necrose ou apoptose (47).

1.9 Mecanismos de invasão e evasão: A leishmania e o macrófago

A leishmânia deve ser capaz de se evadir da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado desde o momento de seu inóculo. A primeira resposta que deve evitar é a lise mediada por sistema complemento. Promastigotas metacíclicas não só são resistentes à lise por sistema complemento, mas também são capazes de subverter o sistema a seu favor. Parte da resistência ao sistema complemento é atribuída às moléculas mais longas de LPG em sua superfície (48).

As MSPs também desempenham um papel na resistência da leishmânia à lise mediada por sistema complemento, clivando o componente C3 em seus subprodutos e convertendo C3b em sua forma inativa C3bi (42). As moléculas de C3b e C3bi ficam

aderidas à superfície das leishmânias, opsonizando-as e assim facilitando sua fagocitose pela ligação aos receptores CR1 e CR3 dos macrófagos. A ligação aos receptores CR1 e CR3 dos macrófagos leva à inativação da imunidade mediada por células via IL-12, contribuindo para a sobrevivência dos promastigotas (49).

Uma vez no interior dos macrófagos, as leishmânias ficam inacessíveis à ação da resposta humoral. Dessa maneira, anticorpos não possuem qualquer efeito no curso da infecção, podendo até vir a ser prejudicial ao hospedeiro (21).

Os macrófagos são as células efetoras no controle da leishmaniose, apesar de serem as células hospedeiras desse parasito, e a maneira como ele é ativado define o curso da infecção. As células T-helper possuem um papel fundamental nessa ativação e a expansão de clones do tipo TH1 leva a um controle da doença, enquanto a expansão de clones do tipo TH2 leva a uma piora no quadro da doença (21).

Dentro dos macrófagos, as leishmânias são capazes de inibir a fusão entre o fagossomo e o endossomo, logo após a invasão do macrófago, através de suas moléculas de LPG (50). As LPGs também atuam na resistência das células à atividade de proteases do fagolisossomo enquanto as MSPs exibem atividade ótima em condições ácidas e são capazes de degradar as enzimas lisossomais (50, 51, 21).

As leishmânias também são capazes de impedir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, inibindo a atividade da iNOS (52).

Finalmente, as leishmânias são capazes de deslocar a resposta do hospedeiro de TH1 para TH2, que não induz o “*burst*” oxidativo (52). Elas inibem a produção de IL-12, necessária para a instalação de uma resposta TH1, ao mesmo tempo em que induzem a produção de IL-10, capaz de deslocar a resposta para TH2 (21).

As formas amastigota se multiplicam no interior do macrófago até que este se rompa, liberando formas amastigota que podem invadir outros macrófagos, células dendríticas e fibroblastos (53).

1.10 As células em apoptose e o macrófago

A morte celular programada é um mecanismo extremamente benéfico a organismos multicelulares. Ele permite a esses organismos eliminar células que não são mais

necessárias, ou que são potencialmente perigosas, e é característica do desenvolvimento de alguns animais e plantas (54). A morte celular programada pode ser induzida por uma variedade de sinais, intrínsecos ou extrínsecos à célula.

A apoptose foi descrita morfológicamente por Kerr e colaboradores, que a distinguiu da morte celular por necrose. (55). O processo de apoptose pode incluir os seguintes eventos: redução do volume celular, condensação da cromatina, condensação citoplasmática, fragmentação do DNA nuclear, perda do potencial da membrana mitocondrial, protusões da superfície celular, passagem de fosfatidilserina, normalmente encontrada na face interna da membrana plasmática para a face externa e fagocitose das células e corpos apoptóticos por células vizinhas ou fagócitos sem desencadear uma resposta inflamatória. A apoptose é caracterizada por um conjunto desses eventos, ocorrendo de maneira organizada. (56)

Na fisiologia normal do processo, a remoção das células em apoptose ocorre sem que haja inflamação no local, pela ação fagocítica de macrófagos não ativados (57).

Uma etapa essencial do programa de apoptose é o aparecimento de sinais na superfície da célula em apoptose que indicam aos fagócitos que ela deve ser removida. Os fagócitos reconhecem esses sinais e fagocitam as células em apoptose antes que sua membrana se rompa, liberando conteúdo pró-inflamatório nos tecidos adjacentes. Esses sinais agindo isoladamente ou em combinação com outros sinais permitem aos fagócitos distinguirem as células a serem fagocitadas entre as células ainda viáveis (58).

Um dos sinais reconhecidos pelos fagócitos é a passagem da PS, normalmente encontrada exclusivamente na face interna da membrana plasmática, para a externa (59). Esse é um dos primeiros eventos que ocorre em uma célula em apoptose e participa da remoção das células em apoptose pelos macrófagos sem inflamação local (58).

O reconhecimento de moléculas de PS na superfície de células em apoptose leva a uma desativação do fagócito, caracterizada pela expressão das citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10, e inibição da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (60).

1.11 Apoptose em leishmania

Embora inicialmente se imaginasse que o processo de apoptose fosse um processo exclusivo de metazoários, ele foi demonstrado em diversos organismos unicelulares, entre eles organismos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (61). Nesse último organismo, esse tipo de morte pode ser importante no controle da população de promastigotas no interior do tubo digestório do flebotomíneo, evitando a morte do hospedeiro, assim como no controle do número de parasitos no interior de macrófagos, evitando uma resposta inflamatória exacerbada (61).

Foi mostrado que amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, responsáveis pela propagação da doença no hospedeiro vertebrado, expõem PS assim como as células em apoptose (62).

