

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CURSO DE CIÊNCIAS MOLECULARES

**RELATÓRIO PARCIAL DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA
Bolsa PIBIC_2009_2010**

Período parcial: Agosto 2009 a Fevereiro 2010

ALUNO: Rafael Lemes Beirigo
Nº USP: 6481760
E-MAIL DO ALUNO: rafaelbeirigo@usp.br

TÍTULO DO PROJETO: Identificação e clonagem dos genes que codificam proteínas de membrana translocadoras de fosfatidilserina em *Leishmania*

PROF. ORIENTADOR : Prof^a Dr^a Lucile Maria Floeter-Winter
E-MAIL DO ORIENTADOR: lucile@ib.usp.br
UNIDADE: IB
DEPTO: Fisiologia
FONE: 3091-7503

Resumo

A fosfatidilserina (PS), ao ser exposta na face externa da membrana plasmática, tem um papel funcional importante na remoção de células em apoptose pelo macrófago sem a instalação do processo inflamatório. Neste projeto pretende-se determinar o papel funcional da PS na invasão e inativação dos macrófagos por *Leishmania*. Esforços iniciais de se obter um organismo nocaute para a síntese de fosfatidilserina não resultaram no mutante esperado, demonstrando ser a via essencial para o parasita. Para atingir o objetivo do projeto, serão identificadas as enzimas envolvidas no transporte de PS através da membrana do parasita. Os genes serão então caracterizados quanto à sua expressão, nas diferentes fases do ciclo de vida do parasita, buscando-se responder a questão: há expressão diferencial dos genes durante a metacicloênese, explicando um aumento de translocação da fosfatidil-serina? Essa identificação permitirá a clonagem dos fragmentos gênicos que codificam as enzimas translocadoras de fosfatidilserina numa estratégia que torna possível a realização de testes que permitirão verificar se o gene clonado é responsável pela atividade de flophase de leishmânia.

Introdução

Os organismos do gênero *Leishmania*, identificados inicialmente por Ross (Ross, 1903 apud (Rey 2001)), pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São parasitas que apresentam dois hospedeiros obrigatórios, sendo o ciclo de vida desenvolvido em um inseto (flebotomíneo) e um mamífero. No hospedeiro mamífero, é parasita obrigatório de macrófagos. Nessa célula, encontra-se a forma amastigota, células redondas e sem flagelo aparente, contidas em vacúolos digestivos, ou fagossomos. O ciclo natural do parasito não inclui o homem, esse aparece como um hospedeiro acidental após ser picado pelo inseto vetor, e pode desenvolver diferentes patologias, genericamente denominadas leishmanioses.

No inseto, encontram-se as formas promastigotas, alongadas, de aspecto fusiforme e flageladas que quando em grande número se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectivas e invadem porções anteriores do esôfago e proventrículo do mosquito. No

repasto sanguíneo desse mosquito, são inoculadas no novo hospedeiro mamífero, sendo fagocitadas por macrófagos residentes e diferenciam-se em formas amastigota (Rey 2001)

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 corpo. Essas células contêm lisossomos especializados que se fundem às vesículas fagocíticas recém formadas, expondo o microorganismo fagocitado a um complexo de hidrolases e a um conjunto de moléculas altamente reativas que são produzidas enzimaticamente, como peróxido de hidrogênio, hipoclorito e óxido nítrico. Organismos do gênero *Leishmania* são capazes de evitar a atividade microbicida dos macrófagos e se estabelecerem como parasitas intracelulares dessas células. 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. No caso de células em apoptose, o fagócito é capaz de reconhecer sinais apresentados na superfície de suas membranas plasmáticas, distinguindo-as das células ainda viáveis, e removendo-as sem serem ativados e sem o recrutamento de novos fagócitos (Fadok *et al.* 2001).

Um dos sinais reconhecido pelos fagócitos em células em apoptose é a passagem da fosfatidilserina (PS), normalmente encontrada exclusivamente na face interna da membrana plasmática, para a face externa (Wu *et al.* 2006), sendo esse um dos primeiros eventos da morte celular programada (Fadok *et al.* 2001). O reconhecimento de moléculas de PS na superfície de células em apoptose leva a uma desativação do fagócito, caracterizado pela expressão das citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10, e inibição da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (Fadok *et al.* 2001).

Foi mostrado que amastigotas de *L.(Leishmania) amazonensis* expõem fosfatidilserina assim como as células em apoptose (de Freitas Balanco *et al.* 2001). Foi mostrado também que quando as células eram previamente tratadas com anexina-V, que se liga especificamente a fosfatidilserina, a virulência das leishmânias era reduzida em mais de 50% e não era observada a produção de TGF- β 1 e IL-10 pelos macrófagos. Os autores propuseram que esse seria um mecanismo de mimetismo de células em apoptose que as leishmânias utilizariam para poder invadir os macrófagos sem ativá-los (de Freitas Balanco *et al.* 2001).

