

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

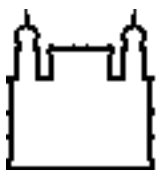
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

*Caracterização das proteínas
de superfície Flag e Sup de
Leishmania potencialmente
envolvidas na interação com o
vetor.*

Amanda Revoredo Lobo

Rio de Janeiro
2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Amanda Revoredo Lobo

Título da Tese: Caracterização das proteínas de superfície Flag e Sup de Leishmania potencialmente envolvidas na interação com o vetor.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientadora: Prof. Dra Yara Maria Traub-Cseko

RIO DE JANEIRO

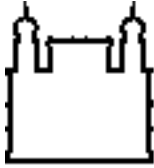
2008

Revoredo Lobo, Amanda

Caracterização das proteínas de superfície Flag e Sup de *Leishmania* potencialmente envolvidas na interação com o vetor./ Amanda Revoredo Lobo. - Rio de Janeiro: 2008.
70 p.; il.

Tese (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2008.

1. *Leishmania chagasi* 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. Gene Flag. 4. Gene Sup



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Amanda Revoredo Lobo

**Caracterização das proteínas de superfície Flag e
Sup de Leishmania potencialmente envolvidas na
interação com o vetor.**

Orientadora: Prof. Dra Yara Maria Traub-Cseko

Aprovada em: 05/05/2008

Examinadores:

Prof. Dra Claudia Masini D'Avila Levy

IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Prof. Dr Mário Alberto Cardoso da Silva Neto

UFRJ

Prof. Dr Ednildo de Alcântara Machado

UFRJ

Rio de Janeiro, 05 de maio de 2008

Às entidades espirituais que me guiam nesta esfera espiritual, auxiliando-me na caminhada da vida. Que me dão força para continuar em frente, sem desanimar, seguindo o pensamento: “De que para cada coisa em nossas vidas há sempre o momento certo para que elas aconteçam e de que nada é por acaso”.

À minha família por ter me proporcionado que eu chegasse até aqui. Cada conquista minha também é deles, que torcem para que eu alce vôos mais longes quanto eu quiser e puder. Aos meus avós, tias, tio, primas, mãe, irmãos, sobrinho e namorado o meu singelo obrigado por fazerem parte desta caminhada comigo.

À Dra Yara Traub-Cseko por estes anos de orientação, por estar sempre disposta a dedicar-me o seu tempo a uma discussão científica e por sua capacidade profissional e intelectual. Uma coisa que com certeza sempre me chama a atenção é a sua memória extraordinária, que sempre me “invejou”.

Ao Dr Antônio Jorge Tempone, conhecido como Tempone ou Temps. Pela grande ajuda na execução desta tese, pelas dicas e olhar crítico. Como não se lembrar de suas histórias sádicas e de sua frase mais famosa: “Te cantei a pedra!”. Deixo aqui a minha admiração ao profissional perspicaz e inteligente e da pessoa conselheira e amiga que és

Ao pessoal do laboratório pela companhia diária, pelas confidências, pelos desabafos, pela ajuda profissional e pessoal e por fim, pelos momentos descontraídos de risos às vezes regados com 200uL de champanhe. Aqui fica a torcida presente embora ausente para o sucesso de cada um de vocês como grandes pesquisadores e para que façam da vida uma ciência e da ciência uma vida.

À Adriana, pela manutenção do insetário e pela grande ajuda na hora de dissecar os famosos “flebs”. Por não reclamar quando tínhamos que chegar cedo em dia de maratona de dissecação, por ficar até tarde contando as *Leishmanias* comigo. Como não lembrar do seu grande feito ao tentar salvar uma cultura de parasitas com 1mL de antibiótico vencido há 11 anos? Se tivesse dado certo seria uma indicação ao premio Nobel das leish.

À Dra Juliana Dutra pela grande ajuda com os experimentos de microscopia, me ajudando até mesmo quase aos 45 min finais do segundo tempo da gravidez e por também ter participado da maratona de dissecação dos flebs.

Ao Felipe Dias por sua dedicação de tempo por ter me ajudado com os experimentos de Ligand Blot.

À Dra Cláudia Levy, por ter aceitado o convite para ser revisora da tese e integrante da banca avaliadora. Pelas correções sugeridas para o melhoramento da tese, pela agilidade durante este processo e por ter se mostrado sempre disponível para o que precisasse.

À turminha do mestrado da biologia parasitária pelas amizades que se formaram durante este período, pelas conversas nos corredores da Fiocruz, pelas informações e apoio mútuo. À turma com mais “chupacabrices” e a mais unida que eu tive.

Às minhas amigas de faculdade, Leandra e Munike, que mesmo distantes por causa da correria do dia a dia, são pessoas lembradas com carinho. Ah, o que seria de nós se não existisse o Orkut!? O bonde do M.A.L ainda vive.

Ao pessoal da sala de lavagem pelos 10 min de bate-papo sobre assuntos diversos. Por se mostrarem sempre dispostos a ajudar e pelo trabalho que eles tiveram pela quantidade de vidraria que eu usava durante o dia.

À todos que não foram citados mas que fizeram parte de mais este ciclo de vida, direta ou indiretamente, através de uma ajuda científica ou até mesmo por um sorriso carinhoso.

Ao órgão financiador CNPq pelo suporte financeiro durante a execução do mestrado e à plataforma de seqüenciamento-PDTIS/FIOCRUZ pela obtenção de sequências que complementaram a tese.

À Fiocruz pelo acolhimento de um ciclo de vida que se começou na iniciação científica e que hoje se finaliza com o mestrado. Aos funcionários que contribuem para que ela seja uma instituição de referência e que zelam por sua manutenção a fim de que ela continue sempre assim: bela!

A leishmaniose visceral é uma doença de alta mortalidade quando não tratada. Aproximadamente 500.000 novos casos ocorrem todo ano, freqüentemente em países pobres e em desenvolvimento. No Brasil, a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania chagasi*, que é transmitida principalmente pelo inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*. Após 72 h de alimentação sanguínea num hospedeiro infectado, parasitas procíclicos são vistos aderidos ao intestino do inseto via flagelo. Esta adesão é vital para a evolução do ciclo de transmissão do parasita. Em vetores espécie-específicos foi proposto um papel para um lipofosfoligano (LPG) de superfície de *Leishmania* na adesão, porém, em vetores permissíveis, tem-se sugerido que esta adesão seja independente de LPG.

Com o interesse de identificar e caracterizar moléculas que possam ter uma participação na interação parasito-vetor, nós iniciamos o estudo de duas moléculas de *L. chagasi* denominadas Flag e Sup, pertencentes à família de proteínas pequenas miristiladas (SMP's), que anteriormente haviam sido implicadas em adesão ao tubo digestivo de flebotomíneos.

Amplificamos e seqüenciamos o gene Flag de *L. chagasi* e observamos por alinhamento múltiplo o alto grau de conservação deste gene entre as espécies de *Leishmania*. Proteínas Flag e Sup recombinantes foram produzidas e utilizadas para produção de anticorpos policlonais em coelhos. Vimos por Western Blot de extrato protéico de várias espécies de *Leishmania*, que os anticorpos monoclonal e policlonal anti-Flag/MBP e o anticorpo policlonal anti-Sup, reconhecem as proteínas em todas as espécies, evidenciando a conservação destas.

A imunolocalização destas proteínas mostrou que a proteína Flag está preferencialmente localizada na forma promastigota na bolsa flagelar e no flagelo, e, em amastigota, na bolsa flagelar e no flagelo interno curto, enquanto que a proteína Sup mostrou localização em toda a superfície do corpo em ambas as formas.

Experimentos de RT-PCR mostraram que há transcrição diferencial de Flag e Sup quando comparamos entre as formas evolutivas amastigotas e promastigotas. Flag tem uma expressão parecida nas duas formas evolutivas enquanto Sup é mais expresso em amastigotas.

Ensaio de inibição ex-vivo incubando previamente *L. chagasi* com anticorpo monoclonal anti-Flag ou policlonal anti-Sup, mostrou redução significativa de parasitas aderidos ao intestino de *L. longipalpis*.

Na tentativa de identificar um potencial receptor para o parasita no intestino de *L. longipalpis*, observamos a marcação de uma proteína de 27 kDa no extrato protéico do vetor utilizando parasita biotinilado em experimentos de "ligand blot".

Visceral leishmaniasis is an illness of high mortality if not treated. Approximately 500,000 new cases occur per year, frequently in poor countries. In Brazil, visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania chagasi*, transmitted by the insect vector *Lutzomyia longipalpis*. After 72h of blood feeding in an infected host, procyclic parasites are seen adhered to insect gut by the flagellum. This adhesion is vital for the completion of the parasite cycle of transmission. In species-specific vectors a role for a surface lipophosphoglycan (LPG) of *Leishmania* in the adhesion has been considered, while in the permissible vectors, this adhesion may be independent of LPG.

Aiming to identify and characterize molecules that may be involved in the parasite-vector interaction, we initiated a study of two molecules of *L. chagasi*, Flag and Sup, which belong to the small myristylated protein family (SMP's), that have previously been implicated in adhesion to the sandfly midgut.

We amplified and sequenced the Flag gene of *L. chagasi* and, using multiple alignments, observed a high degree of conservation of this gene among *Leishmania* species. Recombinant protein Flag and Sup were produced and used for polyclonal antibodies production in rabbits. By Western Blot of total protein extract of some species of *Leishmania*, we observed that the anti-Flag monoclonal and polyclonal antibodies and the anti-Sup polyclonal antibody, recognized proteins in all the analyzed species, evidencing their conservation.

Immunolocalization of these proteins showed that Flag is preferentially located in the flagellar pocket and flagellum in the promastigote form and in the flagellar pocket and internalized short flagellum in the amastigote, while Sup showed localization on the cell surface in both forms.

Experiments of RT-PCR showed that there is a differential transcription of Flag and Sup between amastigotes and promastigotes. Flag has similar levels of expression in both evolutive forms while Sup is more expressed in amastigotes.

Assays of ex-vivo inhibition with *L. chagasi* previously incubated with monoclonal antibodies anti-Flag or anti-Sup showed a significant reduction of the number of adhered parasites to the *L. longipalpis* midgut.

In an attempt to identify a potential receptor for the parasite in the intestine of *L. longipalpis*, we observed the labelling of a protein of 27 kDa in the protein extract of the vector using biotinylated parasites in experiments of "ligand blot".

BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DAPC	Ácido D-amino-ciclopentano-carboxílico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno-diaminotetracético
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
gDNA	Ácido desoxirribonucléico genômico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HOAc	Ácido acético
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de Cálcio
Lac Z	Gene que codifica a enzima β -galactosidase
LB	Meio de cultivo Luria-Bertani líquido
LB agar	Meio de cultivo Luria-Bertani sólido
LiCl	Cloreto de Lítio
LL5	Linhagem celular de <i>L. longipalpis</i>
LPG	Lipofosfoglicano
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
OD _{λ}	Densidade ótica no comprimento de onda (λ) especificado em nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno Glicol
v/v	Volume/volume
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Meio desenvolvido por Instituto Roswell Park Memorial
RT-PCR	PCR com transcrição reversa
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SFBi	Soro fetal bovino inativado
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris-borato EDTA
TBS	Salina tamponada com Tris
Tris-HCl	Tris- Ácido Clorídico
Tween-20	Polioxietileno (20) sorbitam monolaurato
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
2XYT	Meio de cultura de triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 - Iniciadores de PCR com suas respectivas sequências e sítios de restrição	15
Tabela 4.1 - Média e desvio padrão de intensidade de produtos de RT-PCR e fator de correção para padrão de gene constitutivo	39

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Evolução do número de casos confirmados e óbitos de LT	2
Figura 1.2 - Evolução do número de casos confirmados e óbitos de LV	3
Figura 1.3 - Ilustração esquemática das formas amastigota e promastigota de <i>Leishmania</i>	4
Figura 1.4 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	6
Figura 1.5 - <i>Lutzomyia longipalpis</i>	7
Figura 3.1 - Vetor de clonagem de fragmentos de PCR pGEM-T Easy	17
Figura 3.2 - Vetor de expressão pMAL.	20
Figura 4.1 - Amplificação do gene Flag de <i>L. chagasi</i> por PCR	31
Figura 4.2 - Seqüência codificante do gene Flag de <i>L. chagasi</i>	32
Figura 4.3 - Comparação da seqüência de Flag nos tripanosomatídeos.	33
Figura 4.4 - Digestão de LcFlag clonado em pGEM-T Easy com as enzimas BAMHI e HindIII.	34
Figura 4.5 - PCR de colônia.	35
Figura 4.6 - Gel de SDS-PAGE mostrando a indução da proteína de fusão Flag/MBP	36
Figura 4.7 - Comparação da expressão da proteína de fusão Flag/MBP e MBP	37
Figura 4.8 - Purificação da proteína de fusão Flag/MBP e MBP	38
Figura 4.9 - Géis de poliacrilamida de proteínas induzidas usadas para imunizações em coelhos	39
Figura 4.10 - Dot Blot para testar a reatividade dos anticorpos contra as proteínas recombinantes disponíveis	40
Figura 4.11 - Transferência e Western blot de extrato protéico total de diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	41
Figura 4.12 - Alinhamento dos genes Flag e Sup de <i>L. infantum</i> , indicando as regiões onde os iniciadores Lp_F, LpFlag_R e LpSup_R anelam	42
Figura 4.13 - RT-PCR de Flag e Sup	44

Figura 4.14 - Intensidade normalizada dos produtos amplificados em função do cDNA utilizado	45
Figura 4.15 - Imunofluorescência indireta de <i>Leishmania</i> localizando Flag e SuP	47,48,49,50
Figura 4.16 - Ligação de parasitas <i>L. chagasi</i> ao intestino de <i>L. longipalpis</i> , testando 2 períodos de incubação: 25 min e 45 min	51
Figura 4.17 - Inibição da ligação ex-vivo	52
Figura 4.18 - Ligand Blot de proteínas do intestino de <i>L. longipalpis</i> com parasita biotilado	53
Figura 4.19 - Resultado do experimento de Pull Down em gel de SDS-PAGE corado pela prata	54

1 – Introdução

1.1 - <i>Leishmaniose</i>	1
1.2 - O parasito <i>Leishmania</i>	3
1.21 - Formas evolutivas do parasito	4
1.22 - O flagelo e a bolsa flagelar	4
1.23 - Ciclo de vida	5
1.3 - O vetor Flebotomíneo	6
1.4 - Interação parasito-vetor	7

2 – Objetivos

2.1 – Objetivos gerais	13
2.2 – Objetivos específicos	13

3 – Metodologia

3.1 - Cultura de parasito	14
3.2 - Cultura da forma amastigota de <i>L. pifanoi</i> .	14
3.3 - Cultura de células LL5	14
3.4 - Insetos	14
3.5 - Extração de DNA total de <i>Leishmania</i> e quantificação	14
3.6 - Iniciadores	15
3.7 - PCR para amplificar Flag a partir de gDNA de <i>L. chagasi</i>	15
3.8 - Eletroforese de DNA e Purificação do produto amplificado do gel	16
3.9 - Clonagem do produto amplificado no vetor pGEM-T Easy	16
3.10 - Preparo de células competentes DH5 α e BL21	17
3.11 - Transformação, Boil (STET) Mini-Prep e precipitação por PEG.	18
3.12 - Sequenciamento	19
3.13 - Análise de Bioinformática	19
3.14 - Digestão Enzimática do DNA plasmidial	19
3.15 - Desfosforilacção do vetor pMAL digerido	20
3.16 - Clonagem do inserto purificado LcFlag no vetor de expressão pMAL	20
3.17 - PCR de colônia	21
3.18 - Expressão de proteínas	21
3.19 - Purificação por coluna de maltose da proteína de fusão LcFlag/MBP e MBP	22
3.20 - Imunização e produção de anticorpos policlonais anti-Flag/MBP e anti-MBP	23
3.21 - Dot Blot dos anticorpos disponíveis	23
3.22 - Origem da proteína recombinante Sup e dos anticorpos	24
3.23 - Extrato protéico de <i>Leishmania</i>	24
3.24 - Eletroforese de proteínas de <i>Leishmania</i> e Western blot.	24
3.25 - Extração de RNA total das formas amastigotas e procíclicas de <i>Leishmania</i> e quantificação	25
3.26 - RT-PCR dos transcritos dos genes Flag e Sup	25
3.27 - Análise de intensidade de produtos de PCR	26