Embora amastigotas purificadas de lesão sejam positivas para a exposição de PS, elas não apresentam imediatamente outros sinais de apoptose, mas quando as células purificadas são incubadas *in vitro* a 34°C, pode ser observada a quebra do DNA dessas células (resultados não publicados, citados por Barcinski e colaboradores (63)).

Esses resultados sugerem que amastigotas são capazes de iniciar um processo de apoptose, expondo PS e em seguida abortar esse processo quando fagocitadas, ou que elas expõem PS por um mecanismo independente dos mecanismos de apoptose e entram posteriormente em apoptose, quando impossibilitadas de invadir o macrófago.

Posteriormente foi demonstrado que promastigotas de *L. (L.) tropica* também eram capazes de expor PS na face externa de sua membrana plasmática, e que essa exposição aumentava quando a cultura de leishmânias entrava em fase estacionária (38).

Também foi demonstrado que parte da população de uma cultura de promastigotas de *L. (L.) major* expõem PS na face externa da membrana quando a cultura entra em fase estacionária (64). Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que a porção da população que expõe PS consiste de células em apoptose, com características tais como a fragmentação do DNA nuclear e redução da mitocôndria.

A exposição de fosfatidilserina também foi descrita em outros protozoários, como *Toxoplasma gondii* (65) e *Trypanosoma cruzi* (66), mostrando que esse mecanismo é amplamente distribuído entre protozoários.

1.12 A leishmânia, o macrófago e as células em apoptose

Foi mostrado que a exposição de amastigotas a macrófagos levava a uma maior produção de TGF- β 1 e IL-10, as mesmas citocinas expressas quando macrófagos são expostos a células em apoptose e que levam a uma inativação do macrófago. Quando as amastigotas eram tratadas previamente com anexina-V, que se liga especificamente a PS, esse efeito não era observado. Também foi mostrado que quando as células eram previamente tratadas com anexina-V, a capacidade das leishmânias de invadir macrófagos era reduzida em mais de 50% (62). Os autores propuseram que esse seria um mecanismo de mimetismo de células em apoptose utilizado pelas amastigotas para poder invadir os macrófagos sem que estes fossem ativados, escapando assim da resposta que normalmente seria montada contra o microorganismo invasor. Promastigotas de *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major* também são capazes de expor PS na face externa de suas membranas quando a cultura *in vitro* entra em fase estacionária. Nessa ocasião pôde ser detectado o maior número de formas infectivas na cultura (38, 64).

Quando promastigotas de uma cultura de *L. (L.) major* em fase estacionária expondo PS eram separadas do restante da população, as células restantes perdiam a capacidade de infectar macrófagos, ao mesmo tempo em que as células separadas também eram deficientes nessa capacidade, levando à conclusão de que existe uma dependência entre as duas populações para que a infecção ocorra normalmente (64). Em dados apresentados na XXII Reunião da Sociedade Brasileira de Protozoologia (2006), o grupo de Ger Van Zandbergen mostrou resultados de microscopia de fluorescência que indicam existir uma interação física entre as células que apresentavam PS em sua membrana plasmática e as que não apresentavam essa propriedade. Foi proposto que as células PS negativas e ainda viáveis utilizariam as células em apoptose (PS+) para invadir os fagócitos sem ativar seus mecanismos de defesa, entrando junto com a célula em apoptose fagocitada. Essa proposta implica em um mecanismo altruísta, no qual as células que entram em apoptose se “suicidam” para permitir que as células ainda viáveis invadam os fagócitos.

É interessante notar que culturas de promastigotas de *L. (L.) tropica* e de *L. (L.) major* possuem perfis diferentes de exposição de PS quando em fase estacionária, sugerindo que essas espécies podem utilizar estratégias diferentes para o primeiro contato com os macrófagos, logo após o inóculo no hospedeiro vertebrado, enquanto ainda se encontram na forma de promastigotas metacíclicos.

5 Discussão

5.1 Metabolismo de fosfolipídios em *L. (L.) amazonensis*

O seqüenciamento e publicação dos genomas de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* vem permitindo a busca de genes envolvidos em vias metabólicas determinadas, levando à construção de um panorama geral das vias e enzimas presentes no organismo analisado. Permite até que se especulem mapas metabólicos teóricos complexos (100, 101). Esses resultados, no entanto, necessitam de confirmação experimental para serem validados, uma vez que essas buscas são sujeitas a erros devido à detecção de pseudo-genes por um lado, ou à existência de genes de família multicópias, cuja função não pode ser diretamente atribuída e ainda apresentar dificuldades devido a expressão de genes estágio-específicos (101).

A análise *in silico* dos genes envolvidos na síntese de fosfolipídios e de serina em *Leishmania* indicou a presença das vias para a síntese de serina e dos fosfolipídios majoritários fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, bem como fosfatidilinositol e difosfatidilglicerol.

Em particular, para a síntese de PC e PE, verificou-se a presença de seqüências semelhantes às dos genes que codificam todas as enzimas necessárias para a sua síntese a partir de glicerol, ácidos graxos e etanolamina e colina, metabólitos comumente encontrados na célula e que também podem facilmente ser conseguidos do meio. Foi demonstrado neste trabalho, que a síntese de PC e PE ocorre em promastigotas em fase exponencial de crescimento e que essas células também conseguem capturar fosfolipídios adicionados ao meio. As duas maneiras de obtenção dos fosfolipídios devem se complementar para suprir as necessidades metabólicas das células, quando em crescimento exponencial.

Também foi verificada a presença de enzimas que permitiriam às leishmânias sintetizar serina a partir de glicina além de outros metabólitos. Serina também não é citada como sendo um aminoácido essencial ao desenvolvimento de leishmania (100). O fato das leishmânias serem capazes de sintetizar o aminoácido não as impede, no entanto, de

capturá-lo diretamente do meio, tal como acontece com PC e PE. De fato, pode ser observada uma incorporação de serina por *L. (L.) amazonensis*, tanto em sua forma promastigota, quanto em sua forma amastigota, como apresentado no anexo 1.