A movimentação de fosfolipídios entre as faces da membrana plasmática está relacionada a três atividades enzimáticas descritas: flipases, flopases e escramblases. A atividade de flipases é responsável pela passagem de fosfolipídios da face externa para a interna da membrana plasmática. As translocases descritas em mamíferos com essa atividade possuem uma alta especificidade para fosfatidilserina ou um grupo restrito de fosfolipídios (Daleke & Lyles 2000). A atividade de flopases é responsável pelo deslocamento de fosfolipídios da face interna para a externa da membrana plasmática. Essas translocases normalmente possuem uma especificidade menor do que as flipases, com proteínas individuais translocando uma variedade maior de fosfolipídeos. Em leishmânia, existe um membro dessa família que foi apontado como envolvido no tráfego de fosfolipídios (Araujo-Santos *et al.* 2005).

Tendo em vista as informações acima, o presente projeto tem por objetivo identificar e clonar os genes que codificam as principais proteínas translocadoras de fosfolipídeos, utilizadas pelos parasitas para a exposição de fosfatidilserina na face externa de sua membrana plasmática.

Materiais e Métodos

Organismos

Leishmania (Leishmania) amazonensis MHOM/BR/1973/M2269

Promastigotas foram cultivadas a 25 °C em 10 ml de meio 199 (Sigma) e a cultura foi repicada a cada 4/5 dias, conforme descrito por Kapler *et al.*, 1990 (Kapler *et al.* 1990).

Escherichia coli DH5 α : *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

A bactéria foi cultivada em meio LB (solução aquosa de: triptona - 10 g/L, extrato de levedura – 5 g/L - e cloreto de sódio - 10 g/L) a 37 °C em constante agitação ou mantida a 4 °C em placas de LB/ágar (1,8%).

Extração de DNA de culturas bacterianas em pequena escala (“mini prep”)

Uma colônia bacteriana transformada foi inoculada em 3 ml de meio LB com ampicilina (solução aquosa com: triptona a 10 g/l, extrato de levedura a 5 g/l, NaCl a 10 g/l e ampicilina a 100mg/l), por 18 horas. As células foram colhidas por centrifugação (20 segundos a 14800 x g) em tubo para microcentrífuga de 1,5ml e ressuspensas no vórtice em 300 µl de solução 1 (100µg/ml RNase, 50 mM tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Adicionou-se então 300 µl de solução 2 (0,2 M de hidróxido de Sódio e 1% de dodecil sulfato de sódio) e misturou-se através de cinco inversões do tubo. Incubou-se 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente adicionou-se mais 300 µl de solução 3 (Acetato de potássio 3M) e misturou-se através de cinco inversões do tubo.

Após este tratamento os tubos foram centrifugados a 14800xg por 10 minutos a 4°C (Sorvall RMC 14 – DuPont). O sobrenadante foi recuperado, sem o precipitado. Este procedimento foi então repetido.

Acrescentou-se 400µl de isopropanol e em seguida centrifugou-se os tubos a 14800xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e no tubo colocado 600µl de etanol 70%, sem ressuspender o precipitado. Os tubos foram centrifugados a 14800xg por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco a temperatura ambiente. Depois de seco, o precipitado foi ressuspensão em 50µl de água.

Extração de DNA de culturas bacterianas em grande quantidade

A extração de DNA de bactéria em grande quantidade foi feita seguindo o protocolo descrito anteriormente (Sambrook 1989).

Preparação de bactérias competentes

Células DH5- α foram preparadas com cloreto de cálcio, conforme descrito por Sambrook *et al*, 1989.

Transformação de células bacterianas com DNA

Células DH5- α competentes foram transformadas por choque térmico a 42 °C, conforme descrito por Sambrook *et al*, 1989.

Digestão de DNA com enzimas de restrição

Amostras de DNA foram digeridas utilizando-se de enzimas de restrição em tampão de reação fornecido pelo fabricante (Fermentas) para volumes finais de 10 μ l a 100 μ l de reação. A digestão foi feita por 1 a 16 horas a temperatura de 37 °C

Eletroforese de DNA

Em cada aplicação de DNA em gel de agarose foi adicionado 1/10 do volume de tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol FF; 15% Ficoll – tipo 400, Pharmacia). O DNA digerido era aplicado em gel 1% (1% de agarose em relação de massa, 1X TAE – 40mM Tris-acetato e 1mM EDTA - e 2,5 μ g/l de brometo de etídio) para fragmentos fracionados entre 400 pb e 20000 pb. A eletroforese ocorreu em TAE 1X, onde aplicou –se uma diferença de potencial de 7,7 Volts/cm por tempo suficiente para que o corante bromofenol migrasse 2/3 do comprimento do gel. A visualização era então feita através da incidência de luz ultra-violeta no gel, posto que moléculas de DNA dupla fita intercaladas por brometo de etídio alteram o comprimento de onda incidido, e registradas utilizando maquina fotográfica digital (Kodak, EasyShare C743).

Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose.

Fragmentos de DNA eram purificados utilizando kit específico para essa finalidade (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit).

Transfecção de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio M199 sem adição de phenol red e bicarbonato de calcio (Invitrogen) no mesmo volume e contadas.

Para a contagem das células, 50µl da suspensão foi diluída com 950µl de PBS com 1% formaldeído, e colocada em uma câmara de Neubauer e contadas em microscópio.

Após a contagem e estimativa da quantidade de células, estas foram novamente colhidas por centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em um volume de M199 para concentração final de 2×10^8 células/ml. As células (500µl da suspensão) foram colocadas na cubeta de eletroporação de 0,4 mm juntamente com o volume de DNA necessário para 10µg de DNA e a cubeta foi mantida no gelo por 10 minutos. Aplicou-se dois choques com intervalo de 10 s de 25µF e de 2500V. As células foram, então, colocadas em 10ml de meio de cultura M199 sem antibiótico. Higromicina foi adicionada após 24 horas a uma concentração final de 20µg/ml ou selecionadas em meio semi-sólido com a mesma concentração de droga.

Extração de DNA de promastigotas (protocolo adaptado de Uliana e col, 1991 (Uliana *et al.* 1991))

Promastigotas de fase estacionária foram coletados por centrifugação à 3000xg por 10 minutos a temperatura ambiente, lavados uma vez com PBS 1X (cloreto de sódio 150mM e mono-hidrogenofosfato dissódico 50mM, pH 7.4) e ressuspensos em cloreto de sódio (150 mM). As células foram então lisadas em TES (Tris-HCl 150 mM, pH 7.5, EDTA 50 mM e 1% dodecilsulfato de sódio - SDS) a 65°C com agitação gentil. O lisado foi tratado com pronase (200mg/mL) a 45°C por 2 horas. Seguiu-se, então, uma extração orgânica com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e uma com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos, foi precipitada com etanol, seco e ressuspensos em água. Realizou-se um tratamento com Rnase A e proteinase K e o DNA precipitado foi submetido a novas extrações orgânicas, precipitado e ressuspensos em água (como anteriormente). Por fim a concentração e a pureza era determinada em espectrofotômetro (medidas as absorbâncias em 260, 280 e 320 nm).

Análise da exposição de fosfatidilserina

A análise da exposição de PS pelas células em estudo foi feita em aparelho de FACS-SCAN após tratamento com anexina-V ligada a FITC e iodeto de propídio, determinando-se a porcentagem de células íntegras às quais a anexina-V foi capaz de se ligar, como descrito anteriormente (de Freitas Balanco *et al.* 2001; Tripathi & Gupta 2003). Aproximadamente 5×10^6 células eram resuspensas em 1000 μL de tampão de ligação de anexina, e a 100 μL dessa suspensão era adicionado 0,4 μL de anexina-V conjugada a FITC e incubada a 10 °C por 20 minutos. Em seguida era adicionado iodeto de propídeo para uma concentração final de 10 $\mu\text{g/ml}$ e as células analisadas em aparelho de FACS-SCAN (modelo Beckman Coulter FC 500 MPL).

Composição do tampão de ligação de anexina: 10mM Hepes (pH 7,4), 150mM NaCl, 1mM MgCl_2 e 1,8mM CaCl_2 , esterilizado somente por filtração e mantido a 4 °C.

Resultados

Para se isolar o gene responsável pela atividade de flopase de fosfatidilserina, foram feitas transfecções de leishmânia com uma biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis* (Uliana *et al.* 1999), gentilmente cedida pela professora Silvia Uliana (ICB-USP). Após a transfecção, as células foram selecionadas em meio de cultura contendo o antibiótico higromicina, de forma a selecionar positivamente somente as células contendo o cosmídeo. Dentre essas células selecionadas algumas delas receberiam o gene responsável pela atividade de flopase de fosfatidilserina, fazendo com que elas tivessem esse gene superexpresso, deslocando o equilíbrio entre as atividades de flipase e flopase e fazendo com que a célula passasse a expor fosfatidilserina continuamente. As células com essa característica foram então isoladas utilizando-se “kits” para purificação de células em apoptose, que permitem separar células que expõem PS do restante da população.