3.28 – Localização por imunofluorescência das proteínas Flag e SUP de <i>Leishmania</i> .	27
3.29 – Ensaio de interação de <i>L. chagasi</i> ao intestino médio do flebotomíneo com os anticorpos monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup	27
3.30 - Biotinilação das proteínas da superfície do parasita	28
3.31 - Extrato protéico do intestino de <i>L. longipalpis</i> para experimento de Ligand Blot	28
3.32 - “Ligand Blot” de proteínas do intestino de <i>L. longipalpis</i> com parasitas vivos biotinilados	28
3.33 - Preparo das proteínas recombinantes e acoplamento na resina para o experimento de “Pull Down”	29
3.34 - Pull Down de extrato protéico de células LL5 com as proteínas conjugadas em sefarose e SDS-PAGE	29

4 – Resultados

4.1 - Amplificação e Sequenciamento do gene Flag de <i>L. chagasi</i> .	31
4.2 - Análise da sequência de Flag de <i>L. chagasi</i>	32
4.3 - Subclonagem do fragmento LcFlag clonado em pGEM-T Easy no vetor de expressão pMAL	33
4.4 - Indução e purificação da proteína fusão LcFlag/MBP e da MBP	35
4.5 - Produção dos anticorpos anti-proteína de fusão Flag/MBP e anti-MBP	38
4.6 - Dot Blot para testar a reatividade dos anticorpos monoclonal anti-Flag, policlonal anti-Flag/MBP, anti-Sup e anti-MBP	39
4.7 - Expressão de Flag e Sup em várias espécies de <i>Leishmania</i>	40
4.8 - Desenho dos iniciadores que diferenciam Flag e Sup para RT-PCR	42
4.9 - Expressão diferencial de Sup e Flag	42
4.10 - Quantificação da expressão dos transcrito Flag e Sup	44
4.11 - Localização celular de Flag e Sup nas formas procíclicas e amastigota das <i>Leishmanias</i>	45
4.12 - Anticorpos monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup inibem a ligação de <i>L. chagasi</i> ao intestino médio de <i>L. longipalpis</i> .	51
4.13 - Identificação de uma proteína do intestino que se liga ao parasita biotinilado	53
4.14 - “Pull Down” de extrato protéico de células embrionárias de <i>L. longipalpis</i> (LL5)	54

5 – Discussão 55

6 – Referências bibliográficas 64

1.1) *Leishmaniose*

Leishmanioses são um problema de saúde pública que atinge o Brasil e outros países do mundo. Mais de 12 milhões de pessoas em 88 países, sendo 22 do Novo Mundo e 66 do Velho Mundo, apresentam leishmaniose e 2 milhões de novos casos surgem por ano (WHO, 2005). As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, tendo uma ligação complexa e forte com a pobreza. A dificuldade de acesso ao sistema de saúde atrasa o diagnóstico e o tratamento apropriado, acentuando a morbidade e a mortalidade (Alvar et al., 2006).

As leishmanioses são doenças causadas pela picada do inseto-vetor fêmea (flebotomíneo) infectada com o protozoário do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), que inocula as formas infectivas durante o seu repasto sanguíneo. Mais de 20 espécies de *Leishmania* podem infectar humanos e sabe-se que aproximadamente 50 espécies do inseto-vetor podem estar envolvidas na transmissão da doença (WHO, 2005).

A ocorrência da doença numa determinada área está relacionada com a presença de um vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. Nestas áreas, o hospedeiro reservatório animal, silvestre ou doméstico está envolvido no ciclo de transmissão zoonótico (Gontijo et al., 2004; WHO, 2005).

As leishmanioses podem resultar em duas principais formas da doença, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral, determinadas pela espécie de *Leishmania* e pelos fatores do hospedeiro em relação à susceptibilidade e expressão da doença. A leishmaniose tegumentar americana é caracterizada por lesões cutâneas que, sem tratamento, podem espalhar-se para outras partes da pele (leishmaniose cutânea–difusa), mucosas do nariz ou boca e causar ulcerações (leishmaniose muco-cutânea). Já a leishmaniose visceral americana, causada por espécies viscerotrópicas que migram através do sistema retículo-endotelial, caracteriza-se pelo aumento do baço ou fígado e, se não tratada, pode levar ao óbito (Murray et al., 2005).

A leishmaniose visceral é uma doença que ocorre mundialmente, onde 90% dos casos humanos registrados ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil (OMS, 2005). No Brasil, a leishmaniose visceral americana é causada pela

Leishmania chagasi (Cunha & Chagas, 1937), transmitida principalmente pela espécie-vetor *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912).

Existe uma polêmica em torno da origem da leishmaniose visceral no Novo Mundo. Alguns autores acreditam que ela foi introduzida recentemente na época da colonização européia, sendo causada pela espécie *Leishmania infantum*. Enquanto outros, preconizam que a doença estava presente antes da chegada dos colonizadores europeus e até mesmo antes da separação do continente americano da África, sendo causada pela espécie *L. chagasi* (Mauricio et al., 2000; Gontijo et al., 2004; Dantas-Torres, 2006). Alguns autores tem usado nomes sub-específicos para *L. infantum infantum* e *L. infantum chagasi*, visto que existem diferenças entre os dois organismos (Lainson et al., 2005).

A leishmaniose tegumentar (LT) está presente em todos os estados brasileiros, principalmente em zonas rurais, tendo maior número de casos nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Enquanto que a leishmaniose visceral (LV) atinge 19 estados brasileiros, sendo 70% dos casos na região Nordeste. Atualmente, a doença tem sido transmitida também nas capitais do Sudeste e do Centro-Oeste em Araçatuba e Belo Horizonte (Funasa, 2002). As figuras 1.1 e 1.2 apresentam uma avaliação história de 1980 a 2005, onde se observa a expansão da doença no Brasil dos casos de LT e LV (Fonte:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos>).

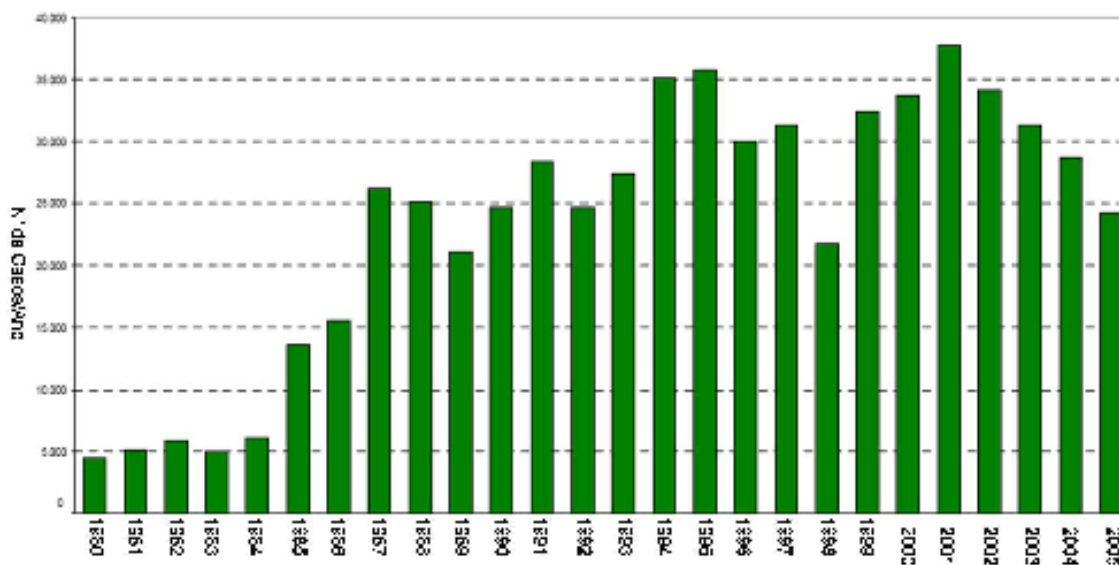


Figura 1.1: Evolução dos números de casos de LT confirmados. Fonte: SVS

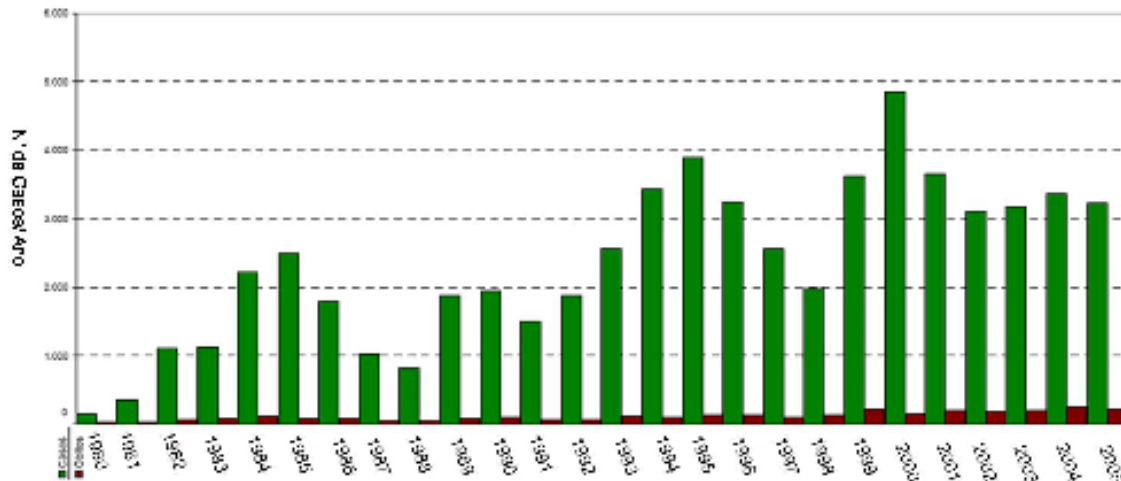


Figura 1.2: Evolução do número de casos confirmados de LV. Fonte: SVS

Alguns fatores podem contribuir para as mudanças no perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no país, como: fluxo migratório, introdução de hospedeiros infectados em áreas onde o vetor está presente; desmatamento e alterações no ecossistema provocados pelo homem, que força a saída do vetor e do reservatório animal com hábitos silvestres para o ambiente doméstico. Além dos fatores citados, a susceptibilidade do hospedeiro relacionado à desnutrição, imunossupressão e transplante de órgãos, facilitam o desenvolvimento da doença (Lindoso et al., 2006). Por exemplo, tem-se relatado um aumento de casos de pacientes com infecção mista com HIV e *Leishmania*, o que causa um agravamento do quadro clínico da leishmaniose (Gontijo et al., 2004).

1.2) O parasito *Leishmania*

Leishmania são protozoários patogênicos da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A ordem Kinetoplastida caracteriza-se por apresentar uma mitocôndria única (cinetoplasto) que contém kDNA (DNA) composto por maxicírculos e minicírculos, com os minicírculos representando 95% da massa de kDNA (Simpson, 1987).

1.21) Formas evolutivas do parasito

O flagelado *Leishmania* pode apresentar-se sob diversas formas evolutivas. No hospedeiro vertebrado o parasita vive dentro do sistema fagolisosomal dos macrófagos e apresenta-se na forma amastigota, arredondada e com um flagelo curto interno limitado na bolsa flagelar (Hoare & Wallace, 1966). No hospedeiro invertebrado, apresenta-se na forma promastigota procíclica, alongada e dotada de flagelo, que se desenvolve no intestino do inseto (Molyneux, 1977) (Figura 1.3); e também na forma promastigota metacíclica, infectiva, onde a célula é ainda mais alongada e com um flagelo duas vezes maior que o tamanho do corpo (Sacks & Perkins, 1984).



Figura 1.3: Ilustração esquemática das formas amastigota e promastigota de *Leishmania*. Fonte: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/ht mL/morfologia.htm>

1.22) O flagelo e a bolsa flagelar

O flagelo e a bolsa flagelar da *Leishmania* são organelas com características peculiares. A membrana do flagelo e da bolsa flagelar são extensões da membrana plasmática celular, mas são considerados como compartimentos celulares distintos, uma vez que estes 3 domínios diferem na função e na composição lipídica e protéica. O flagelo da *Leishmania* compartilha características comuns com outros flagelos, como a presença de um axonema clássico com 9 pares de microtúbulos periféricos e 2 microtúbulos centrais, mas também exibe uma rara estrutura, o bastão paraflagelar (PFR). Este bastão é constituído de filamentos discretos ao longo do flagelo que se liga ao axonema e experimentos com mutantes PFR, têm

mostrado o papel desta estrutura na motilidade dos tripanosomatídeos. O flagelo deste parasita está primariamente relacionado com a motilidade e, além disto, está envolvido em outras atividades biológicas, como a adesão ao epitélio intestinal do hospedeiro invertebrado, funções sensoriais e de reconhecimento. Os tripanosomatídeos possuem um único flagelo que emerge da bolsa flagelar, que é uma invaginação especializada da membrana plasmática, especializada na secreção de proteínas para o meio extracelular, na endocitose de nutrientes e na integração das proteínas de membrana na superfície celular (Bastin et al., 2000; Landfear et al., 2001).

1.23) Ciclo de vida

O parasito *Leishmania* necessita do inseto flebotomíneo para completar o seu ciclo de vida e se propagar. O flebotomíneo ao picar um homem ou animal infectado (Figura 1.4), adquire as formas amastigotas do parasita. O bolo alimentar infectivo passa para o intestino médio do inseto, onde é envolvido por uma matriz peritrófica do tipo I formada por quitina e proteínas. Ainda dentro da matriz, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas dentro das 12-18 horas iniciais. Estes promastigotas sofrem intensa multiplicação e, entre 60 a 72 horas após o repasto sanguíneo, evadem a matriz peritrófica pela região anterior. Neste momento, podem ser encontrados na porção anterior do intestino médio muitos parasitas ligados, via flagelo, às microvilosidades das células intestinais. No 7^o dia a passagem do bolo alimentar digerido está completa, e na válvula estomodeal e na cárdia há um acúmulo de promastigotas metacíclicos que migraram para estas porções anteriores após a metaciclogênese.

A infecção no hospedeiro é iniciada com a inoculação de promastigotas metacíclicos durante a hematofagia. O acúmulo de promastigotas metacíclicos na porção anterior do intestino, válvula estomodeal e cárdia, é acompanhado pela formação de uma estrutura semelhante a um gel, composto por filamentos de proteofosfoglicano (fPPG). O fPPG é uma glicoproteína semelhante à mucina de mamífero, secretada via bolsa flagelar que dificulta a ingestão de sangue. Numa

tentativa de desalojar esta estrutura semelhante a gel do aparato alimentar, o inseto regurgita promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (Ilg, 2000; Rogers et al., 2004; Kamhawi, 2006). Estas formas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos, onde se diferenciam em formas amastigotas com intensa multiplicação celular. A manutenção da infecção no hospedeiro ocorre em consequência da ruptura das células infectadas (Walters et al., 1989 ;Sacks e kamhawi, 2001; Soares et al., 2003; Kamhawi, 2006).