Em promastigotas, pode ser observada a presença de um único sistema de transporte de serina saturável, com K_m de 0.253 ± 0.01 mM e V_{max} de 0.246 ± 0.04 nmol/(min * 10^7 células). Esse sistema apresentou um aumento linear do transporte de serina entre as temperaturas de 20 °C e 45 °C. O transportador mostrou ser sensível ao pH externo à célula, com uma atividade máxima em pH 7,5. A análise do transporte de serina em amastigotas purificadas de infecções *in vitro* de macrófagos, revelou a presença de um transportador com o mesmo K_m do transportador de promastigotas, o que indica a presença do mesmo sistema de transporte nas duas fases do ciclo de vida do parasito.

Assim, as leishmânias apresentam tanto as vias de síntese de precursores, quanto a enzima PSS, para a síntese de PS, além de capturar do meio os precursores necessários para essa síntese.

Através da análise *in silico* só foi possível detectar um gene para a síntese de PS, sendo esse gene similar à fosfatidilserina sintetase II humana e estando o gene anotado como PSS II. Embora pudessem ser detectados genes similares a PSS I e PSS Y, esses apresentavam uma similaridade muito baixa com as seqüências submetidas, e baixa conservação entre as leishmânias cujo genoma foi seqüenciado. O gene LmjF07.0200, que possui maior similaridade à PSS Y de levedura em *Leishmania* possui um padrão de hidrofobicidade diferente da apresentada pela enzima de levedura, com uma estrutura secundária prevista distinta, como apresentado na figura 24. Além disso, possui uma baixa conservação entre as diferentes espécies de leishmânia cujo genoma foi determinado, indicando que mesmo que esse gene derive de uma PSS Y, ele provavelmente não é funcional. No entanto, essa atividade não foi descartada experimentalmente e formalmente não se pode afirmar que não exista.

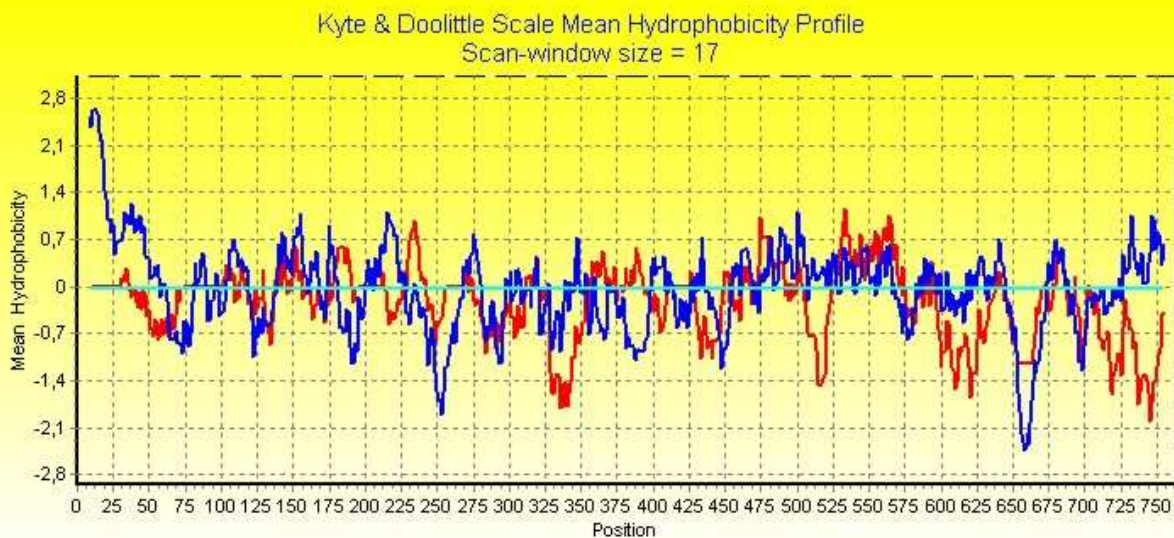


Figura 24. Perfil de hidrofobicidade dos genes PSS Y de *Saccharomyces cerevisiae* e LmjF07.0200 de *L. (L.) major*, respectivamente em vermelho e azul.

Os ensaios de síntese de PS *in vitro*, descartaram a existência de uma enzima tipo PSS I ativa nas condições ensaiadas. Dessa maneira, pode-se presumir a existência de uma única via de síntese de PS em leishmânia, via PSS II e que essa via se encontra ativa na forma promastigota do organismo.

Ao contrário do observado para PC e PE, leishmânias não capturam PS do meio em quantidades detectáveis, e assim deve existir uma pressão seletiva forte sobre a síntese de PS na célula.

Em leveduras, PS apresenta um importante papel não só como precursor de outros fosfolipídios, mas também em outros processos biológicos, como fusão de membranas, seqüestro de solutos e morfologia de vacúolos (102). Em mamíferos, essas funções também se estendem a cofatores de enzimas, além de atuar como sinalizador no processo de apoptose (1).

É esperado, portanto, que a presença de fosfatidilserina em leishmânia seja fundamental para o correto funcionamento de seus mecanismos fisiológicos, submetendo o gene de PSS II a uma forte pressão seletiva, uma vez que é esse o único gene encontrado que leva à síntese do fosfolipídio.