Após proceder-se a seleção, foi realizada a extração de DNA total da cultura clonada. Esse material genético foi, então, utilizado para transformar bactérias. Nesse processo pode ser que ocorra tanto a entrada dos cosmídeos quanto do DNA genômico extraído das leishmânias. Como as bactérias foram cultivadas em meio contendo antibiótico ampicilina, somente seriam selecionadas as células que recebessem os cosmídeos, pois o gene responsável pela resistência à ampicilina está localizado nesses. Em seguida, foi realizada a extração dos cosmídeos dessas bactérias, e esses foram numerados de 481 a 486, e procedeu-se com uma digestão utilizando a enzima de restrição *Bam*HI, seguida de eletroforese, como mostrado na figura 1.

A partir da análise dos tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão dos seis cosmídeos, pode-se perceber que há dois padrões distintos, com dois e quatro fragmentos, marcados em vermelho e azul, respectivamente, naquela figura.

Com base neste resultado, inferiu-se que havíamos isolado dois tipos diferentes de cosmídeos. A diferença no padrão de digestão pode ser explicada pela diferença dos trechos do genoma da leishmânia presentes nos dois cosmídeos quando da construção da biblioteca genômica.

O trabalho realizado neste projeto deu continuidade a estes passos iniciais relatados, iniciando-se com um mapa de restrição destes cosmídeos com as enzimas *Sac*I, *Nco*I, *Xho*I,

EcoRI, *NotI*, cujo resultado foi coerente com o esperado, em que tivemos a presença de dois padrões de digestões distintos correspondentes aos grupos que apresentaram os dois padrões de digestão para a enzima *BamHI* (dados não apresentados).

Para que pudéssemos realizar o seqüenciamento desses cosmídeos, tentamos inicialmente a amplificação através de PCR que visava amplificar a região do inserto no cosmídeo, utilizando oligos flanqueadores dessa região, tendo as amostras de 481 a 486 como DNA molde. O produto obtido foi submetido a eletroforese, cujo gel de agarose se encontra-se na figura 2.

Percebe-se um arraste das bandas, o que poderia significar inespecificidade na associação dos oligonucleotídeos ao DNA, levando a uma amplificação de trechos de diversos tamanhos.

Com base nos resultados relatados acima, resolveu-se por utilizar outro “kit” para a PCR (*long PCR*, com “mix” de enzimas), próprio para a amplificação de um trecho longo, como seria o inserto da biblioteca genômica. Para efeitos de comparação, foi realizada novamente a PCR anterior em paralelo a esse experimento. Os cosmídeos utilizados foram os de número 481 e 482.

Mesmo com a utilização do novo “kit”, não se conseguiu a amplificação do inserto, como pode ser visto na figura 3. Já no experimento de repetição da PCR, obteve-se resultado similar aos anteriores. Pela presença de produto amplificado no controle negativo, inferimos que havia contaminação no “kit”. Em paralelo a esta nova tentativa, foi realizada uma repetição da PCR com o *long PCR* e adicionando DMSO mas não houve amplificação (dados não apresentados).

Resolvemos por nos concentrar no resultado que apresentara o arraste. Assim, procedemos com a repetição da PCR utilizando um “kit” novo do modelo utilizado nas duas primeiras PCRs. Além dessa modificação, preparamos em paralelo uma reação sem a utilização de dimetilsulfoxido (DMSO). Entretanto, não houve amplificação para estas reações.

Para obtermos mais massa dos cosmídeos, procedemos com uma nova transformação de bactérias utilizando este material genético para uma preparação em larga escala. Com base no mapa de restrição apresentado na figura 1, separamos os cosmídeos em dois grupos, e realizamos as transformações com os cosmídeos 482 e 485, representantes de cada grupo.

Os produtos das preparações de cosmídeo foram digeridos com *Bam*HI na presença de RNase e fracionado em gel de agarose, como mostrado na figura 4.

Em relação ao cosmídeo 485, entretanto, as bandas continuaram fracas, indicando pouca massa de cosmídeo, que nos levou a repetir a preparação em larga escala.

Realizamos o inóculo para a extração de cosmídeos em larga escala utilizando o material relativo ao cosmídeo 481, que apresentou o mesmo padrão de restrição que o 485. O material obtido foi digerido com *Bam*HI e RNase e o material resultante foi submetido a eletroforese e o padrão de bandas presentes correspondeu ao esperado.

Realizamos então uma preparação de DNA de cosmídeos em larga escala de um de cada tipo de cosmídeo, 481 e 482, e purificamos o DNA em ultracentrifugação em gradiente de CsCl.