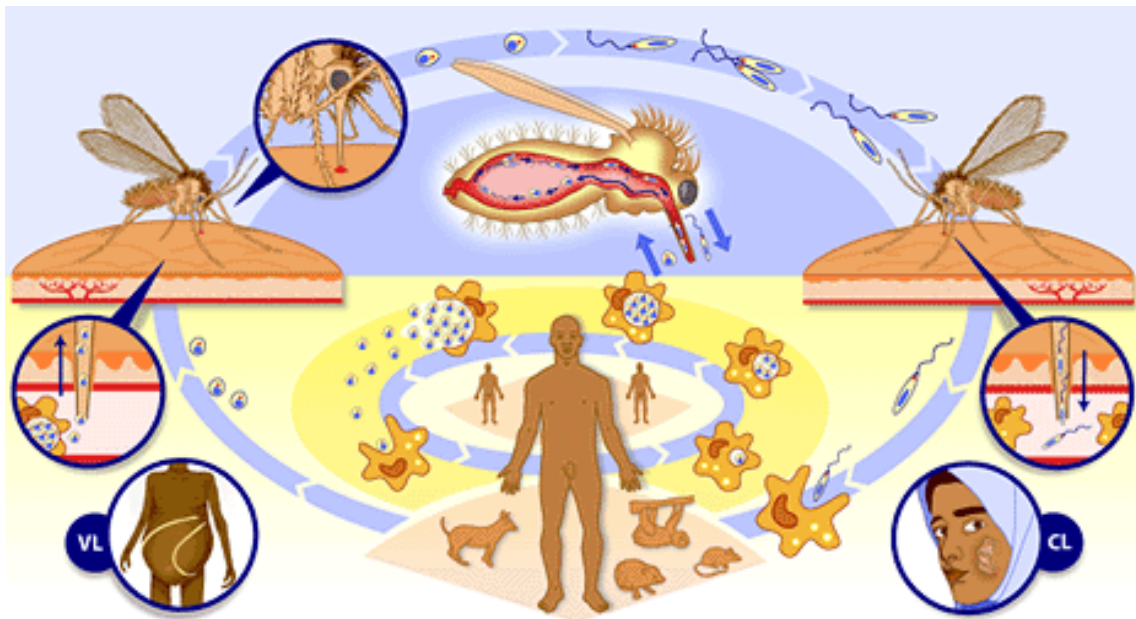


Figura 1.4: Ciclo de vida da *Leishmania*. Fonte: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>

1.3) O vetor flebotomíneo

Os vetores de todas as espécies de *Leishmania* pertencem à família Psychodidae e à sub-família Phlebotominae. Como integrantes da ordem díptera são holometábolos, passando pela fase de ovo para os estágios de larva e pupa até chegarem a adultos. As fêmeas possuem um hábito hematofágico necessário para ovoposição, um corpo delgado e as pernas longas e delgadas (Figura 1.5). No ambiente natural, as larvas alimentam-se de matéria orgânica do solo, enquanto os adultos de ambos os sexos podem alimentar-se do néctar de plantas como fonte de

açúcar. Acredita-se que a ingestão de carboidrato pela fêmea seja importante na transmissão de *Leishmania*, afetando o seu desenvolvimento e transmissão (Brazil & Brazil, 2003; Soares e Turco, 2003).



Figura 1.5: *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: <http://www.micromacro.co.uk/science/html/parasitology/sc3008.htm>.

Em países do Novo Mundo a transmissão da leishmaniose se dá pelo inseto-vetor do gênero *Lutzomyia*, enquanto que no Velho Mundo o gênero *Phlebotomus* é o responsável.

L. longipalpis é considerado um complexo de espécies. Barreiras geográficas e climáticas são responsáveis por manter as populações isoladas, uma vez que a migração pelo vôo é limitada. Estima-se que a taxa de vôo do gênero *Lutzomyia* não exceda 100 metros num período de 24 hs. Este isolamento pode conduzir a um direcionamento genético e/ou a uma pressão da seleção natural dependendo do habitat local (Soares et al., 2003; Maingon et al., 2007).

1.4) Interação parasito-vetor

Flebotomíneos freqüentemente exibem especificidade para as espécies de *Leishmania* que transmitem na natureza. Alguns fatores que determinam a competência vetorial do inseto estão relacionados com a capacidade do parasita de: sobreviver às enzimas digestivas e à sua habilidade de inibir ou retardar os picos de atividade destas enzimas; de escapar da matriz peritrófica pela ação das quitinases secretadas pelo parasita e pelo inseto; aderir-se às microvilosidades do intestino

evitando sua excreção junto com o bolo alimentar (Sacks et al., 2001 ; Sacks e Kamhawi, 2001; Kamhawi, 2006). Tem-se mostrado que a *L. longipalpis* é muito permissível, sendo facilmente infectada por várias espécies de *Leishmania* (Sacks et al., 2001; Soares et al., 2003; Pinto-da-Silva et al., 2005).

Uma série de estudos tem investigado o papel do lipofosfoglicano (LPG) na adesão da *Leishmania* ao intestino do vetor, promovendo sua permanência no intestino do inseto durante a excreção do bolo alimentar digerido (Pimenta et al., 1992; Kamhawi et al., 2000). LPG é um glicoconjugado presente em toda a superfície de promastigotas, inclusive no flagelo, e está organizado como um glicocálix densamente filamentosos. Esta molécula consiste de uma âncora GPI, um núcleo glicano conservada e um esqueleto com múltiplas unidades repetidas de Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ seguida por uma cap terminal. Diferenças interespecíficas foram observadas por variações nos açúcares das ramificações nas unidades repetidas do esqueleto conservado de Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄ e nos oligossacarídeos da estrutura cap (Sacks et al., 2001; Soares et al., 2003). Uma importante evidência da participação do LPG na adesão foi demonstrada com o uso de mutantes de *Leishmania donovani* e *Leishmania major* defectivos em LPG, que foram incapazes de se ligarem e sustentarem a infecção no intestino dos seus respectivos vetores, *Phlebotomus argentipes* e *Phlebotomus papatasi*, após a excreção do bolo alimentar sanguíneo (Butcher et al., 1996; Sacks et al., 2000; Sacks et al., 2001)

O polimorfismo estrutural de LPG reflete uma heterogeneidade de receptores no intestino de diferentes espécies de flebotomíneo. A alta complexidade da estrutura de LPG é encontrada em leishmanias que naturalmente infectam vetores restritos, enquanto LPG dos parasitas que naturalmente infectam vetores permissíveis são relativamente simples. Esta correlação sugere que polimorfismos no LPG são direcionados pela complexidade e especificidade dos receptores do intestino (Sacks et al., 2001; Kamhawi, 2006)

Promastigotas procíclicos de cultura em fase logarítmica ligam-se no intestino de seus vetores apropriados enquanto promastigotas metacíclicos, resgatados de cultura de fase estacionária, perdem esta capacidade (Pimenta et al., 1994; Sacks et

al., 1984) A perda desta capacidade tem sido atribuída a modificações bioquímicas no LPG ocorridas durante a metaciclogênese, controlando assim a adesão estágio-específico ao intestino. Estas modificações resultam no mascaramento dos resíduos de açúcares envolvidos na ligação ao intestino e no alongamento da molécula de LPG (Sacks et al., 2001; Kamhawi, 2006).

Em *L. chagasi*, o LPG de promastigota procíclico consiste de resíduos de β 1-3 glicose nas cadeias laterais das unidades repetidas e no cap, enquanto que em promastigota metacíclico é observada uma baixa regulação nestas substituições de glicose nas cadeias laterais, além de um aumento no tamanho das unidades repetidas (Soares et al., 2002).

Algumas publicações têm reportado a capacidade de moléculas de lectina ou similares a ela, de aglutinar *Leishmanias* (Jacobson, 1982; Svobodová et al., 1996; Andrade et al., 1999). Uma lectina de *Phlebotomus duboscqi* foi purificada e caracterizada por cromatografia líquida e SDS/PAGE como uma proteína de 42kDa-44kDa. Usando IgG anti-lectina, obtida a partir de imunização de coelho com suspensão de eritrócito aglutinado com lisado de intestino de *P. duboscqui*, foi observada presença de lectina no lúmen e ao longo da superfície microvilar das células epiteliais do intestino. (Volf, Skarupová e Man, 2002).

No intestino médio de *L. longipalpis*, alimentado com sangue ou frutose, durante e após a digestão, foi reportada a localização histoquímica de N-acetil-galactosamina presente nas microvilosidades utilizando lectina conjugada a ouro (Evangelista e Leite, 2002).

No intestino de *P. papatasi* foi identificado a expressão de uma galectina (PpGalec), pertencente à família das lectinas, que se liga a β -galactosídeos. As galectinas são moléculas multifuncionais importantes no desenvolvimento, homeostases e regulação da imunidade. Foi demonstrado que PpGalec funciona como receptor para a unidade repetida do LPG de procíclicos de *L. major*, que tem cadeias laterais do tipo β 1-3. Isto foi baseado nas seguintes evidências: aumento da expressão de PpGalec em fêmeas adultas e sua restrição ao intestino; expressão restrita em espécies que transmitem *L. major* na natureza, *P. papatasi* e *Phlebotomus dubosqui* (espécies irmãs pertencentes ao sub-gênero *Phlebotomus*); inibição da adesão de promastigotas de *L. major* ao intestino (ex-vivo) de *P. papatasi*

usando anticorpos anti-PpGalec; diminuição da taxa de sobrevivência da *Leishmania* no intestino de *P. papatasi*, quando alimentado com sangue contendo promastigotas de *L. major* e anticorpos anti-PpGalec (Kamhawi et al., 2004; Beverley et al., 2004).

É possível que LPG não seja a única estrutura responsável pela adesão do parasito ao intestino do vetor. Evidências mostram que nos vetores espécie-específicos o desenvolvimento do parasita é mediado pela molécula de LPG e por lectinas no inseto, contudo, nos vetores permissíveis, esta interação parece não ser dependente da molécula de LPG (Volf & Myskova, 2007). Myskova e colaboradores em 2007, demonstraram por experimento *in vivo* que o LPG não é requerido para adesão ou sobrevivência de *L. major* mutante em LPG, em flebotomíneos permissíveis como *L. longipalpis* e *P. arabicus*. Foi observado que o parasita deficiente em LPG foi capaz de se ligar aos intestinos dos vetores permissíveis e que, uma grande porcentagem dos insetos tinha uma alta carga parasitária. Como a adesão da *Leishmania* ao intestino do flebótomo ocorre pela inserção do flagelo entre as microvilosidades (Killick-Kendrick, Molyneux & Ashford, 1974), pode existir alguma molécula, estrutura ou mecanismo no flagelo, que justifique a interação com as células intestinais do vetor apenas por esta organela.

Ismach e colaboradores em 1989 identificaram 2 componentes específicos do flagelo a partir de anticorpos monoclonais desenvolvidos contra frações enriquecidas do flagelo de promastigotas de *Leishmania braziliensis*. O primeiro está associado a uma molécula do bastão paraxial e o segundo com a membrana flagelar. Este segundo componente foi caracterizado como uma proteína de 13,2kDa distribuída por todo o flagelo, com uma discreta concentração na bolsa flagelar. Por imunofluorescência indireta observou-se que o anticorpo monoclonal específico da membrana flagelar reconhecia esta proteína em outras espécies de *Leishmania*, como *L. major* e *Leishmania amazonensis* e em *Endotrypanum schaudinni*, uma espécie pertencente também à ordem Kinetoplastidae.

Warburg e colaboradores em 1989 mostraram por imunofluorescência, empregando anticorpos monoclonais específicos para o bastão paraxial, que *L. major* e *Leishmania panamensis* aderem quase que exclusivamente pelo flagelo a seções do intestino de *P. papatasi*. Mostraram também uma inibição de 42% da

adesão flagelar de *L. major*, previamente incubado com o anticorpo monoclonal para a proteína flagelar, às seções do intestino de *P. papatasi*. Esta proteína foi denominada FLAG, caracterizada, purificada e parcialmente seqüenciada por Rojas (1997). Uma vez que pouco se sabe sobre a interação de *L. chagasi* com *L. longipalpis*, nosso laboratório iniciou um estudo sobre Flag como um possível responsável por esta interação.

O trabalho de tese de mestrado de Luanda Nascimento realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos e Flebotomíneos, visou a clonagem do gene e expressão da proteína Flag de *L. amazonensis*. Em 2004, Tull et al., publicaram um artigo com a identificação de uma nova família de proteínas pequenas e miristiladas (SMP, do inglês: small myristoylated proteins), bastante conservadas em seqüência, que estão presentes nas espécies de *Leishmania* e tripanosomatídeos parasitas. Uma destas proteínas, nomeada SMP-1, é uma proteína de membrana diacilada direcionada para o flagelo cuja localização não depende de interações com estruturas do axonema ou proteínas do citoesqueleto do flagelo. A seqüência de SMP-1 descrita por Tull et al. em 2004, é a mesma obtida por Rojas (1997) que na ocasião nomeou-a de Flag. Um anticorpo policlonal obtido a partir do peptídeo C-terminal de SMP-1 de *L. major* mostrou, por Western blot que SMP-1 é expressa em promastigotas de *L. major* obtidas de culturas de fase log e estacionária e encontra-se ausente em amastigotas derivadas de lesão. E por imunofluorescência, utilizando o anticorpo policlonal, observou-se marcação no flagelo de *L. mexicana* e *L. donovani*, resultado já visto por Ismach et al. em 1989 utilizando o anticorpo monoclonal.

Estes autores (Tull et al., 2004) observaram também que sinais de miristilação e palmitilação nas posições Gly-2 e Cys-3 são essenciais para o endereçamento flagelar a partir da construção de dois mutantes SMP-1 que tiveram seu direcionamento para o citosol.

Comparando a seqüência de aminoácidos de SMP-1 (Flag) publicada no trabalho de Tull et al. (2004), com a seqüência caracterizada em nosso laboratório, foi visto que esta seqüência apresentava uma alta similaridade com a seqüência de SMP-1, porém não era Flag. Observou-se a presença de uma glicina N-terminal na

nossa sequência, que é um provável sinal de miristilação, que a faz pertencer à família das SMPs. Além disto, observamos que o anticorpo policlonal obtido contra a proteína recombinante, marcava a superfície do parasita e não o flagelo e por esta razão a proteína foi chamada Sup (superfície). Estudo sobre o possível papel de Sup na interação parasita-vetor ainda permanece em aberto.

2.1 - Objetivos Gerais

Um dos objetivos do nosso laboratório é identificar e caracterizar moléculas envolvidas no processo de alimentação sanguínea e infecção por *Leishmania* em *L. longipalpis*. O presente projeto tem como objetivo caracterizar as proteínas de superfície Flag e Sup de *Leishmania* e sua participação na adesão ao tubo digestivo de *L. longipalpis*.

2.2 – Objetivos específicos

- Amplificar e seqüenciar o gene Flag de *L. chagasi*
- Produzir anticorpos e testar a reatividade
- Avaliar a presença de Flag e Sup em diferentes espécies de *Leishmania*
- Imunolocalizar as proteínas Flag e Sup nas formas amastigotas e procíclicas de *L. chagasi*
- Avaliar a expressão dos genes Flag e Sup em amastigotas e procíclicos
- Avaliar a inibição da interação de *Leishmania* ao intestino do inseto usando anticorpo monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup
- Identificar potenciais receptores de proteínas para *L. chagasi* presentes no intestino de *L. longipalpis*

3.1) Cultura de parasito

Promastigotas de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), *Leishmania pifanoi* (MHOM/VE/1975/LL1), *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1967/PH8), *Leishmania major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH), *Leishmania mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21) e *Leishmania donovani* (MHOM/ET/1967/HU3) obtidas da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% SFBi à 25°C

3.2) Cultura da forma amastigota de *L. pifanoi*.

Uma cultura de promastigota procíclico de *L. pifanoi* foi passada para meio F29 suplementado com 10% de SFB a 31°C para amastigogênese. As formas amastigotas foram mantidas neste meio, a esta temperatura.

3.3) Cultura de células LL5

Células embrionárias de *L. longipalpis*, LL5, foram mantidas em meio L15 (Sigma) à 25°C.

3.4) Insetos

Os insetos *L. longipalpis* foram capturados no parque da Gruta da Lapinha, Minas Gerais, e mantidos em insetário para a obtenção da 1ª geração (F1) a ser utilizada nos experimentos. Após a eclosão, os insetos foram alimentados com solução de açúcar 30%-50% ou em hamster anestesiado com injeção intramuscular de 300 µL de Quetamina 10% (Francotar, Virbac do Brasil). A obtenção de insetos adultos e a colonização em laboratório seguem o protocolo descrito por Brazil e Brazil, 2003.

3.5) Extração de DNA total de *Leishmania* e quantificação

Extração de DNA foi realizada a partir de uma cultura de parasitos em fase exponencial. Os parasitos foram lavados 3 vezes com PBS e centrifugados a 4000 x rpm por 10 min a 4°C. Uma concentração de 5×10^7 promastigotas foi ressuspensa em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, 2,5M LiCl, 4% Triton X-100, pH

8.5) e o tubo invertido várias vezes até a lise completa das células. Após a incubação da amostra por 5 min a TA, foram adicionados 150 µL de fenol:clorofórmio (1:1, v/v), seguido por repetidas inversões do tubo durante 5 min. A fase aquosa foi separada por centrifugação a 14000 x g por 5 min e misturada com 300 µL de etanol absoluto. A amostra foi centrifugada a 14000 x g por 10 min e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. Após a evaporação do etanol na estufa a 37°C, o DNA foi ressuspensionado em água milliQ.