5.2 Análise molecular do gene de PSS II em *L. (L.) amazonensis*

Pela técnica de PCR, foi possível amplificar o gene PSS II de *L. (L.) amazonensis* a partir de DNA genômico e de cDNA, sintetizado a partir de RNA total. A análise da seqüência do gene mostrou uma identidade de no mínimo 83% entre as espécies de *Leishmania*, indicando que esse gene está sob pressão seletiva e, portanto, deve ser um gene funcional.

A análise por Southern blot mostrou que esse gene se encontra presente em cópia única no genoma de *Leishmania*, confirmando dados do seqüenciamento do genoma de *L. (L.) major*.

A análise do perfil de hidrofobicidade mostrou que o gene codifica uma proteína de membrana com onze domínios transmembrana previstos, nas mesmas posições previstas para o gene PSS II humana, além de possuir um perfil muito semelhante.

Também foi mostrado que o gene se encontra expresso em baixa quantidade, só podendo ser detectado por RT-PCR. Essa é uma característica comumente apresentada por proteínas de membrana e já foi observada anteriormente em *Leishmania*, como foi observado para o gene LtrABC1.1 de *L. (L.) tropica* (90).

Além de ser uma proteína de membrana, a PSS II é responsável pela síntese de um fosfolipídio encontrado em baixas quantidades na célula, mas mesmo expressa em pequenas quantidades, deve ser capaz de suprir as necessidades metabólicas da célula.

5.3 Papel da PSS II em *L. (L.) amazonensis*

Tendo sido encontrado o gene de PSS II *n silico* e na tentativa de se obter um entendimento aprofundado sobre o seu papel em *L. (L.) amazonensis*, foram feitas construções para a obtenção de organismos nocaute desse gene.

Nossa primeira tentativa foi infrutífera, muito provavelmente por ser a marca de resistência uma proteína de fusão com o gene alvo, que a direciona para uma membrana.

Uma explicação para nosso segundo insucesso na obtenção de mutantes nocautes de gene de PSS II pode ser fundada na recircularização da construção transfectada. No ensaio de transfecção, o DNA da construção, que vem de um vetor circular, é tratado com enzima

de restrição, uma vez que a recombinação é largamente favorecida se a molécula é linear (Ângela Cruz, comunicação pessoal). Uma digestão incompleta pela enzima de restrição, por exemplo, também pode ser causa de insucesso, deixando na preparação do plasmídeo não linearizado. A entrada de moléculas circulares capazes de replicar na transfecção resultaria na seleção de organismos resistentes ao antibiótico sem que o gene fosse nocauteado.

Para reduzir essa possibilidade, foram feitas transfecções nas quais o DNA utilizado é produto de uma PCR que amplifica somente a parte da construção envolvida no nocaute. A estratégia na utilização de um produto de PCR aumentaria a chance de sucesso no nocaute por garantir que essas moléculas são obrigatoriamente lineares e com baixa probabilidade de circularização e, portanto, de permanecer como elementos extracromossômicos. Assim, produzimos DNA por PCR e utilizamos em nova transfecção de promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Com essa nova estratégia, também foi possível selecionar células resistentes. A análise dos mutantes obtidos mostrou que não era possível detectar nos mesmos a presença da construção, integrada no genoma ou mesmo na forma de elemento extracromossômico. Esse resultado permite afirmar que a utilização do produto de PCR na transfecção para se conseguir mutantes nocaute realmente impede a circularização do produto inserido. Isto ocorreu porque não foi possível selecionar mutantes que possuíam a marca de seleção como elementos extracromossômicos, ainda que não possa ser dito nada sobre se essa abordagem privilegiaria uma recombinação homóloga entre a construção e o genoma da leishmania.

A neomicina age na subunidade maior do ribossomo, bloqueando a síntese protéica. O gene presente no vetor pXG, que deveria conferir resistência a G418, neomicina, age inativando o composto diretamente. Um mecanismo de resistência que poderia estar presente nos clones resistentes é a superexpressão de um gene capaz de transportar a droga para o exterior da célula. Mecanismos de resistência tais como a superexpressão do gene alvo ou mutações no gene alvo são improváveis de estar presentes nesses mutantes. Por ser o gene alvo o ribossomo, que já é normalmente expresso em grande quantidade, mesmo que fosse superexpresso, não deveria alterar a sensibilidade da célula à droga de maneira a torná-la resistente. Ao mesmo tempo, por estar sob forte pressão seletiva é pouco provável que tenham ocorrido mutações pontuais nas proteínas que compõem o ribossomo capazes de

impedir o acesso da neomicina e ainda manter a funcionalidade da síntese protéica. Não conseguimos, no entanto explicar o porquê das células estarem se tornando resistentes à neomicina, uma vez que as células controle (não transfectadas) tratadas com a mesma concentração do antibiótico não sobreviveram. A aquisição dessa resistência nesses clones é um mecanismo a ser elucidado.

Em todas as baterias de transfecções realizadas com o objetivo de se conseguir o nocaute, metade dos pontos eletroporados com as construções para o nocaute tinham o seu meio de cultura suplementado com 20 μ M de PS, como descrito em materiais e métodos e mesmo com o meio suplementado não foi possível conseguir os mutantes desejados. Os resultados indicam que o gene de PSS II provavelmente é essencial à sobrevivência da célula, mesmo quando o meio é suplementado com fosfatidilserina para suprir a suposta deficiência metabólica. Isto corrobora os dados que mostram que a tomada de PS se dá em uma taxa muito baixa, se existir.