Após a ultracentrifugação, somente o tubo relativo ao cosmídeo 481, apresentou as bandas esperadas: uma mais próxima da extremidade inferior do tubo de ultracentrifugação, relativa ao DNA de cosmídeo, e outra mais acima, relativa ao DNA genômico. A banda relativa ao cosmídeo foi coletada e está armazenada em geladeira, aguardando a aquisição de membrana de diálise para a extração do CsCl das amostras.

Procedemos a uma nova transformação de bactérias *E.coli* com o cosmídeo 482. Foram realizadas seis extrações de cosmídeos em pequena escala, numeradas de 41 a 46 para testes desse material antes do inóculo para a extração dos cosmídeos em larga escala. Esse DNA foi digerido em *Bam*HI e em seguida submetido a eletroforese, como pode ser visto na figura 5. Analisando o gel utilizado para essa eletroforese, percebemos que o DNA 43 apresentou o padrão de restrição esperado, além das bandas mais intensas dentre as ali presentes, sugerindo uma maior concentração desses cosmídeos. Utilizamos então as bactérias relativas aos cosmídeos 43 para realizar o inóculo para a maxi prep. O DNA resultante dessa extração de cosmídeos em larga escala foi tratado com RNase e digerido em *Bam*HI para testes, que apresentaram os resultados esperados (dados não apresentados). Esse material foi digerido com *Not*I e *Sac*I, utilizadas anteriormente em outra amostra do mesmo cosmídeo, para efeito de comparação. Após a realização de eletroforese, constatou-se que o resultado correspondeu ao esperado, estando o padrão de digestão bastante similar ao realizado anteriormente (dados não apresentados).

Para testar se os cosmídeos extraídos das leishmânias através da coluna magnética possuíam o gene da floparse, foi realizada a transfecção desses cosmídeos purificados em *L.*

(L.) amazonensis, esperando que houvesse a superexpressão de flofase, levando a uma maior presença de moléculas de fosfatidilserina na face externa da membrana. Foi mostrado que é possível caracterizar a presença de fosfatidilserina na membrana, bem como a face que ela está presente através de ensaios de Anexina-V e iodeto de propídio (Thiagarahan, 1990). Para isso, as células são lavadas e incubadas com Anexina-V com fluorescência, na presença de íons de cálcio. Em seguida a fluorescência é medida em um aparelho de FACScan.

Para a transfecção, foi realizada a eletroporação das leishmânias com os DNAs 43 e 45 das extrações de cosmídeos em pequena escala referidas acima, referentes ao cosmídeo 482, e a extração de cosmídeos em larga escala referente ao cosmídeo 481, também relatada acima. As leishmânias utilizadas nas transfecções foram identificadas da seguinte maneira: 242 e 243 foram transfectadas com o cosmídeo 481, e as 244 e 245 com o cosmídeo 482. Após 48 horas de incubação para recuperação e expressão do gene de resistência, elas foram plaqueadas em meio semi-sólido. Após aproximadamente 8 dias de incubação, foram observadas colônias na placa 244, que foram então inoculadas em meio líquido. As placas 242 e 243 não apresentaram colônias.

Após crescerem por cinco dias em meio líquido, os mutantes foram analisados para a exposição de fosfatidilserina, como descrito em material e métodos e os resultados estão apresentados na figura 6.

Houve uma fluorescência diferencial, o que poderia ter ocorrido devido a um deslocamento no equilíbrio entre as atividades de flipase e flofase, sugerindo que o gene responsável pela atividade de flofase de fosfatidilserina em leishmânia estaria presente no cosmídeo. Para testar esta hipótese, pretendemos futuramente realizar um ensaio de transporte de fosfatidilserina utilizando essas *L. (L.) amazonensis* transfectadas contra *L. (L.) amazonensis* selvagens, sendo esperada uma maior atividade da enzima nas transfectadas.

Também foi realizada uma nova eletroporação de leishmânias com o cosmídeo 484, que possui o mesmo padrão de restrição do 485. A eletroporação foi realizada com duplicata, gerando as culturas de leishmânia de números 252 e 253, que se encontram em processo de seleção e clonagem, e serão futuramente analisadas para exposição de fosfatidilserina pelo mesmo método que foi utilizado para as leishmânias 244 relatado acima.

A atividade de flopases é responsável pelo deslocamento de fosfolipídios da face interna para a externa da membrana plasmática. Essas translocases normalmente possuem uma especificidade menor do que as flipases, com proteínas individuais translocando uma variedade maior de fosfolipídeos. Normalmente essa translocação também se dá com gasto de energia, e algumas das enzimas caracterizadas, que possuem essa atividade, pertencem à família das proteínas com cassete para ligação de ATP (família ABC) (Smith *et al.* 2002) (Woehlecke *et al.* 2003).