Para a quantificação do DNA, um volume da amostra foi diluído em água e a absorbância medida em espectrofotômetro num comprimento de onda (λ) de 260nm. A concentração do DNA foi calculada utilizando a fórmula: λ . 50 µg / mL. Fator de diluição.

3.6) Iniciadores

Os iniciadores construídos durante a tese (Tabela 3.1) foram sintetizados pela empresa Bioneer, representada pela Sinapse no Brasil, e foram construídos baseados em sequências disponíveis no GenBank.

Iniciador	Seqüência	Sítio de restrição
FlagBam_F	<u>GGA TCC</u> GGC TGC GGT GCT TCT TCT	Bam HI
FlagMarcel_R	AAG <u>CTT CTT</u> TTC CTT CTC CGC CTG	Hind III
Lp_F	TAC AAC GAC ACG ACG CAG TAC	-
LpFlag_R	GTT CAC GCG GCC CTC AAT G	-
LpSup_R	ACT GCC GCT GCC GTC GCT CAT G	-
LeishActin_F	GTC GTC GAT AAA GCC GAA GGT GGT T	-
LeishActin_R	TTG GGC CAG ACT CGT CGT ACT CGC T	-

Tabela 3.1: Iniciadores de PCR com suas respectivas seqüências e sítios de restrição.

3.7) PCR para amplificar Flag a partir de gDNA de *L. chagasi*

Para a amplificação de Flag por PCR foram usados os componentes do Kit da Promega “GoTaq® Flexi DNA Polymerase”: 1x de tampão GoTaq Flex; 0,12 mM de mix de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,4 mM de cada iniciador: FlagBam_F e FlagMarcel_R; 0,75 U/µL de GoTaq Flexi DNA polymerase ; 50-100 ng

de DNA de *L. chagasi*, 1,5 mM de MgCl₂ e H₂O para um volume final de 25 µL de reação. O programa usado para amplificação foi:

- **94°C ⇔ 3min**
 - **94°C ⇔ 30seg**
 - **55°C ⇔ 30seg**
 - **72°C ⇔ 72seg**
 - **72°C ⇔ 10min**
- } 25x

3.8 Eletroforese de DNA e Purificação do produto amplificado do gel

Os produtos de amplificação e o DNA precipitado por PEG8000 40% e/ou digerido com enzimas de restrição foram separados eletroforeticamente em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x (10,8 g de Tris base, 5,5 g de ácido bórico e 4 mL de EDTA 0,5M pH 8) contendo 0,1 µg/mL de brometo de etídio, a uma diferença de potencial de 90-100V. As amostras, antes de serem aplicadas no gel de agarose, foram misturadas com tampão de corrida 6x (0,25% azul de bromofenol, 25% xileno cianol e 30% glicerol em H₂O) na concentração final de 1x. As imagens dos géis foram visualizadas e registradas em equipamento UVP Bioimaging Systems, com o programa LabWorks™ Image Acquisition and Analysis.

O produto amplificado ou digerido foi excisado do gel de agarose e purificado segundo o protocolo do Kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega).

3.9) Clonagem do produto amplificado no vetor pGEM-T Easy.

Fragmentos obtidos por PCR ou fragmentos de PCR purificados do gel de agarose foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) (Figura 3.1), segundo instruções do fornecedor.

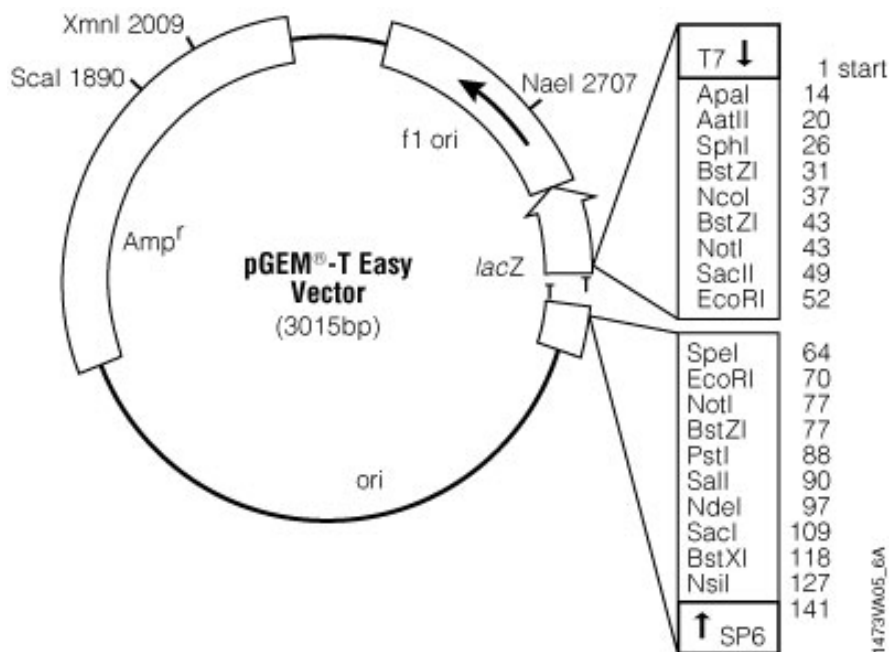


Figura 3.1: Vetor de clonagem de fragmentos de PCR pGEM-T Easy

3.10) Preparo de células competentes DH5α e BL21

Bactérias *Escherichia coli* DH5α e BL21 estocadas em 20% de glicerol a -70°C foram plaqueadas em meio LB agar (10 g/ L Triptona, 5 g/ L extrato de Levedura, 10 g/ L NaCl, 15 g/ L agar) e incubadas a 37°C por 16 hs. Após o período de incubação, 1 colônia foi selecionada e colocada para crescer em 20 mL de meio 2xYT (16 g/L Triptona, 10 g/L Extrato de levedura, 5 g/L Cloreto de sódio) com agitação a 37°C por 16 hs. O inóculo inicial foi diluído 100 vezes em meio 2xYT e a absorbância monitorada até alcançar uma OD₆₀₀ de 0,4-0,6. A cultura foi incubada por 10-30 min em gelo e centrifugada a 4000–5000 rpm por 5 min a 4°C. As células foram ressuspensas em 1/2 volume da cultura com 0,1 M CaCl₂ gelado, mantidas no gelo por 1-2 hs, centrifugadas a 4000-5000 rpm por 5 min a 4°C e então ressuspensas em 1/10 do volume da cultura com 0,1 M de CaCl₂ / 10% glicerol gelado. As células foram aliqüotadas e mantidas no gelo por 30 min antes de serem armazenadas a -70°C.

3.11) Transformação, Boil (STET) Mini-Prep e precipitação por PEG

Plasmídios recombinantes foram transformados em bactérias competentes DH5 α ou BL21. Um volume de 3 μ L do produto de clonagem foi misturado a 50 μ L de células competentes e incubado em banho de gelo por 30 min. Após este período a amostra foi incubada a 42°C por 2 min, adicionado 1 mL de meio LB (10 g/ L Triptona, 5 g/ L extrato de Levedura, 10 g/ L NaCl) e a amostra incubada com agitação a 37°C por 60 min. A amostra foi plaqueada em uma placa contendo meio LB agar com 100 μ g de ampicilina, 50 mg/ mL X-gal, 100 mM IPTG e incubada a 37°C por 16 hs. Colônias brancas, as que apresentavam o inserto, foram selecionadas. Bactérias que foram transformadas com vetores que não tinham o gene Lac Z, foram selecionadas aleatoriamente e a presença do inserto verificada por PCR de colônia. Os clones positivos de interesse foram estocados em 20% de glicerol a -70°C.

As colônias selecionadas foram colocadas para crescer em meio LB contendo 100 μ g de ampicilina com agitação a 37°C por 16 hs. Um volume de 3 mL de bactérias foi centrifugado por 2 min a 14000 rpm e o precipitado ressuscitado em 400 μ L de solução de STET (8 g de sacarose, 5 mL de TrisHCl pH 8, 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,5 g de TritonX 100, avolumados para 100 mL) contendo 1 mg/ mL lisozima. A amostra foi homogeneizada até o desaparecimento do pellet, fervida por 3 min e centrifugada por 15 min a 14000 rpm. O pellet foi removido com um palito e ao sobrenadante foram adicionados 400 μ L de isopropanol, misturados por inversão. A amostra foi centrifugada novamente por 15 min a 14000 rpm e o isopropanol removido. O tubo foi deixado invertido e o precipitado lavado 2 vezes com etanol (70% e absoluto). Depois de seco em estufa a 37°C, o precipitado foi ressuscitado em 29,5 μ L de H₂O milli Q.

O plasmídeo foi purificado através da precipitação com PEG. À amostra ressuscitada em 29,5 μ L de H₂O foram adicionados 4 μ L de NaCl 4 M e 6,5 μ L de PEG8000 40% e mantida no gelo por 20 min. O DNA foi centrifugado a 14000 rpm por 20 min a 4°C e o precipitado lavado 2 vezes com etanol (70% e absoluto). Após evaporação do etanol, o precipitado foi ressuscitado em 20-30 μ L de H₂O milli Q.

3.12) Sequenciamento

As amostras de DNA plasmidial purificadas contendo o inserto foram sequenciadas no sequenciador automático capilar ABI3730, da plataforma genômica DNA-PDTIS/FIOCRUZ. A quantificação do DNA para a reação de seqüenciamento foi feita visualmente com base na intensidade observada em gel de agarose.

3.13) Análise de Bioinformática

Foram utilizados programas de bioinformática na análise das informações obtidas no seqüenciamento do inserto plasmidial. Análise de similaridade das seqüências de nucleotídeo e aminoácido foi realizada contra banco de dados de tripanosomatídeos no site Gene DB utilizando a ferramenta blast ([Http: www.genedb.org/](http://www.genedb.org/)). Para o alinhamento múltiplo das seqüências foi utilizado o programa ClustalW 2.0 (www.ebi.ac.uk/clustalw) e sua posterior visualização foi realizada no programa BioEdit. A árvore filogenética foi construída utilizando o programa Mega 4 (www.megasoftware.net) com o método de Neighbor-Joining e bootstrap de 1000 réplicas. Para obter a seqüência da fita complementar foi utilizada a ferramenta Nucleic Acid Sequence Massager (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>) e a tradução através da ferramenta ExpASy (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>). Os iniciadores foram construídos utilizando o programa Primer 3.

3.14) Digestão Enzimática do DNA plasmidial

O DNA plasmidial purificado do vetor pGEM-T Easy contendo o inserto LcFlag, foi clivado com enzimas de restrições para a liberação do inserto: 2 µg de DNA plasmidial foram incubados por 2 hs a 37°C com 1x de tampão II 10x (BioLabs), 2U das enzimas BamHI 10 U/ µL (BioLabs) e HindIII 20 U/ µL (BioLabs), num volume final de reação de 30 µL. A inativação da enzima foi feita incubando a amostra a 65°C por 20 min.

O vetor de expressão pMAL também foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e HindIII, utilizando a mesma condição da reação acima descrita.

3.15) Desfosforilação do vetor pMAL digerido

Após a digestão do vetor pMAL com BamHI e HindIII e inativação da enzima de digestão, o vetor foi desfosforilado. Um volume de 18 μ L do vetor pMAL foi incubado por 30 min a 37°C com 2,57 μ L da enzima Exonuclease I. Depois a amostra foi incubada com SAP desfosforilação 10x por 15 min a 65°C, respeitando a proporção de 0,9 μ L da enzima SAP para 7 μ L de amostra.

3.16) Clonagem do inserto purificado LcFlag no vetor de expressão pMAL

O inserto LcFlag purificado a partir do gel, foi subclonado no vetor de expressão pMAL-c4X (figura 3.2) que expressa uma proteína ligadora de maltose (MBP). A quantidade referente a 100 ng do vetor pMAL desfosforilado e do inserto digerido foram incubados por 16 hs a 14°C, com 0,5 U da enzima T4 DNA ligase (1 U/ μ L), 1x de tampão T4 DNA ligase 10x (Promega), num volume final de reação de 10 μ L.

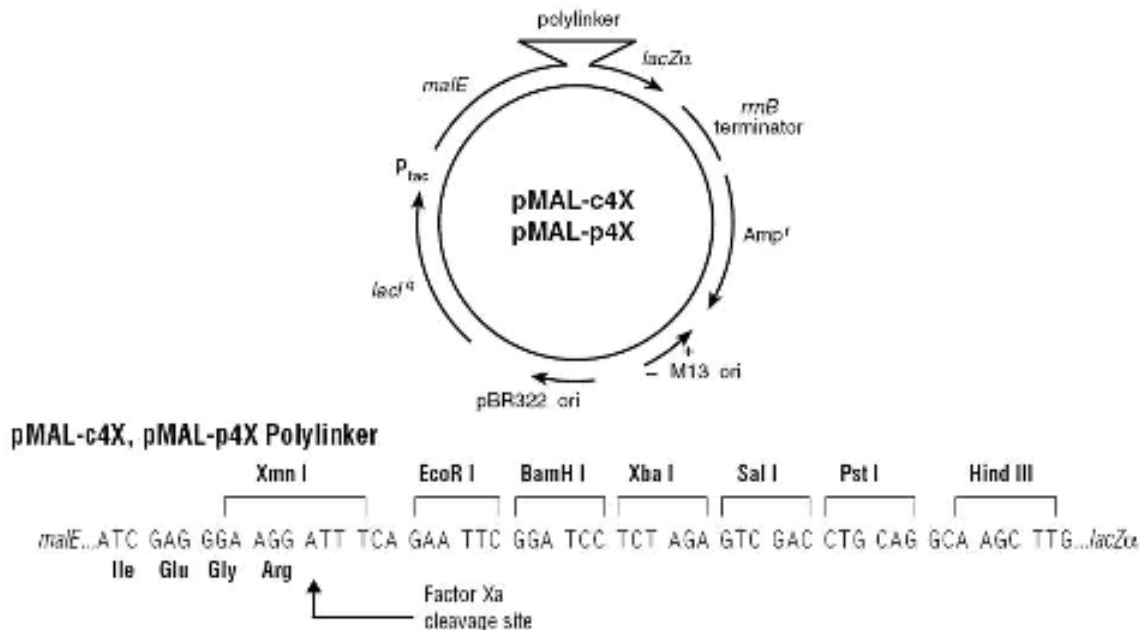


Figura 3.2: Vetor de expressão pMAL.

3.17) PCR de colônia

PCR de colônia foi feita para verificar a presença de LcFlag no vetor pMAL. Cada colônia obtida da transformação do produto de ligação do inserto LcFlag em pMAL foi selecionada com um palito estéril e colocada em um tubo de PCR de 0,2 µL contendo 10 µL de água milliQ. A amostra foi aquecida por 7 min a 95°C e então a reação de PCR realizada seguindo as condições descritas no item 3.7.

3.18) Expressão de proteínas

Clones contendo o inserto LcFlag ou só o plasmídeo foram selecionados com um palito estéril e colocados em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de meio LB com ampicilina. A amostra foi incubada em um agitador a 37°C por 16 hs e o inóculo inicial foi diluído 100 vezes em meio LB com ampicilina. A amostra foi incubada em um agitador a 37°C e a absorbância monitorada até ser alcançada uma OD₆₀₀ de 0,8-0,9. Ao inóculo foi adicionado IPTG numa concentração final de 1 mM para indução da expressão. Alíquotas de 500 µL no tempo 0h, correspondente ao controle da indução, e nos intervalos de 1 h, 2 hs, 3 hs, 4 hs e 16 hs após a indução com IPTG foram retiradas e a absorbância lida numa OD₆₀₀. As alíquotas foram centrifugadas a 10000 x g por 5 min e o pellet sonicado no gelo por 15 a 25 seg em 150 µL de tampão de sonicação (200 mM de Tris-HCl pH 7,0-8,0; 200 mM de NaCl e 1 mM EDTA pH 8). As alíquotas foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante retirado. O volume de sobrenadante a ser utilizado foi calculado com base na absorbância da cultura de bactéria correspondente a alíquota no tempo 0h (não induzido), e misturado ao tampão de amostra de proteína (3,8 mL água, 1 mL 0,5M Tris-HCl pH6,8, 0,8 mL glicerol, 1,6 mL SDS 10%, 0,40 mL 2β mercaptoetanol, 0,4 mL 0,05% azul de bromofenol, para uma concentração final de 4x) Este cálculo foi feito utilizando uma regra de 3, no qual o volume atribuído ao tempo 0h foi inversamente proporcional a absorbância. Ao pellet foram adicionados 100 µL tampão de amostra de proteína e o volume a ser utilizado foi calculado relacionando este 100 µL em uma regra de 3, onde 150 µL está diretamente relacionado com o volume de sobrenadante calculado num determinado tempo. As

amostras foram fervidas por 5 min, aplicadas em um gel de SDS-PAGE 9% e separadas eletroforéticamente a 150 V por 2 hs. Após a corrida o gel foi corado com azul de coomassie (0,1% de azul de coomassie R-250, 40% de metanol, 10% de HOAc).