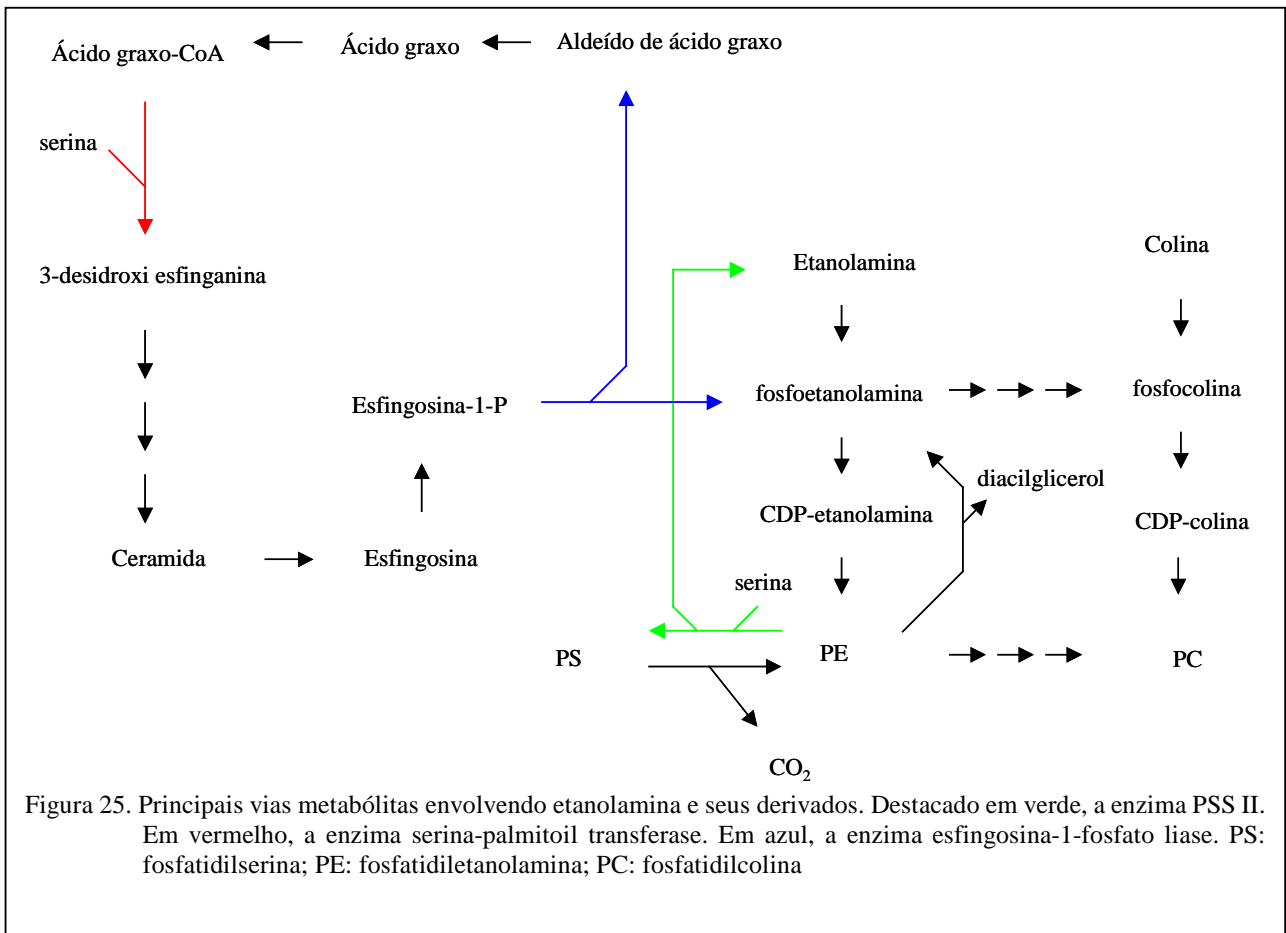
Informações pessoais do grupo do Prof. Ger van Zandbergen (Universidade de Lübeck, Lübeck, Alemanha), que está tentando o nocaute de PSS II em *L. (L.) major*, e com quem estabelecemos uma colaboração, confirmam a dificuldade de se obter um mutante nocauteado para esse gene.

Durante a colaboração, foram trocadas as construções entre os laboratórios e o grupo do Prof. Ger van Zandbergen tentou o nocaute do gene de PSS II em *L. (L.) major*, também sem sucesso. A nossa construção deveria ser capaz de direcionar a recombinação homóloga no gene de PSS II de *L. (L.) major*, uma vez que esse possui uma identidade de 94% na seqüência de nucleotídeos com o gene de PSS II de *L. (L.) amazonensis*. Esse resultado também reforça a afirmação de ser esse um gene essencial à sobrevivência da célula. Embora o Prof. van Zandbergen tenha nos mandado as construções feitas por seu grupo de pesquisa, não chegamos a tentar transfectar essas construções em *L. (L.) amazonensis*, uma vez que essas construções eram baseadas em regiões não traduzidas, e, portanto, com uma menor conservação da seqüência de nucleotídeos, o que poderia inviabilizar a recombinação.

O mutante pode não ser viável, uma vez que a ausência de síntese ou uma síntese reduzida de PS deve levar a alterações na estrutura da membrana causadas pela composição anormal de fosfolipídios da mesma.

A enzima também pode ter um papel importante na síntese de etanolamina, e contribuir em sua síntese, uma vez que os produtos formados pela enzima são fosftidilserina e etanolamina, utilizando como substrato serina e fosfatidiletanolamina. As moléculas de PE consumidas na síntese de PS podem ser regeneradas pela descaboxilação da PS, reação que gera uma molécula de PE e uma de CO₂ para cada molécula de PS (1). Assim, etanolamina seria gerada indiretamente a partir de serina em uma reação de dois passos.