Os genes da flopase pertencem à família ABC, e existe um membro dessa família, presente em duas cópias no genoma haplóide de *L. (L.) major*, LmjF11.1220 e LmjF11.1250 que é mais expresso em na fase amastigota (Rochette *et al.* 2008). Isso o coloca como candidato a ser o gene da flopase, dado que a translocação de fosfatidilserina para a face externa da membrana possivelmente ocorre de forma aumentada na fase amastigota, sendo uma possível origem da exposição desse fosfolipídio nessa fase do ciclo de vida do parasito. Procuramos proceder com a amplificação desse fragmento gênico utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir do banco de dados do genoma de *L. (L.) major* e utilizando o DNA de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (L.) major* como molde. Isso foi feito com vista a utilizar a amplificação em *L. (L.) major* como controle, dado que os iniciadores foram desenhados tendo como base o genoma desse organismo. Contávamos com uma conservação genética entre as duas espécies suficiente para permitir a amplificação do gene em *L. (L.) amazonensis*, uma vez que esse organismo é filogeneticamente próximo à *L. (L.) major*. O material obtido foi fracionado em gel de agarose, mas não obtivemos a amplificação esperada, ou seja um fragmento de 6000 pb (dados não apresentados).

Resolvemos por utilizar o “kit” *Top Taq Master Mix* e a PCR foi realizada em um gradiente de temperaturas, variando de 50,2 a 60,0 graus Celsius. O produto foi submetido a eletroforese, como apresentado na figura 7.

Podemos perceber que há um aparente aumento de especificidade com o aumento da temperatura, entretanto, não houve amplificação para o produto esperado. Com base nesses resultados, pretendemos repetir a PCR em gradiente utilizando temperaturas mais altas para o intervalo, e esperamos dessa forma obter a amplificação para o produto desejado.

Realizamos também uma nova eletroporação de bactérias com o DNA extraído das leishmânias purificadas na coluna magnética. Dessa transformação foram obtidos 8 novos

cosmídeos, nomeados de 63 a 70. Essas amostras foram digeridas com *Bam*HI e o material resultante foi analisado por eletroforese em gel de agarose, como indicado na figura 8. Pode-se perceber a presença de três padrões distintos de digestão, sendo que um deles é similar ao padrão obtido para digestão dos cosmídeos 482 e 486 (marcados em vermelho na figura 8).

Essas amostras também foram digeridas com as enzimas *Sac*I e *Not*I, e analisadas em gel de agarose, mas não houve a correspondência esperada de padrões de digestão (dados não apresentados). Levantamos a hipótese de que pode ter havido digestão parcial, e pretendemos repetir estas digestões.

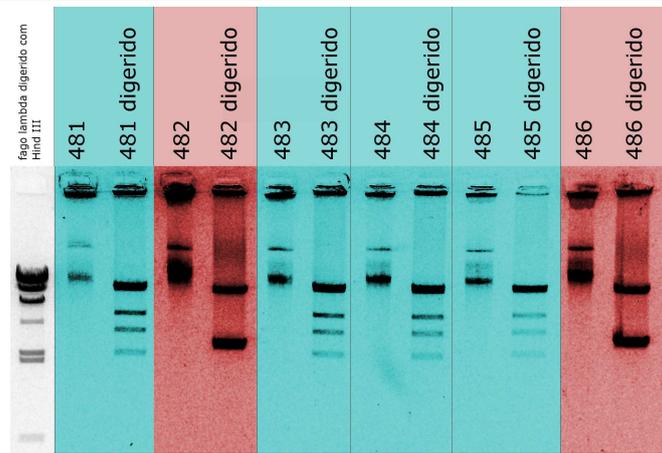


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Na canaleta 1 está o padrão de tamanho molecular, DNA de fago lambda digerido com *Hind*III. Nas canaletas 2 a 13, estão os cosmídeos de 481 a 486 não digerido e digerido com *Bam*HI.

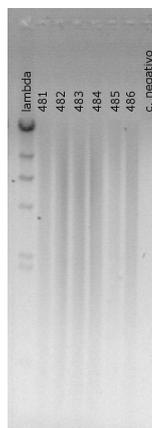


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Na canaleta 1 está o padrão de tamanho molecular, DNA de fago lambda digerido com *Hind*III. Nas canaletas de 2 a 7 estão os produtos obtidos com a realização de PCR que visava amplificar a região do inserto nos cosmídeos, em que os números correspondem à numeração dos cosmídeos. Na canaleta 8 está o controle negativo da PCR.