Uma vez determinado o melhor tempo de indução da proteína e verificado se a mesma estava no sobrenadante ou no pellet após a sonicação, uma nova indução foi feita. Um volume de 5 mL de cultura não induzida foi retirado antes da adição do IPTG e alíquotas de 45 mL foram tiradas no melhor tempo de indução da proteína. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 30 min a 4°C, o sedimento sonicado e centrifugado a 10000 x g por 15 min. As frações foram separadas e armazenadas a -70°C até a purificação da proteína recombinante. As frações correspondentes ao sobrenadante da amostra induzida de Flag e da MBP foram descongeladas e a quantidade de proteína total quantificada por Bradford (Bradford M, 1976).

3.19) Purificação por coluna de maltose da proteína de fusão LcFlag/MBP e da MBP.

As proteínas induzidas foram purificadas seguindo o protocolo do vetor pMAL: “pMAL protein fusion and purification system (BioLabs)”. Resumidamente, 2 mL de resina de amilose (BioLabs) foram colocados em um tubo falcon de 15 mL e a resina lavada com 8 mL de tampão de lavagem 8 vezes a 1000 rpm por 15 min. O volume correspondente a 6 mg de proteína total induzida presente no sobrenadante após a sonicação de Flag e MBP foi adicionado à resina seguido por 5 mL de tampão de lavagem. A amostra foi homogeneizada e incubada a 4°C por 16 hs. A resina foi lavada 3 vezes com 8 mL de tampão de lavagem e depois a amostra eluída da resina com 2 mL de tampão de lavagem acrescido de 10 mM de maltose por 4 vezes. Ao final tínhamos 4 alíquotas de 2 mL que foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min e o sobrenadante quantificado e guardado.

3.20) Imunização e produção de anticorpos policlonais anti-Flag/MBP e anti- MBP

Todas as imunizações foram realizadas em coelhos neo-zelandeses, mantidos no biotério do Pavilhão Carlos Chagas-IOC-FIOCRUZ. Os experimentos foram autorizados pelo número de protocolo: CEUA P0-116-02.

Após a visualização da indução, um volume maior do extrato celular da amostra induzida com IPTG foi aplicado no gel de poliacrilamida e, após a corrida, a banda correspondente à proteína de fusão Flag/MBP e à MBP foram isoladas do gel. As bandas foram maceradas com um pistilo e homogeneizadas com um sistema de 2 seringas conectadas em 400 µL de PBS mais 800 µL de adjuvante de Freund completo na primeira inoculação e depois maceradas em adjuvante de Freund incompleto na segunda e terceira inoculações. As inoculações foram realizadas em um intervalo de tempo de 15 dias. O sangue coletado antes e após o processo de imunização foi incubado a 37°C por 40 min, por 2 dias a 4°C. O soro obtido após o processo de coagulação foi retirado e armazenado a -20°C.

3.21) Dot Blot contra os anticorpos

Para testar a reatividade dos anticorpos disponíveis, experimentos de dot blot foram realizados. Em uma membrana de nitrocelulose foi aplicado o volume correspondente a 1 µg da proteína de fusão Flag/MBP, Sup e MBP. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 1h com TBS/Tween 20 0,1% com 5% (p/v) de leite desnatado (Molico) sob agitação, e então incubados por 1 h sob agitação com os anticorpos policlonais anti-Flag/MBP (1:500), anti-Sup (1:500), anti-MBP (1:500) e monoclonal anti-Flag (1:300). As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min em TBS/Tween 0,1% sob agitação e então incubadas por 1 h sob agitação com os seus respectivos anticorpos secundários: anti-mouse IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP (Bio Rad laboratories), na diluição de 1:10000 em solução de TBS/Tween 0,1%. Após 3 lavagens de 10 min sob agitação, a amostra foi revelada por quimioluminescência (SuperSignal West Pico/Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as membranas foram expostas a filme radiográfico (Kodak) e reveladas por um sistema de revelação manual utilizando revelador e reforçador GBX e fixador, ambos da Kodak.

3.22) Origem da proteína recombinante Sup e dos anticorpos monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup

O anticorpo monoclonal anti-Flag foi obtido por colaboração com o grupo de pesquisa de Diane McMahon-Pratt da Universidade de Yale, EUA (Ismach et al, 1989, Warburg et al, 1989). A proteína recombinante Sup e o anticorpo policlonal anti-Sup foram produzidos durante a tese de mestrado de Luanda Nascimento, em nosso laboratório (Marcelino-Nascimento, 2005).

3.23) Extrato protéico de *Leishmania*

Extrato de proteínas totais de parasitos foi obtido após 3 dias de cultura (fase exponencial). Promastigotas procíclicas foram lavados 3 vezes em PBS, centrifugados a 3500 x g por 10 min à 4°C e ressuspendidos em um coquetel de inibidores de protease (Sigma). As amostras foram congeladas em gelo seco e descongeladas 3 vezes a temperatura ambiente. As proteínas totais foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford M, 1976).

3.24) Eletroforese de proteínas de *Leishmania* e Western blot

Géis de SDS-PAGE de 15% foram preparados segundo instruções do fabricante do reagente de Bis/acrilamida 1:29 (Bio-Rad). A quantidade equivalente a 25 µg do extrato total de proteína de cada *Leishmania*, foi previamente fervida por 5 min em tampão de amostra de proteína e separada em gel de SDS-PAGE a 120 V por 2 h usando sistema de Mini-proteína III (Bio Rad) .

As proteínas separadas foram transferidas a membranas de nitrocelulose (Bio Rad) a 100 V por 1,5 hs a 4°C. Após transferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (Sigma) e incubadas por 1 h sob agitação em solução de TBS/Tween 0,1% com 5% (p/v) de leite desnatado (Molico). As membranas foram incubadas com os anticorpos primários: monoclonal anti-Flag (1:3000), policlonal anti-Flag (1:500) e policlonal anti-Sup (1:500) por 2 hs sob agitação em solução de TBS/Tween 0,1% com 5% de leite desnatado, e então lavadas 3 vezes por 10 min em TBS/Tween 0,1% sob agitação. Após as lavagens, as membranas foram incubadas por 1 h sob agitação com os seus respectivos anticorpos secundários:

anti-mouse IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP (Bio Rad laboratories), na diluição de 1:10000 em solução de TBS/Tween 0,1%. Após 3 lavagens de 10 min sob agitação, a amostra foi revelada por quimioluminescência (SuperSignal West Pico/Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as membranas foram expostas a um filme radiográfico (Kodak) e revelados por um sistema de revelação manual utilizando revelador e reforçador GBX e fixador da Kodak.

3.25) Extração de RNA total das formas amastigotas e procíclicas de *Leishmania* e quantificação

Uma cultura de *L. pifanoi* em fase logarítmica contendo formas promastigotas procíclicas e uma cultura de formas amastigotas, foram centrifugadas por 4000 rpm a 4°C e o pellet armazenado em freezer -70°C. As amostras foram ressuspensas em 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies Inc) e o RNA total extraído de acordo com as instruções do fabricante. Para a quantificação do RNA total extraído, um volume da amostra foi diluído em água e a absorbância medida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 260nm. A concentração foi calculada utilizando a fórmula: λ . 40 μ g/mL. Fator de diluição.

3.26) RT-PCR dos transcritos dos genes Flag e Sup

Uma quantidade de 4 μ g do RNA total extraído das formas amastigotas e procíclicas foram tratadas com RQ1 DNase (Promega), conforme o protocolo do fabricante. O RNA foi incubado com 5 M de LiCl a -70°C por 16 hs e então centrifugado a 14000 rpm por 15 min à 4°C. O pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 14000 rpm por 15 min à 4°C. Após a evaporação do etanol 70%, o pellet foi ressuspensado em H₂O tratada com DEPC. O RNA total obtido após a precipitação com 5 M de LiCl foi usado na síntese de cDNA utilizando o sistema “Standard Reverse Transcription” (Promega) seguindo o protocolo do fabricante.

Na reação de RT-PCR foram usados os iniciadores Lp_F e LpFlag_R, específico para Flag que amplificam um fragmento de 171 pb; enquanto que os iniciadores Lp_F e LpSup_R, específicos para Sup, produzem um fragmento de 225 pb. Como referência endógena da massa de cDNA utilizado nas reações de RT-PCR foram empregados iniciadores para o gene de actina de *Leishmania*:

LeishActin_F e LeishActin_R. O número de ciclos correspondente à fase exponencial de amplificação para cada um dos genes, foi determinado. As reações realizadas em triplicata foram submetidas a 20, 25, 30, 35, 40 e 45 ciclos, sob as seguintes condições:

95°C ⇔ 3min
95°C ⇔ 45seg
60°C ⇔ 30seg
72°C ⇔ 35seg

X ciclos

A partir destes resultados, obteve-se um intervalo do número de ciclos onde os nossos ensaios apresentaram-se em fase exponencial de amplificação. Cada amostra de cDNA foi amplificada em triplicata com a seguinte condição de PCR, utilizando os reagentes do Kit: da Promega “GoTaq® Flexi DNA Polymerase”: 0,4 µM de cada par de iniciadores específicos, 0,75 U/µL de GoTaq Flexi DNA polimerase (Promega), 0,12 mM de mix de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1x de tampão GoTaq Flexi e 2 mM de MgCl₂. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 2,5%.

3.27) Análise de intensidade de produtos de PCR

As imagens dos produtos do experimento de RT-PCR, foram medidas usando o programa imageJ 1.334s (Wayne Rasband, NIH, EUA- <http://rsb.info.nih.gov/ij>) e os dados foram tabelados e submetidos a uma análise estatística, onde foram obtidos médias, desvios padrão e percentuais de intensidade.

Os cálculos de média dos valores das três repetições de cada reação foram feitos por média aritmética, e a partir destes valores foi calculado o desvio padrão.

Para a normalização dos valores de intensidade dos diferentes amplicons obtidos, foi estabelecido um fator de correção. O fator corresponde à razão entre os valores da média aritmética das bandas de actina obtidos nas reações de cada uma das amostras de cDNA. Para isto assume-se que o valor de intensidade de uma dada reação, corresponde a 100% de expressão. O fator de correção obtido é multiplicado pelo valor dos amplicons de Flag e Sup das formas amastigotas e procíclicas. Assumiu-se como padrão de intensidade a média aritmética das

amplificações com os iniciadores de actina com o cDNA de amastigota (2,537 = 100%).

3.28) Imunofluorescência de *Leishmania*.

De uma cultura em fase logarítmica de promastigotas de *Leishmania* ou de uma cultura axênica de amastigotas, 1 mL foi centrifugado a 4000 x *g* por 5 min e o pellet lavado 1 vez com PBS pH 7,2. O pellet foi ressuspendido em 25 µL de PBS pH 7,2. Cerca de 4 µL de amostra foram aplicados sobre um parafilme. Este material foi coberto por uma lamínula revestida com poli-L-lisina Poly-Prep (Sigma) durante 20 min a TA. A lamínula com os parasitas aderidos foi fixada em metanol a -20°C por 20 min e lavada com solução de bloqueio (3% de BSA e 0,1% de Saponina em PBS pH 8.0). Após a lavagem, 1 mL da solução de bloqueio foi colocada sobre a lamínula por 1 h. A lamínula foi colocada em contato com 20 µL de solução de anticorpo primário na diluição de 1:100 em solução de bloqueio por 1 h, lavada uma vez e incubada com solução de bloqueio por 30 min. Em seguida a lamínula foi incubada por 1 h com os anticorpos secundários: Alexa anti-mouse e Alexa anti-rabbit 488 e 546 (Molecular Probes), na diluição de 1:100 em solução de bloqueio. A lamínula foi lavada 1 vez com solução de bloqueio e então montada sobre uma lâmina e vedada com esmalte. As imagens foram observadas no microscópio Axioplan (Carl Zeiss) no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (UFRJ).

3.29) Ensaio de interação de *L. chagasi* ao intestino médio do flebotomíneo com os anticorpos monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup

Flebotomíneos fêmeas com 2-5 dias de eclodidos, alimentados com 30% de solução açucarada, foram dissecados em meio RPMI (Sigma Co) suplementado com 1% de BSA, 1 mM de MgCl₂ e 0,15 mM de CaCl₂. Cabeça, papo e túbulos de Malpighi foram removidos e o intestino isolado, aberto ao longo do segmento abdominal com uma fina agulha. Parasitas procíclicos de *L. chagasi* de uma cultura de fase exponencial, foram centrifugadas por 5 min a 4000 rpm, lavados 2 vezes com meio RPMI suplementado e contados em câmara de Neubauer. Os intestinos médios foram colocados em uma lâmina côncava com 60 µL de meio RPMI suplementado, contendo 2x10⁷ parasitas previamente incubados, ou não, com os

anticorpos monoclonal anti-Flag (1:100) ou policlonal anti-Sup (1:100) por 30 min a 25-26°C. Após um período de incubação de 25 min a 25-26°C, os intestinos foram lavados 3 vezes com meio RPMI suplementado, transferidos individualmente para um tubo de microcentrifuga com 40 µL de PBS e macerados com um pistilo. O número de promastigotas por intestino foi contado em câmara de Neubauer.

3.30) Biotinilação das proteínas da superfície do parasita

Uma cultura contendo 10^7 *L. chagasi* em fase exponencial, foi lavada 3 vezes com PBS pH 7,2 e centrifugada a 4000 x g por 10 min à 4°C. Os parasitas foram ressuspendidos em 1 mL de PBS contendo 0,1 mg de biotina (Sulfo-N HS-Lc-Biotin/ Pierce Biotechnology, IL, USA) e incubados por 20 min a 4°C. A suspensão de parasitas foi lavada 3 vezes com PBS pH 7,2 com centrifugação a 4000 x g por 5 min à 4°C, para remover a biotina não ligada.

3.31) Extrato protéico do intestino de *L. longipalpis* para experimento de Ligand Blot

Flebotomíneos com 2-5 dias de eclodidos foram alimentados com sangue de hamster anestesiado e, 72 hs após a alimentação, as fêmeas alimentadas foram dissecadas em PBS pH 7,2 e seus intestinos colocados em um coquetel de inibidores de protease (Sigma). Ao tubo contendo os intestinos foi adicionado tampão de amostra de proteína e este foi fervido por 5 min.

3.32) “Ligand Blot” de proteínas do intestino de *L. longipalpis* com parasitas vivos biotinilados (Dias et al., 2007).

Um volume equivalente a 15 intestinos do extrato protéico de *L. longipalpis*, foi separado por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% a uma voltagem constante de 120 V por 2 h usando o sistema de Mini-proteína III (Bio Rad). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 100 V por 1,5 h a 4°C, em tampão de transferência de proteína (3 g de Tris Base, 14,4 g de Glicina, 200 mL de metanol, avolumado para um 1 L)

A membrana foi bloqueada por 1 h sob agitação em solução de bloqueio (TBS pH 7,2/Tween 0,05% com 1% (p/v) de BSA), e então incubada por 1 h sob agitação em solução de bloqueio sem ou com 10^7 parasitas vivos previamente biotinilados/mL. Após a incubação a membrana foi lavada 3 vezes por 10 min com TBS pH 7,2/Tween 20 0,05% sob agitação e incubada na mesma solução com 0,1 µg/ mL de estreptavidina conjugada a peroxidase por 30 min sob leve agitação. Após a incubação a membrana foi lavada 3 vezes por 10 min com TBS pH 7,2/Tween 20 0,05% sob agitação e as bandas contendo o parasita ligado foram detectados com o kit de quimiluminescência, SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection Kit (Pierce), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.33) Preparo das proteínas e acoplamento na resina para o experimento de “Pull Down”

Cerca de 1-5 mg/ mL das proteínas Flag, Sup e pMAL foram colocadas em membranas de diálise contra 1 L de tampão de ligação a 4°C com agitação. Após 3 dias de diálise, com trocas diárias do tampão de ligação, as proteínas foram recuperadas e acopladas a uma resina de sefarose, CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. Ao final do processo, as resinas com as proteínas conjugadas foram guardadas a 4°C com 0,05% de azida sódica.