Foi demonstrado que a síntese de etanolamina e seus derivados é importante na viabilidade de *Leishmania* (87). Nesse trabalho, os autores analisam o fenótipo de dois mutantes para as enzimas serina-palmitoil transferase e esfingosina-1-fosfato liase, envolvidas no metabolismo de esfingolipídios. Tais mutantes apresentavam fenótipos muito semelhantes, que eram revertidos ao fenótipo selvagem, quando o meio de cultura era suplementado com etanolamina. Entre os fenótipos observados, estava a alta mortalidade das células, quando a cultura entrava em fase estacionária. Os resultados mostram que a fosfoetanolamina sintetizada, um derivado de etanolamina, é essencial à sobrevivência da célula. Essa conclusão não é imediata, e só pode ser alcançada através dos nocautes, uma vez que olhando somente o mapa metabólico, a fosfoetanolamina formada aparece como um metabólito secundário na via de síntese de esfingolipídios, como mostrado na figura 25.



Assim como no caso da via de síntese de esfingolipídios, durante a síntese de fosfatidilserina pela PSS II, etanolamina aparece como um metabólito formado na reação. Dessa forma, a falta do gene de PSS II poderia ser letal por levar a uma deficiência na produção de etanolamina, além da deficiência na produção de PS.

Quando leishmânias são incubadas com serina marcada, pode ser observada uma incorporação da marcação em fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, além de inositol fosforilceramida e ceramida, como apresentado neste trabalho e por Zhang e colaboradores (87). Nos mutantes para as enzimas serina-palmitoil transferase e esfingosina-1-fosfato liase, pode ser observada uma diminuição na marcação de PE e uma ausência na marcação de PC. O desaparecimento da marcação de PC indica que a marcação é adquirida por um de seus precursores, antes de sua síntese, e não através da metilação de PE marcada.

Provavelmente essa marcação é consequência da metilação de fosfoetanolamina a fosfocolina.

A persistência da marcação em fosfatidiletanolamina nos mutantes pode derivar da descarboxilação de PS marcada a etanolamina. Embora a PS marcada não tenha sido detectada no experimento apresentado, isso pode ser atribuído ao fato desse fosfolipídio representar aproximadamente 6% do total de fosfolipídios, como apresentado adiante, podendo ter sua marcação sobreposta pela de outros lipídios marcados. A marcação observada seria, então, o resultado do ciclo composto pela síntese de PS e sua posterior descarboxilação, regenerando a PE, que dessa maneira adquiriria a marcação originalmente presente na serina (Figura 25).

A partir dessa hipótese, está sendo tentado novamente o nocaute de PSS II, suplementando-se o meio de cultura com etanolamina e PS.

No entanto, não foi possível, até o presente momento, determinar qual é o papel funcional da PS na invasão do macrófago e manutenção da infecção, por conta do modelo e da estratégia utilizados.

Uma alternativa ao nocaute clássico do gene, é se tentar utilizar interferência de RNA para diminuir a expressão do gene. Foi descrito anteriormente que *L. (L.) major* não possui esse mecanismo ativo (103). Tentamos explorar esse mecanismo em *L. (L.) amazonensis* em nosso laboratório, também sem sucesso.

Recentemente, foi publicado a seqüência do genoma de *L. (Viannia) braziliensis*, que apresenta, as enzimas responsáveis pelo mecanismo de interferência de RNA. A presença desses genes, aliada à presença de transposons que devem ser silenciados no genoma, indicam que essa via de silenciamento deve ser ativa nesse organismo (104).

Se ficar provado que esse mecanismo de silenciamento é ativo em *L. (V.) braziliensis*, existe a possibilidade de se explorar o papel funcional do gene da fosfatidilserina sintase por essa abordagem. Ainda deve ser resolvido o problema da indução da expressão, mas isso foi demonstrado ser possível em *L. (L.) chagasi* (105).

Outra alternativa seria induzir uma superexpressão do gene de PSS II em *L. (L.) amazonensis*, que também poderia trazer grande entendimento sobre o papel da PS na infecção de macrófagos. Nosso laboratório tem conseguido superexpressar genes utilizando-se os vetores da série pXG (68). Encontra-se em andamento a seleção de uma

cultura transfectada com uma construção na qual a ORF do gene de PSS II de *L. (L.) amazonensis* foi clonada em pXG, para sua superexpressão nesse mesmo organismo.

É interessante notar que como o gene PSS II parece ser essencial à sobrevivência do parasito, isso o torna um alvo quimioterápico muito atraente. O gene da fosfatidilserina sintetase II é particularmente interessante como alvo quimioterápico porque embora mamíferos também possuam esse gene, possuem também a fosfatidilserina sintetase I, que se utiliza de substratos diferentes. Em 2002 foi descrita a caracterização de camundongos nocaute para PSS II. Tais camundongos pareciam saudáveis, com as fêmeas apresentando fertilidade normal, assim como a maioria dos machos, exceto 10%, que apresentavam os testículos atrofiados. A composição de lipídios nos tecido parecia normal nesses camundongos, apesar de uma menor atividade de síntese de fosfatidilserina. (106) Aparentemente a atividade de PSS I consegue suprir as necessidades metabólicas de mamíferos. Assim, no caso da utilização de um inibidor específico de PSS II como alvo quimioterápico, pode ser esperada a ausência de efeitos colaterais severos para o hospedeiro mamífero, enquanto para o parasito, a perda da atividade dessa enzima aparentemente é letal.

5.4 Flipase e flopase de PS

Uma abordagem alternativa ao nocaute de PSS no estudo do papel funcional da PS na invasão e manutenção da infecção de macrófagos é a pesquisa das enzimas envolvidas no transporte de PS de uma face à outra da membrana plasmática.

Os genes envolvidos nesse transporte em outros organismos pertencem a grupos grandes de enzimas muito semelhantes entre si e que possuem funções distintas, o que dificulta sua detecção através da análise dos genomas publicados de leishmânias.