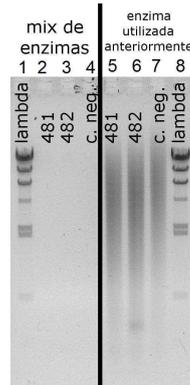


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Nas canaletas 1 e 8 foi aplicado o padrão de tamanho molecular, DNA de fago lambda digerido com *Hind*III. Nas canaletas 2, 3 e 4 se encontram os produtos obtidos nas ampliações dos trechos relativos ao inserto nos cosmídeos 481 e 482, seguidas do controle negativo, respectivamente. Essas ampliações foram obtidas através de PCR com a utilização de “kit” *long PCR* com “mix” de DNA-polimerases, próprio para a amplificação de trechos longos de DNA. Nas canaletas 5, 6 e 7 estão os produtos obtidos para essa mesma amplificação, porém com a utilização de “kit” de PCR que utiliza somente a Taq DNA polimerase, para o qual havia a suspeita de contaminação.

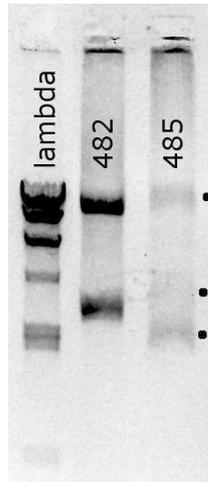


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de tamanho molecular, DNA de fago lambda digerido com *Hind*III. Nas demais canaletas estão as digestões das amostras 482 e 485 com *Bam*HI.

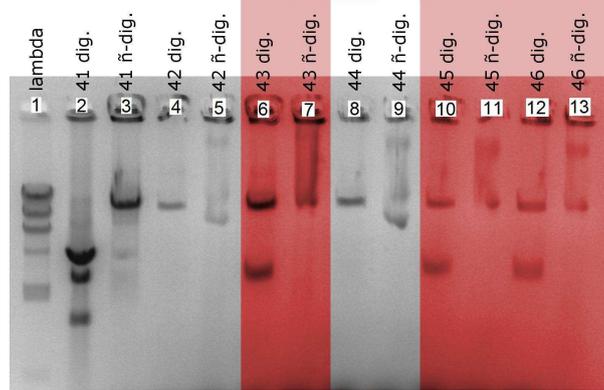


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Na canaleta 1 está o padrão de tamanho molecular, DNA de fago lambda digerido com *Hind*III. Nas seguintes canaletas, aos pares, estão os cosmídeos 41 a 46, sendo que a primeira canaleta do par corresponde ao cosmídeo digerido com *Bam*HI e a segunda ao cosmídeo não digerido.

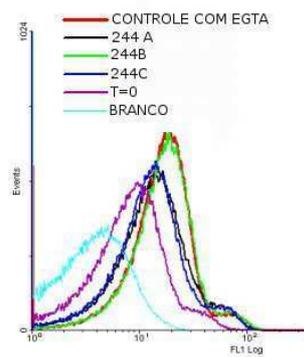
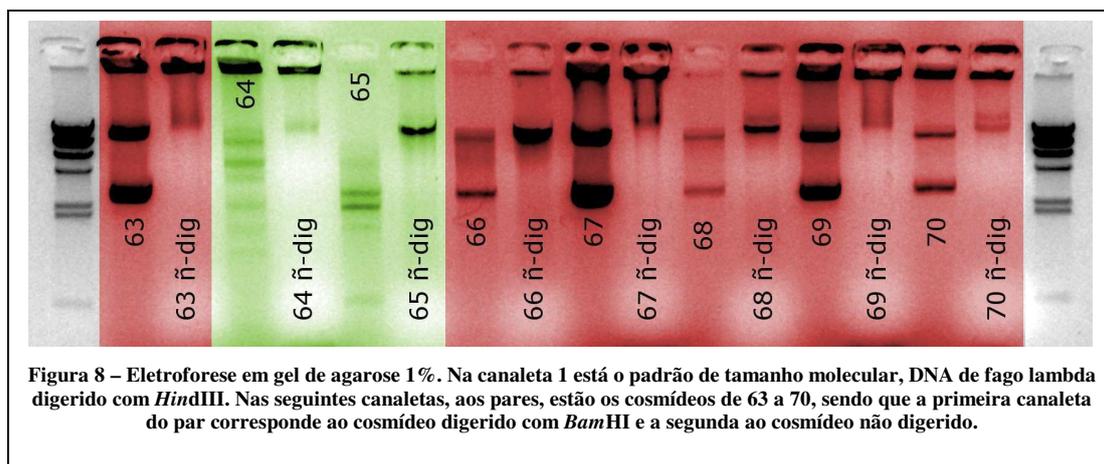
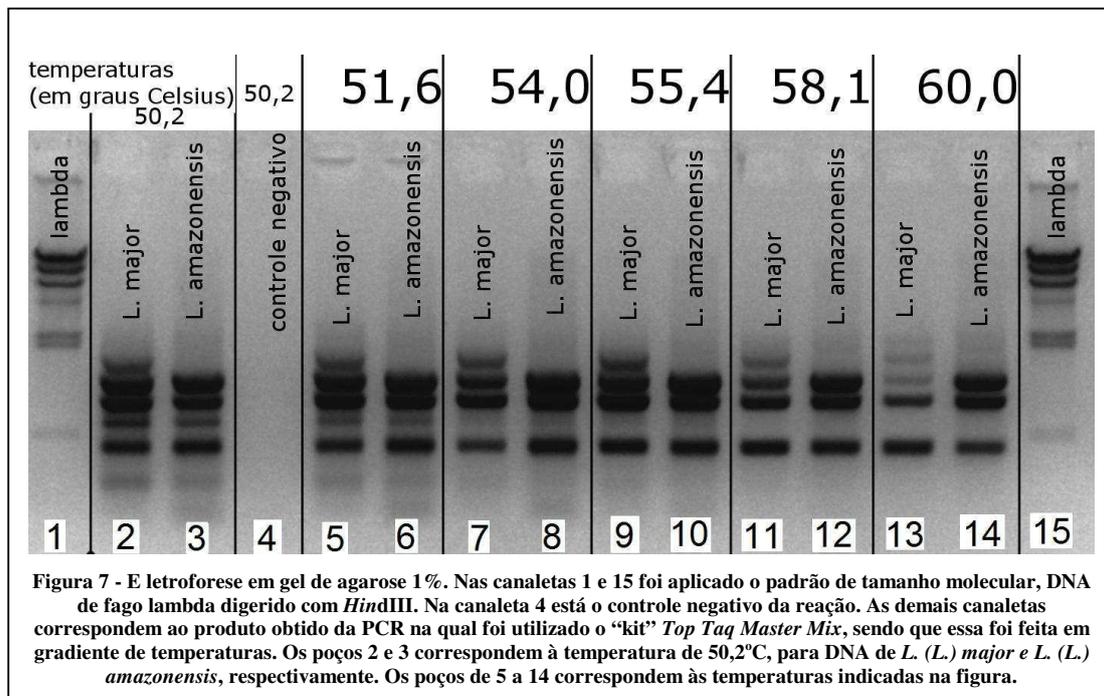