3.34) Pull Down de extrato protéico de células LL5 com as proteínas conjugadas em sefarose e SDS-PAGE

Um pellet de células LL5 foi ressuscitado em um coquetel de inibidor de protease (Sigma) e as proteínas quantificadas pelo método de Bradford. Um volume de 200 µL das resinas conjugadas às proteínas Flag, Sup, pMAL e também da resina pura (controle negativo), foi centrifugado a 2000 rpm por 3 min e o pellet lavado 2 vezes com 200 µL de 50 mM de Tris-HCl pH8,0/ 50 mM de NaCl/ 25mM de KCl a 2000 rpm por 2 min. Ao pellet foram adicionados 200 µg de extrato protéico de células LL5 em 500 µL da solução de TrisHCL/NaCl/KCl e a mistura foi incubada por 2 h a TA sob agitação. As amostras foram lavadas 3 vezes com 5 volumes iniciais da resina em solução de TrisHCL/NaCl/KCl. A um volume de 20 µL de resina de cada

amostra foi adicionado 9 μ L tampão de amostra de proteína e esta mistura foi centrifugada a 3000 *rpm* por 3 min. O sobrenadante foi separado do pellet de resina e estes foram fervidos por 5 min. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 12% a 150V por 2 h e o gel corado pela prata segundo protocolo de Blum et al. (1987).

4.1) Amplificação e Sequenciamento do gene Flag de *L. chagasi*.

O DNA genômico extraído de *L. chagasi* foi utilizado para amplificar o gene Flag por PCR, utilizando o par de iniciadores FlagBam_F e FlagMarcel_R que foram desenhados com base na seqüência do gene Flag de *L. infantum* disponível em banco de dados. O volume total de 25 uL da reação de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5% e após a corrida, uma banda esperada de aproximadamente 400 pb foi observada (Figura 4.1).

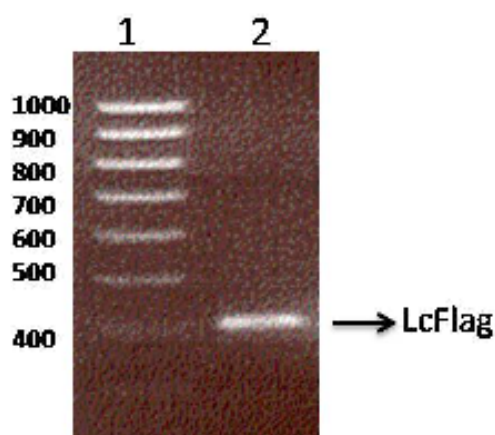


Figura 4.1: Amplificação do gene Flag de *L. chagasi* por PCR. A linha 1 corresponde ao marcador de DNA de 100 pb (Fermentas) e a linha 2 ao fragmento LcFlag amplificado.

Após a purificação do produto amplificado do gel de agarose, o fragmento foi clonado no vetor pGEM-T Easy. O sítio de restrição foi incluído na posição 3' e 5' dos iniciadores FlagBam_F e FlagMarcel_R, respectivamente, para posterior subclonagem do fragmento amplificado por PCR no vetor de expressão pMAL-c4x. O produto da ligação foi transformado em célula competente DH5 α , sendo o DNA plasmidial extraído por Boil Mini-Prep e purificado por PEG8000 40%. Para verificar que a amplificação foi feita a partir do gene de interesse, 2 clones da amostra LcFlag foram seqüenciados. Na figura 4.2 é mostrada a seqüência nucleotídica obtida com o seqüenciamento e seqüência protéica deduzida.

```

ATGGGCTGCGGTGCTTCTTCTGAGAACAGCAGCGTCACGTACGTGAACGGCAAGCCCACCTTCACGGGTG 70
M G C G A S S E N S S V T Y V N G K P T F T G

AGGAGGTGACGAAGGGCTTCGAGAAGGACAATGGGCTGCTTTTCCGCACCGTGAACAAGAAGAAGCA 140
E E V T K G F E K D N G L L F R T V N K K K K Q

GTGGGCGTACTACAACGACACGACGCAGTACGAAATGCACGTGCTGGTCACCTTCAACGAGGACTGTGAC 210
W A Y Y N D T T Q Y E M H V L V T F N E D C D

ATCAAGGCTCTTGCCAAGACGAAGCTGGAGCAGCAGGAGAACGGCGAGTGGGTAGCCTCCGTGGTGGTGT 280
I K A L G K T K L E Q Q E N G E W V A S V V V

ACCCGTGCGGAGACGGAGATGTTTCATTGAGGGCCGCGTGAACGGCTTCAAGTCAAGATGGACGCCCTTGCC 350
Y P C E T E M F I E G R V N G F K S K M D A L P

GCTGTCCGGAGGAGTACCGCCAGCGTCAGGCGGAGAAGGAAAAG 393
L S E E Y R Q R Q A E K E K

```

Figura 4.2: Seqüência codificante do gene Flag de *L. chagasi*. Em cima é mostrado a seqüência nucleotídica e em baixo, a seqüência protéica deduzida. O sublinhado indica a região onde os primers se anelam.

4.2) Análise da seqüência de Flag de *L. chagasi*.

A seqüência de aminoácidos predita de Flag foi obtida utilizando o programa ExpPASy (Figura 4.2). Esta seqüência foi comparada com o banco de dados (gene DB) de algumas espécies de Leishmanias e *Trypanosoma*. Análise do alinhamento das seqüências e da árvore filogenética foi feita utilizando o programa ClustalW, com a árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) com bootstrap de 1000 replicatas.

O alinhamento das seqüências de aminoácido (Figura 4.3A) mostra um domínio N-terminal bem conservado entre as espécies de *Leishmania*: *L. chagasi* (LcFlag), *L. major* (LmFlag) e *L. infantum* (LiFlag) e *Trypanosoma*: *T. cruzi* (TcFlag), *T. brucei* (TbFlag); e um domínio C-terminal altamente divergente das espécies de *Leishmania* em relação às espécies de *Trypanosoma*. Como representado na figura 4.3A por um asterisco, a seqüência N-terminal destas proteínas contém um domínio de miristilação forte (MGXXXS/T).

A análise filogenética da proteína nos tripanosomatídeos disponíveis, revelou 3 ramos. O primeiro ramo com as seqüências de leishmanias, o segundo com *T. cruzi* e o terceiro ramo com *T. brucei* (Figura 4.3B).

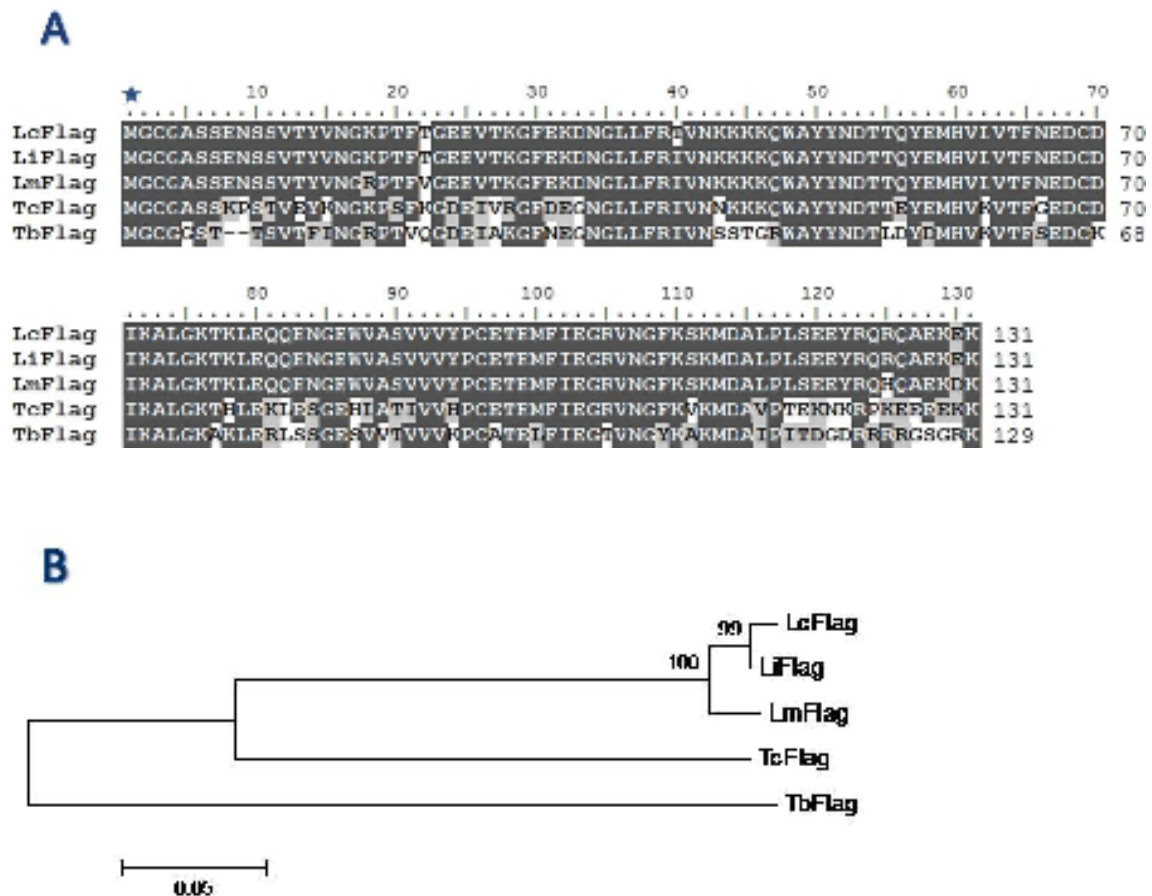


Figura 4.3: Comparação da seqüência de Flag nos tripanosomatídeos. (A) Alinhamento CrustalW da seqüência de LcFlag contra seqüências de Flag de *L. infantum* (LiFlag), *L. major* (LmFlag), *T. cruzi* (TcFlag) e *T. brucei* (TbFlag). Os aminoácidos idênticos e similares foram marcados em preto e cinza, respectivamente. O sinal de miristilação foi marcado com um asterisco. (B) Árvore filogenética da seqüência de Flag das espécies utilizadas no alinhamento. A escala representa 0.05 substituições nucleotídicas por sítio.

4.3) Subclonagem do fragmento LcFlag clonado em pGEM-T Easy no vetor de expressão pMAL

O DNA plasmidial purificado por PEG, resultado do produto de clonagem LcFlag em pGEM-T Easy, foi quantificado por leitura no comprimento de onda a 260nm. Após a quantificação, 2 µg do DNA plasmidial foi incubado com as enzimas de restrições BamHI e Hind III, para a liberação do inserto LcFlag. Após a visualização no gel do produto da digestão, a banda de 400pb correspondente a LcFlag foi extraída (Figura 4.4, linha 3) e o inserto purificado do gel. As linhas 1 e 2

correspondem ao marcador de DNA de 100 pb e ao plasmídeo pGEM-T Easy sem inserto digerido com BamHI e HindIII, respectivamente.

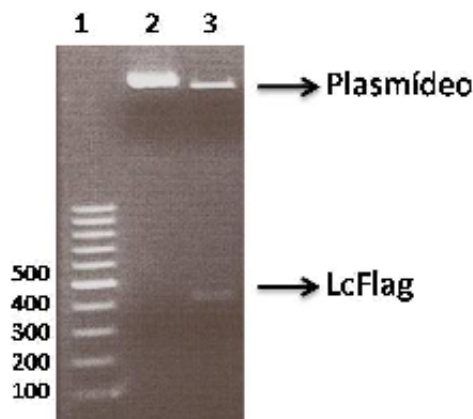


Figura 4.4: Digestão de LcFlag clonado em pGEM-T Easy com as enzimas BamHI e HindIII. A linha 1 corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb; a linha 2 ao plasmídeo sem inserto digerido e a linha 3 ao produto da digestão com a liberação do inserto.

O inserto LcFlag foi clonado no vetor pMAL, previamente digerido e desfosforilado, que foi transformado em células competentes BL21. Como o vetor pMAL não possui o gene Lac Z, ao plaquearmos as bactérias transformadas na placa de LB agar com ampicilina, não foi adicionado IPTG e nem X-Gal. O gene Lac Z na presença de um indutor (ex: IPTG), transcreve e traduz a proteína B galactosidase que quebra o substrato x-Gal, produzindo uma coloração azul. Então como não pudemos separar colônias brancas das azuis, os clones positivos, contendo o inserto, foram confirmados por PCR de colônia e o resultado visualizado em gel de agarose 1,5% (Figura 4.5). Observamos que todas as colônias selecionadas continham o fragmento esperado de aproximadamente 400 pb, que corresponde ao inserto LcFlag (linhas 2 a 11).

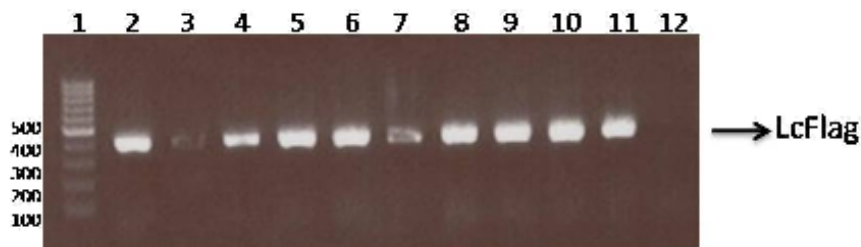


Figura 4.5: PCR de colônia. A presença do inserto LcFlag no vetor de expressão pMAL foi confirmada em gel de agarose após reação de PCR. Linha 1 corresponde ao marcador de DNA de 100 pb; linhas 2 a 11: resultado da reação de PCR para amplificar LcFlag de colônias selecionadas; linha 12: controle negativo da reação de PCR.

4.4) Indução e purificação da proteína de fusão LcFlag/MBP e da MBP.

Após a confirmação da presença do inserto por PCR, a colônia foi crescida em meio LB com ampicilina e a expressão induzida com 1 mM de IPTG. Alíquotas da amostra foram tiradas antes e após a indução com IPTG, em diferentes tempos. As alíquotas foram centrifugadas, o pellet sonicado em tampão de sonicação e o sobrenadante separado do pellet por centrifugação. Foi calculado o volume necessário para cada amostra ter a mesma concentração no gel. As frações recuperadas foram misturadas com tampão de amostra e aplicadas em um gel de poliacrilamida. Após a corrida e coloração do gel por azul de Coomassie, foi observado que a proteína de fusão Flag/MBP de aproximadamente 57,5 kDa estava presente no sobrenadante, não formando corpos de inclusão, e que era mais expressa a partir de 2 hs após a indução (Figura 4.6).

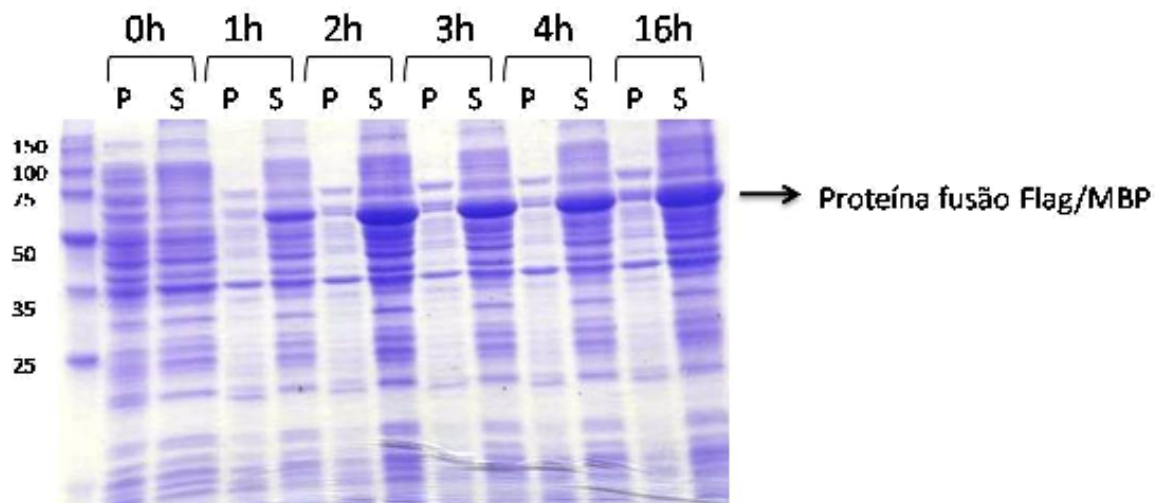


Figura 4.6: Gel de SDS-PAGE mostrando a indução da proteína fusão Flag/MBP. O extrato protéico do pellet (P) e do sobrenadante (S), recuperados após a sonicação, de cada tempo antes (0h) e após a indução (1h, 2h, 3h, 4h e 16h) com 1 mM IPTG foram separadas eletroforéticamente. A banda correspondente à proteína Flag induzida está sinalizada com uma seta.