Para tentar contornar a necessidade da análise individual de cada um dos genes candidatos, está sendo tentada a seleção em colunas magnéticas de mutantes de *L. (L.) amazonensis* transfectados com uma biblioteca de DNA genômico desse mesmo organismo em cosmídeos e que apresentem um padrão de exposição de PS distinto das leishmânias selvagens.

Embora ainda seja necessária uma padronização mais fina do processo de seleção dos mutantes, após alguns ciclos de seleção, pode ser observada a presença de mutantes que expõem PS quando a cultura de promastigotas encontra-se em fase log de crescimento. A grande dificuldade no momento é a eliminação de células contaminantes que não expõem PS.

Uma alternativa ao uso de colunas magnéticas na seleção dos mutantes seria a utilização de um aparelho de FACS com “sorting”, que permite a seleção individual de células através de sua fluorescência, entre outros parâmetros. Dessa maneira seria possível marcar a população de células com anexina conjugada a FITC, e iodeto de propídeo, e selecionar somente aquelas células que apresentam a membrana íntegra e expõem PS. Também estão sendo feitas construções para se tentar o nocaute e a superexpressão do translocador de PS descrito para *L. (L.) donovani* (24), que deverão levar à exposição contínua e a diminuição da exposição de PS em todas as fases do ciclo do parasito. Já foi mostrado que um mutante de *L. (L.) donovani* nocaute para esse gene é viável (39) e também deve ser um mutante que superexpresse o mesmo, o que torna essa abordagem bastante promissora. Dessa maneira poderia-se obter um modelo para o estudo da função da PS de *Leishmania* na invasão e inativação do macrófago.

Referências Bibliográficas*

- 1 Vance JE, Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res.* 2005;44(4):207-34.
- 2 Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol.* 1991;72(2):157-63.
- 3 Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;59(2):327-9.
- 4 de Andrade Stempluk V, Floeter-Winter LM. Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in Leishmania. *Int J Parasitol.* 2002;32(4):437-47.
- 5 Spath GF, Beverley SM. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol.* 2001;99(2):97-103.
- 6 Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-7.
- 7 Nishijima M, Kuge O, Akamatsu Y. Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. I. Inhibition of de novo phosphatidylserine biosynthesis by exogenous phosphatidylserine and its efficient incorporation. *J Biol Chem.* 1986;261(13):5784-9.
- 8 Gupta N, Zahn MM, Coppens I, Joiner KA, Voelker DR. Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem.* 2005;280(16):16345-53.
- 9 Ross R. (a) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J.* 1903;2:1261.
- 10 Ross R. (b) Further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J.* 1903(2):1401.
- 11 Rey L. *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2001.
- 12 Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1269-81.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

- 13 Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis: The neotropical *Leishmania* species. In: Collier LB, A.; Sussman, M., editor. Topley & Wilson's microbiology and microbial infectious diseases. London: Arnold; 1998. p. 241-266.
- 14 Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza JV, Anez N, Valera M, et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. Clin Diagn Lab Immunol. 1994;1(4):385-9.
- 15 Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004;120(3):229-33.
- 16 Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araujo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2007;149(3-4):280-4.
- 17 Brandao-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97(3):291-6.
- 18 Ministério-da-Saúde R-i-d-i-p-a-s. Indicador de dados básicos - Brasil - 2006. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
- 19 Floeter-Winter LM, Shaw JJ. Reserch Advances in Microbiology. In: New horizons in the identification and taxonomy of *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. India; 2004. p. 63-79.
- 20 Ministério-da-Saúde. Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
- 21 Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp Mol Pathol. 2002;72(2):132-41.
- 22 Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 2000;111(1):1-14.
- 23 Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). Int J Antimicrob Agents. 2003;22(4):380-7.

- 24 Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem*. 2003;278(50):49965-71.
- 25 Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 2005;35(11-12):1169-80.
- 26 Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77(5):569-96.
- 27 Azeredo-Coutinho RB, Conceicao-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(7):735-7.
- 28 Barral A, Badaro R, Barral-Netto M, Grimaldi G, Jr., Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1986;35(4):732-4.
- 29 Kuge O, Nishijima M. Phosphatidylserine synthase I and II of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1348(1-2):151-6.
- 30 Jelsema CL, Morre DJ. Distribution of phospholipid biosynthetic enzymes among cell components of rat liver. *J Biol Chem*. 1978;253(21):7960-71.
- 31 Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 1990;265(13):7248-56.
- 32 Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*. 2003;44(2):233-42.
- 33 Daleke DL, Lyles JV. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486(1):108-27.
- 34 Pomorski T, Menon AK. Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(24):2908-21.
- 35 Smith JD, Waelde C, Horwitz A, Zheng P. Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem*. 2002;277(20):17797-803.
- 36 Woehlecke H, Pohl A, Alder-Baerens N, Lage H, Herrmann A. Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). *Biochem J*. 2003;376(Pt 2):489-95.

- 37 Williamson P, Schlegel RA. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1585(2-3):53-63.
- 38 Tripathi A, Gupta CM. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;128(1):1-9.
- 39 Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23766-75.
- 40 Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*. 1989;69(1):100-3.
- 41 Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1992;46:65-94.
- 42 Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;132(1):1-16.
- 43 Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002;70(8):4638-42.
- 44 Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(3):715-9.
- 45 Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol*. 1995;25(4):1101-4.
- 46 Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol*. 1995;155(4):2077-84.
- 47 Kinchen JM, Ravichandran KS. Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 13):2143-9.
- 48 Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1995;181(2):685-97.
- 49 Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med*. 1997;185(11):1977-85.

50 Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1455(2-3):341-52.

51 Sacks DL. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of Leishmania promastigotes. *Infect Agents Dis*. 1992;1(4):200-6.