Figura 6 - Espectro de leitura, em aparelho de FACS, de fluorescência para 3 culturas de *L. (L.) amazonensis*, identificadas por 244A, 244B, 244C, transfectadas com o cosmídeo 482 e tratadas com Anexina-V associada a fluorófilo. O controle "Branco" mostra a fluorescência das células não tratadas com Anexina-V associada a fluorófilo. O controle com EGTA se refere à especificidade da ligação da Anexina-V à molécula de fosfatidilserina.



Referências

- Araujo-Santos, J. M., A. Parodi-Talice, S. Castanys & F. Gamarro (2005). "The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*." Biochem Biophys Res Commun **330**(1): 349-55.
- Daleke, D. L. & J. V. Lyles (2000). "Identification and purification of aminophospholipid flippases." Biochim Biophys Acta **1486**(1): 108-27.
- de Freitas Balanco, J. M., M. E. Moreira, A. Bonomo, et al. (2001). "Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity." Curr Biol **11**(23): 1870-3.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, L. Guthrie & P. M. Henson (2001). "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases." J Immunol **166**(11): 6847-54.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M. Henson & D. L. Bratton (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." J Biol Chem **276**(2): 1071-7.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn & S. M. Beverley (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-94.
- Rey, L. (2001). Parasitologia. Rio de Janeiro-RJ, Editora Guanabara Koogan S.A.
- Rochette, A., F. Raymond, J. M. Ubeda, et al. (2008). "Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species." BMC Genomics **9**: 255.
- Sambrook, J. F., E. F.;Maniatis, T (1989). Molecularcloning, a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith, J. D., C. Waelde, A. Horwitz & P. Zheng (2002). "Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux." J Biol Chem **277**(20): 17797-803.
- Tripathi, A. & C. M. Gupta (2003). "Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes." Mol Biochem Parasitol **128**(1): 1-9.
- Uliana, S. R., M. H. Affonso, E. P. Camargo & L. M. Floeter-Winter (1991). "*Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence." Exp Parasitol **72**(2): 157-63.
- Uliana, S. R., N. Goyal, E. Freymuller & D. F. Smith (1999). "*Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene." Exp Parasitol **92**(3): 183-91.
- Woehlecke, H., A. Pohl, N. Alder-Baerens, H. Lage & A. Herrmann (2003). "Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2)." Biochem J **376**(Pt 2): 489-95.
- Wu, Y., N. Tibrewal & R. B. Birge (2006). "Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill." Trends Cell Biol **16**(4): 189-97.