Com a finalidade de confirmarmos que a banda observada correspondia à proteína de fusão Flag/MBP e de termos um controle nos experimentos futuros, a MBP foi expressa. Para fins demonstrativos, o extrato protéico das amostras correspondentes a indução da proteína de fusão Flag/MBP e da MBP, foram separadas em um gel de SDS-PAGE 9%. Após a coloração com azul de Coomassie (figura 4.7), observamos que as proteínas expressas possuem o tamanho esperado: fusão Flag/MBP 57,5 kDa (linha 2) e MBP 42,5 kDa (linha 4).

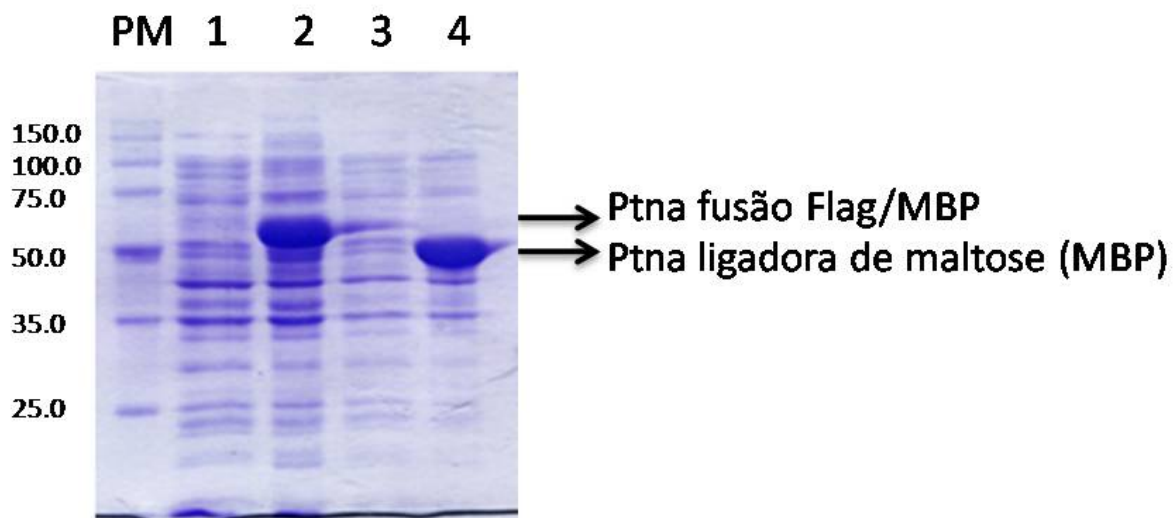


Figura 4.7: Comparação da expressão da proteína de fusão Flag/MBP e MBP. As linhas 1 e 3 correspondem a amostra antes da indução, enquanto que as linhas 2 e 4 correspondem a indução por IPTG da proteína de fusão Flag/MBP e da MBP, respectivamente. PM refere-se ao padrão de massa molecular.

Uma vez confirmada a expressão das proteínas Flag/MBP e da MBP, uma nova indução foi realizada recuperando a amostra 2 hs após a adição de 1 mM IPTG. O sobrenadante de cada amostra, após a sonicação, foi utilizado na etapa de purificação das proteínas em coluna de maltose. Após a eluição com 10 mM de maltose, as frações foram recuperadas e visualizadas em gel de poliacrilamida. Na figura 4.8A, as frações F1 a F6 correspondem a eluições sequenciais da proteína de fusão Flag/MBP, enquanto que em B às frações purificadas da MBP. Nela observamos uma maior concentração da proteína purificada nas primeiras frações com relação às últimas.

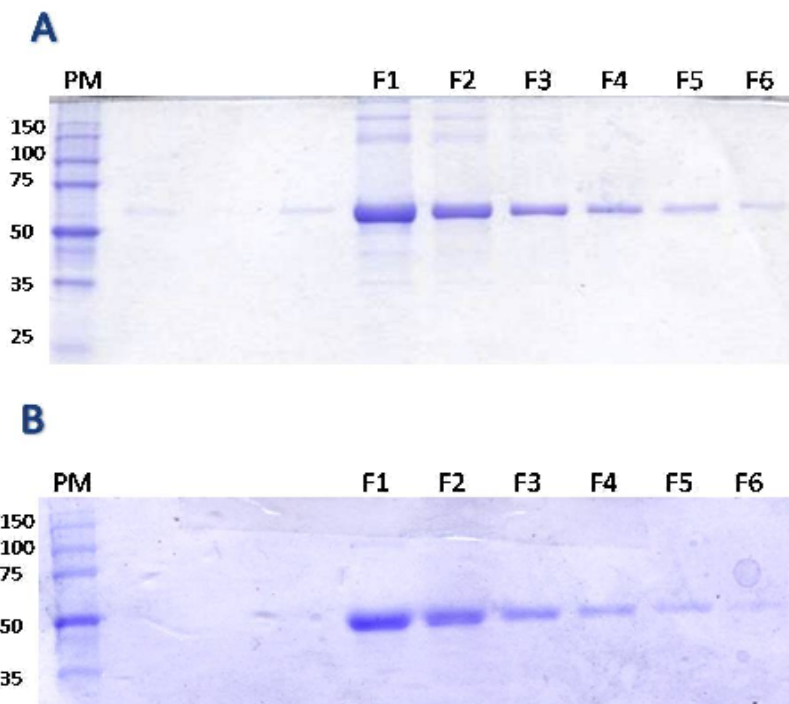


Figura 4.8: Purificação da proteína de fusão Flag/MBP (A) e MBP (B). As frações de F1 a F6 correspondem a eluição seqüencial de cada proteína da resina adicionando maltose.

4.5) Produção dos anticorpos anti-proteína de fusão Flag/MBP e MBP

Para a obtenção dos anticorpos, proteínas totais do extrato celular das culturas induzidas por IPTG foram resolvidas em gel de poliacrilamida 9% (Figura 4.9). As bandas correspondentes a proteína de fusão Flag/MBP (A) e MBP (B), foram excisadas do gel de poliacrilamida após corrida eletroforética. As amostras foram emulsionadas com adjuvante de Freud completo e incompleto antes de serem inoculadas no coelho. Antes e após as imunizações o sangue foi processado e o soro recuperado.

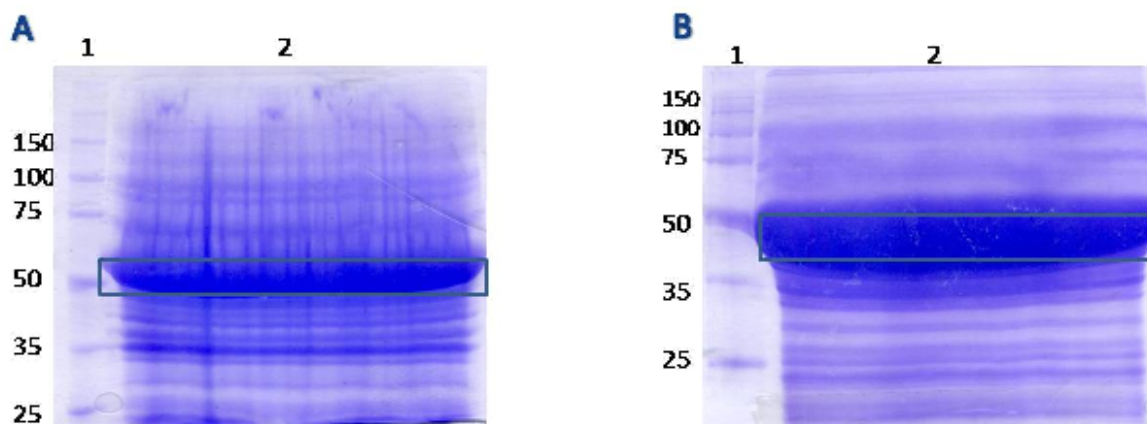


Figura 4.9: Géis de poliacrilamida de proteínas induzidas usadas para imunizações em coelhos. Visualização após coloração por azul de coomassie do extrato protéico total das amostras induzidas para a expressão da proteína de fusão Flag/MBP (A) e para a expressão da proteína ligadora de maltose (B). As linhas 1 correspondem ao padrão de peso molecular; enquanto que as linhas 2 ao poço único feito para aplicar a amostra induzida. A área delimitada por um retângulo corresponde às áreas excisadas dos géis.

4.6) Dot Blot para testar a reatividade dos anticorpos monoclonal anti-Flag, policlonal anti-Flag/MBP, anti-Sup e anti-MBP

A reatividade dos anticorpos disponíveis foi testada por dot blots das proteínas Flag, Sup e MBP. Observamos na figura 4.10B que o anticorpo monoclonal anti-Flag (1° quadrante) não reconheceu as proteínas Flag/MBP, Sup e MBP; que o anticorpo policlonal anti-Flag/MBP (2° quadrante) e policlonal anti-MBP (3° quadrante) reconheceram a proteína Flag e MBP; e o anticorpo policlonal anti-Sup (4° quadrante) reconheceu as 3 proteínas.

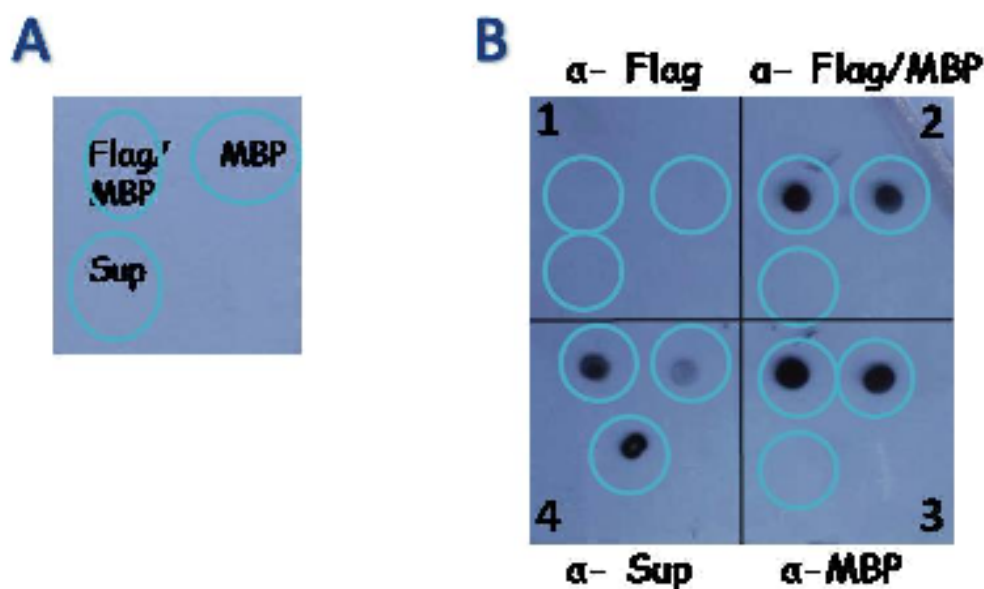


Figura 4.10: Dot Blot para testar a reatividade dos anticorpos contra as proteínas disponíveis. (A) Ilustração esquemática da posição das proteínas nas membranas. (B) Resultado do experimento de Dot Blot, incubando as membranas com o anticorpo monoclonal anti-Flag (1), policlonal anti-Flag/MBP (2), policlonal anti-MBP (3) e policlonal anti-Sup (4).

4.7) Expressão de Flag e Sup em várias espécies de *Leishmania*

Com a finalidade de investigar a expressão das proteínas Flag e Sup em diferentes espécies de *Leishmania*, a mesma quantidade de extrato protéico total (25 µg) de cada espécie foi separada e transferida a membrana de nitrocelulose (figura 4.11A).

Análise por Western blot utilizando os anticorpos primários monoclonal anti-Flag (Figura 4.11B) e policlonal anti-Flag/MBP (Figura 4.11C), reconhecem uma proteína de peso molecular aproximado de 15 kDa correspondente à proteína flagelar Flag. Além disto, indicam que esta proteína é reconhecida mais fortemente em níveis maiores em *L. chagasi* (linha 1) e *L. donovani* (linha 5), em níveis intermediários em *L. pifanoi* (linha 2) e *L. major* (linha 4) e em níveis menores em *L. amazonensis* (linha 3) e *L. mexicana* (linha 5). O mesmo experimento utilizando o anticorpo policlonal anti-Sup (Figura 4.11D), observamos que o anticorpo também reconhece uma proteína de 15 kDa correspondente à proteína Sup. Além disto, vemos uma maior marcação em *L. chagasi* (linha 1) e *L. donovani* (linha 6), e ausência de marcação no extrato protéico de *L. mexicana*.

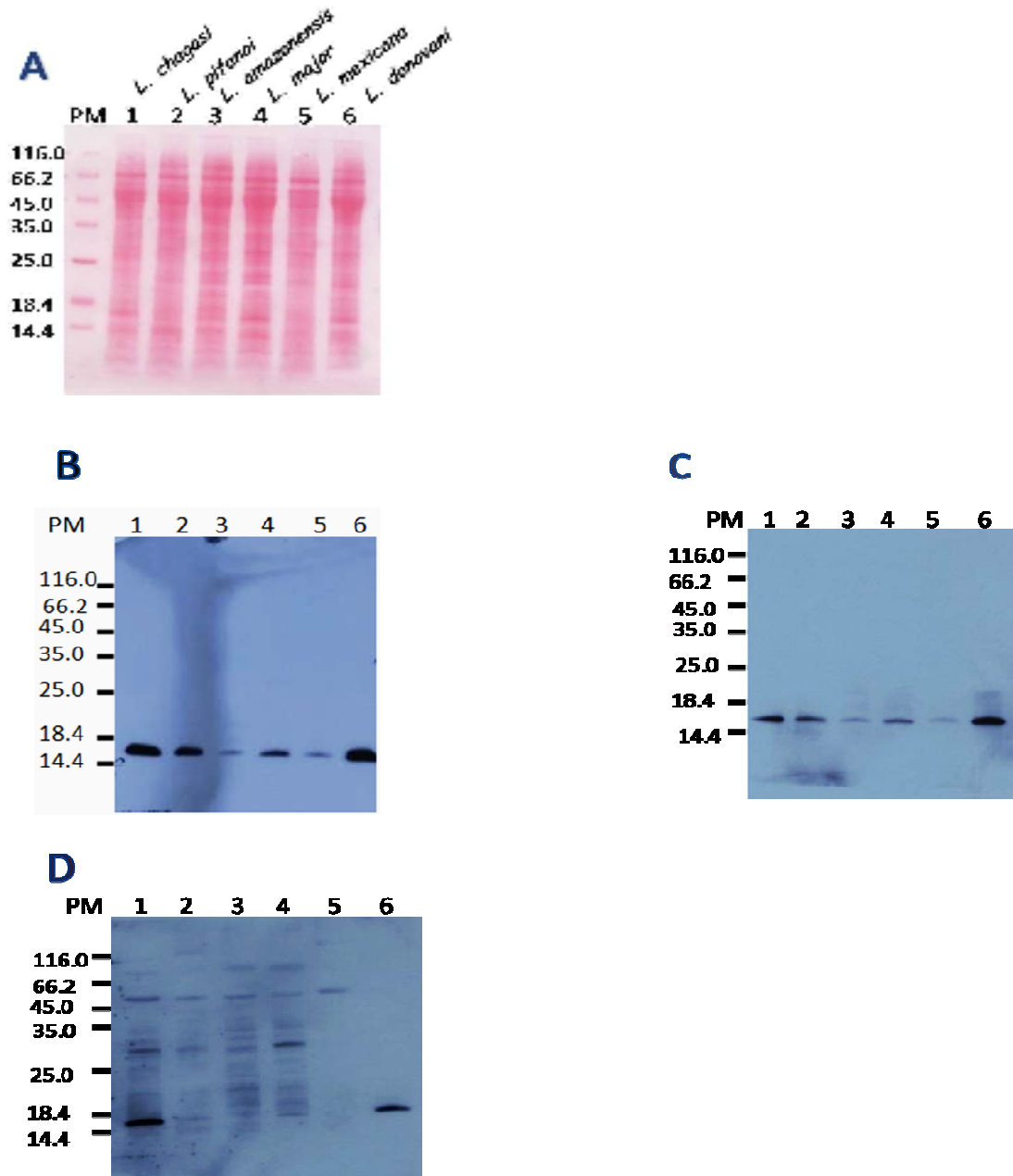


Figura 4.11. Transferência e Western blot de extrato protéico total de diferentes espécies de *Leishmania*. O equivalente a 25 µg de proteínas totais das seguintes espécies de *Leishmania*: *L. chagasi* (linhas 1), *L. pifanoi* (linhas 2), *L. amazonensis* (linhas 3), *L. major* (linhas 4), *L. mexicana* (linhas 5), *L. donovani* (linhas 6), foram usados nos experimentos. PM corresponde ao padrão de massa molecular. (A) Resultado da transferência protéica revelado por Ponceau; (B, C) Western blot utilizando os anticorpos monoclonal anti-Flag (1:3000) e policlonal anti-Flag/MBP (1:500), que reconhecem a proteína Flag (15 kDa); (D) Western blot utilizando o anticorpo policlonal anti-Sup (1:500), que reconhece a proteína Sup (15 kDa).