52 Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today*. 1999;15(1):22-8.

53 Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*. 2000;16(7):292-7.

54 Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245-54.

55 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.

56 Fraser A, James C. Fermenting debate: do yeast undergo apoptosis? *Trends Cell Biol*. 1998;8(6):219-21.

57 Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000;407(6805):784-8.

58 Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276(2):1071-7.

59 Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol*. 2006;16(4):189-97.

60 Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol*. 2001;166(11):6847-54.

61 Shaha C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):233-44.

62 de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol*. 2001;11(23):1870-3.

63 Barcinski MA, Moreira ME, Balanco JM, Wanderley JL, Bonomo AC. The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003;2(1):6.

- 64 van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(37):13837-42.
- 65 Seabra SH, de Souza W, Damatta RA. Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem. Biophys Res Commun*. 2004;324(2):744-52.
- 66 Damatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhaes L, Goldenberg S, et al. Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;266(1):29-33.
- 67 Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol*. 1990;10(3):1084-94.
- 68 Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;77(1):57-64.
- 69 Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*. 1970;53(1):159-62.
- 70 Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-23.
- 71 Sambrook JF, E. F.;Maniatis, T. Molecularcloning, a Laboratory Manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- 72 McMaster GK, Carmichael GG. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(11):4835-8.
- 73 Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(9):5201-5.
- 74 Herrin DL, Schmidt GW. Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *Biotechniques*. 1988;6(3):196-7, 199-200.
- 75 Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser*. 1999;41:95-98. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> [10 abr 2006].
- 76 Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 1982;157(1):105-32.

- 77 Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol.* 1984;179(1):125-42.
- 78 Tusnady GE, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics.* 2001;17(9):849-50. Disponível em: <http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html> [01 fev 2008].
- 79 Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 1998;14(4):378-9. Disponível em: <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html> [01 jun 2004].
- 80 Courret N, Prina E, Mougneau E, Saraiva EM, Sacks DL, Glaichenhaus N, et al. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur J Immunol.* 1999;29(3):762-73.
- 81 Pinto-da-Silva LH, Fampa P, Soares DC, Oliveira SM, Souto-Padron T, Saraiva EM. The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania (L) amazonensis* metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut. *Int J Parasitol.* 2005;35(7):757-64.
- 82 Suzuki TT, Kanfer JN. Purification and properties of an ethanolamine-serine base exchange enzyme of rat brain microsomes. *J Biol Chem.* 1985;260(3):1394-9.
- 83 Vance JE, Vance DE. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol.* 2004;82(1):113-28.
- 84 Law SS, Mukkada AJ. Transport of L-proline and its regulation in *Leishmania tropica* promastigotes. *J Protozool.* 1979;26(2):295-301.
- 85 Nishijima M, Raetz CR. Membrane lipid biogenesis in *Escherichia coli*: identification of genetic loci for phosphatidylglycerophosphate synthetase and construction of mutants lacking phosphatidylglycerol. *J Biol Chem.* 1979;254(16):7837-44.
- 86 Herrmann H, Gercken G. Synthesis of phospholipids in *Leishmania donovani*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1980;361(11):1735-42.
- 87 Zhang K, Pompey JM, Hsu FF, Key P, Bandhuvula P, Saba JD, et al. Redirection of sphingolipid metabolism toward de novo synthesis of ethanolamine in *Leishmania*. *Embo J.* 2007;26(4):1094-104.
- 88 Boothroyd JC, Cross GA. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene.* 1982;20(2):281-9.
- 89 Mayer MG, Floeter-Winter LM. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(5):501-13.

- 90 Parodi-Talice A, Araujo JM, Torres C, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1612(2):195-207.
- 91 da Silva ER, Castilho TM, Pioker FC, Tomich de Paula Silva CH, Floeter-Winter LM. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *Int J Parasitol*. 2002;32(6):727-37.
- 92 Cruz A, Coburn CM, Beverley SM. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7170-4.
- 93 Cruz AK, Titus R, Beverley SM. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1599-603.
- 94 Burchmore RJ, Rodriguez-Contreras D, McBride K, Merkel P, Barrett MP, Modi G, et al. Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3901-6.
- 95 Zhang K, Barron T, Turco SJ, Beverley SM. The LPG1 gene family of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;136(1):11-23.
- 96 Araujo-Santos JM, Gamarro F, Castanys S, Herrmann A, Pomorski T. Rapid transport of phospholipids across the plasma membrane of *Leishmania infantum*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306(1):250-5.
- 97 Tang X, Halleck MS, Schlegel RA, Williamson P. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*. 1996;272(5267):1495-7.
- 98 Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF. *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp Parasitol*. 1999;92(3):183-91.
- 99 Ryan KA, Dasgupta S, Beverley SM. Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene*. 1993;131(1):145-50.
- 100 McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*. *Trends Parasitol*. 2007;23(8):368-75.
- 101 Opperdoes FR, Coombs GH. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol*. 2007;23(4):149-58.

102 Hamamatsu S, Shibuya I, Takagi M, Ohta A. Loss of phosphatidylserine synthesis results in aberrant solute sequestration and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1994;348(1):33-6.

103 Robinson KA, Beverley SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;128(2):217-28.

104 Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007;39(7):839-47.

105 Yao C, Luo J, Hsiao CH, Donelson JE, Wilson ME. *Leishmania chagasi*: a tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. *Exp Parasitol.* 2007;116(3):205-13.

106 Bergo MO, Gavino BJ, Steenbergen R, Sturbois B, Parlow AF, Sanan DA, et al. Defining the importance of phosphatidylserine synthase 2 in mice. *J Biol Chem.* 2002;277(49):47701-8.