4.8) Desenho dos iniciadores que diferenciam Flag e Sup para RT-PCR

Sequências dos genes Flag e Sup de *L. infantum* disponíveis no Banco de dados Gene-DB, foram alinhadas e uma região conservada entre as duas sequências foi selecionada para o desenho do iniciador forward: Lp_F. Regiões não conservadas foram selecionadas para a construção do iniciadores reversos: LpFlag_R e LpSup_R, de uma maneira que diferenciasse Flag de Sup, gerando amplicons de tamanhos diferentes: 171 e 225 pb respectivamente (Figura 4.12).

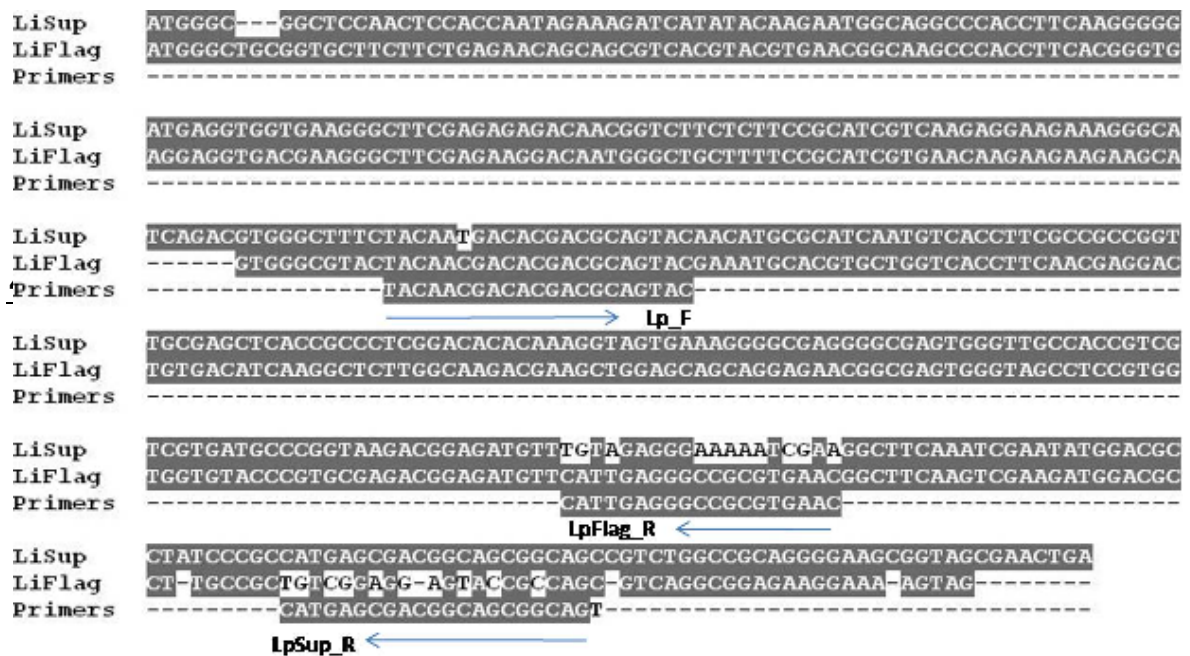


Figura 4.12: Alinhamento dos genes Flag e Sup de *L. infantum*, indicando as regiões onde os iniciadores Lp_F, LpFlag_R e LpSup_R (terceira linha/Primers) foram projetados. Nucleotídeos idênticos foram marcados em preto pelo programa utilizado (BioEdit).

4.9) Expressão diferencial de Sup e Flag

O RNA total extraído de culturas de formas amastigotas e procílicas de *L. pifanoi*, foi submetido à reação de síntese de cDNA. Na reação de síntese, o controle negativo de cada RNA foi incluído. Após a síntese de cDNA as amostras foram submetidas à reação de PCR variando o número de ciclos, para identificar a fase exponencial para cada transcrito. Foram desenhados iniciadores capazes de

discriminar e gerar amplicons de tamanhos diferentes para cada um dos genes. Estes iniciadores foram baseados nas sequências de Flag e Sup disponíveis de *L. infantum*. Na reação foram utilizados os pares de iniciadores: Lp_F e LpFlag_R para amplificar Flag; Lp_F e LpSup_R para amplificar Sup; e LeishActin_F e LeishActin-R para actina. Foi estabelecido que o número de repetições para os ciclos de PCR a serem usados no experimento de expressão diferencial seria de: 32 ciclos para Flag, 35 para Sup e 36 para Actina. Após o estabelecimento das condições de amplificação, uma nova reação de PCR foi realizada utilizando 1 µL de cada cDNA na diluição de 1/60. Para cada condição utilizada, foi feita reação em triplicata.

Após a visualização da amplificação em gel de agarose (Figura 4.13), foi observado que Flag é expresso em níveis similares nas formas evolutivas amastigota (Linhas 1, 2 e 3) e procíclica (Linhas 7, 8 e 9), enquanto Sup é menos expresso em promastigotas (Linhas 10, 11, 12) que em amastigotas (Linhas 4, 5 e 6). Comparando a expressão de Flag e Sup dentro de cada forma evolutiva, Flag é expresso em níveis maiores que Sup na forma procíclica (Linhas 10, 11 e 12) enquanto Flag é apenas um pouco mais expresso do que Sup em amastigotas (Linhas 4, 5 e 6). Como observado no controle constitutivo (actina), a mesma quantidade de cDNA de amastigota e procíclico foi utilizado para cada condição (Linhas 13 a 18), No controle negativo para cDNA amastigota (Linhas 19 e 20) e procíclico (Linhas 21 e 22), não foi observada nenhuma amplificação para Flag (Linhas 19 e 21) e nem para Sup (Linhas 20 e 22).

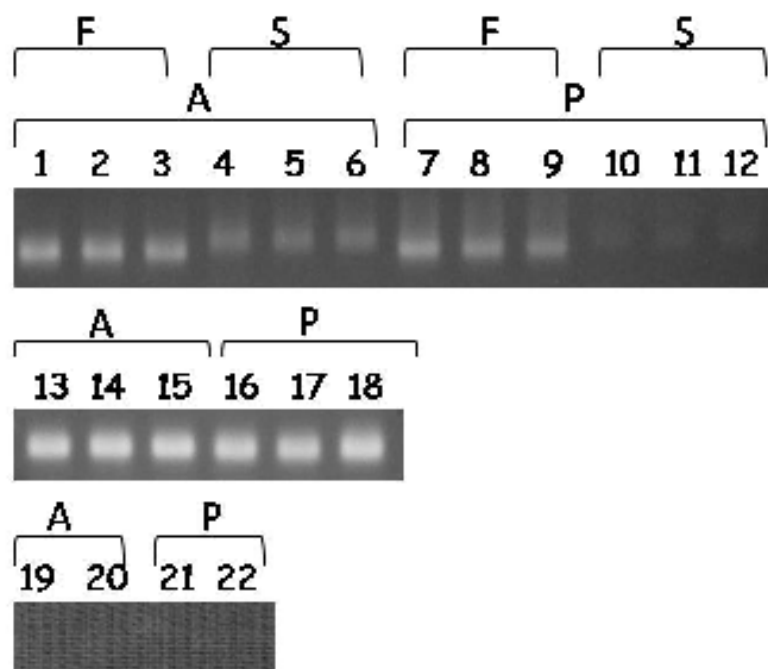


Figura 4.13: RT-PCR de Flag e Sup. Foram utilizados cDNAs das formas: amastigota (A) e procíclico (P) de *L. pifanoi*, utilizando diferentes pares de iniciadores a fim de analisar o perfil da expressão de Flag (F) (Linhas 1 a 3; 7 a 9; 19 e 21) e Sup (S) (Linhas 4 a 6; 10 a 11; 20 e 22). As Linhas 19 a 22, correspondem ao resultado de amplificação utilizando como cDNA os controles negativos e nas linhas 13 a 18 são reações utilizando os iniciadores de actina como controle constitutivo.

4.10) Quantificação da expressão dos transcrito Flag e Sup

A intensidade dos produtos de PCR foi mensurada usando o programa ImageJ. Valores de intensidade medidos para os produtos amplificados de Flag, Sup e Actina, já subtraídos do valor do fundo (background), são apresentados por suas médias aritméticas e desvio padrão (Tabela 4.1).

Também foi calculado o fator de correção para o resultado da outra reação de amplificação de actina (cDNA procíclico), com base no valor da média de intensidade do resultado da amplificação do cDNA de amastigota com iniciadores de actina.

cDNA (forma)	Flag (pixels)	Sup (pixels)	Actina (pixels)	Fator de correção
Amastigota	1,343 ± 0,081	0,701 ± 0,056	2,537 ± 0,094	1
Procíctica	1,100 ± 0,224	0,041 ± 0,002	2,500 ± 0,173	1,0149

Tabela 4.1. Média e desvio padrão de intensidade de produtos de RT-PCR e fator de correção para padrão de gene constitutivo

A normalização foi feita multiplicando cada valor de intensidade das amplificações com os iniciadores de Flag e Sup pelo seu fator de correção correspondente. O gráfico foi feito plotando os resultados no programa GraphPad prisma 5 (Figura 4.14)

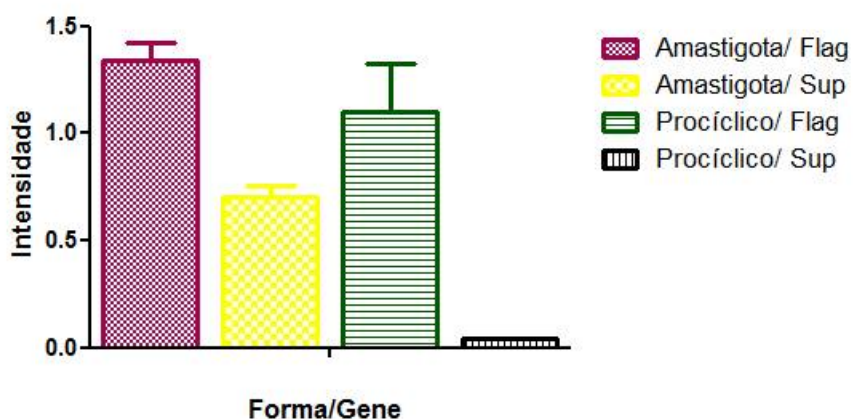


Figura 4.14: Intensidade normalizada dos produtos amplificados em função do cDNA utilizado na PCR. Em Y representa a intensidade em pixels.

4.11) Localização celular de Flag e Sup nas formas procícticas e amastigota de leishmanias.

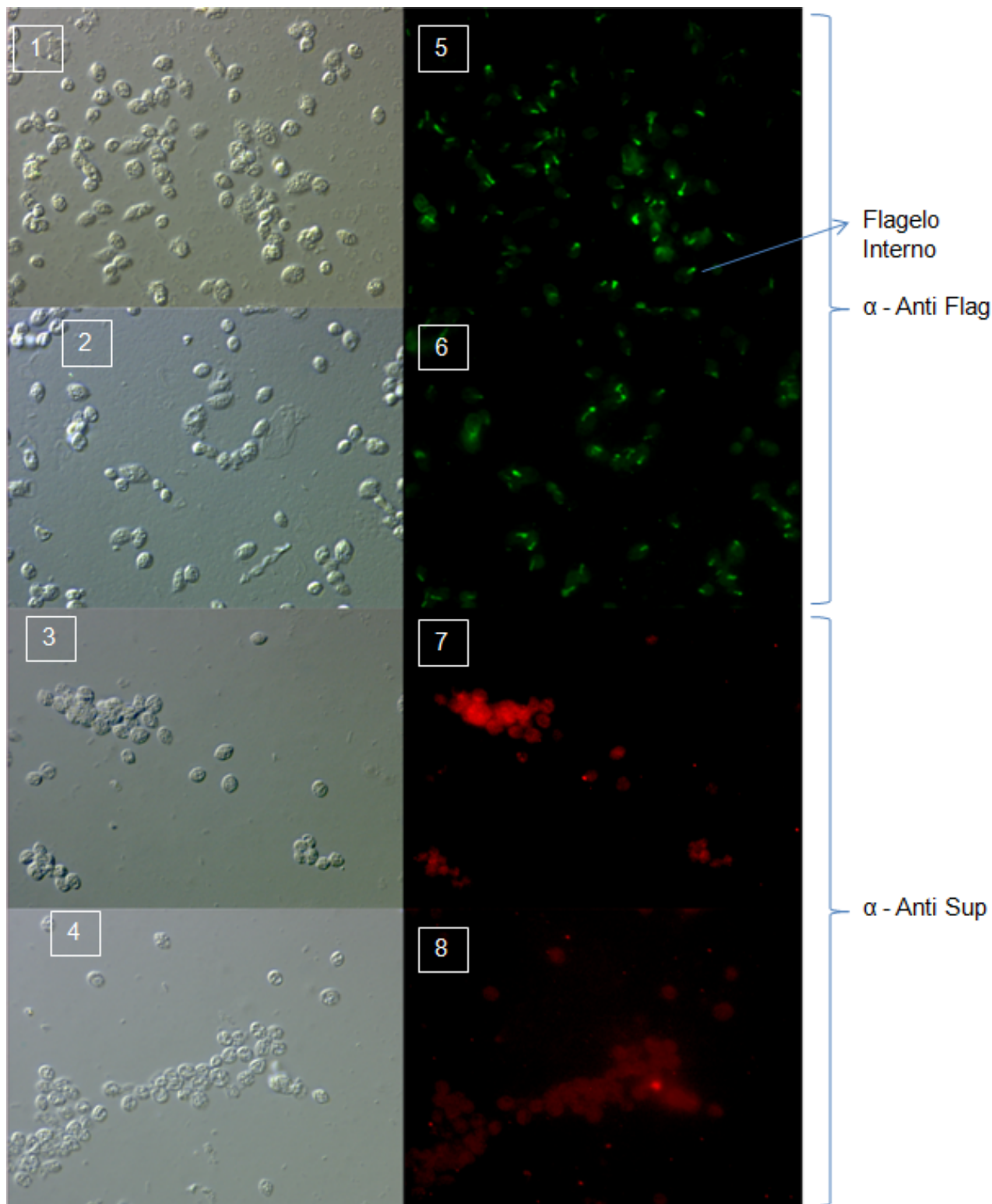
Culturas de promastigotas em fase exponencial de *L. chagasi*, *L. pifanoi* e *L. amazonensis*, assim como cultura da forma amastigota de *L. pifanoi*, foram usadas no experimento de localização celular de Flag e Sup por imunofluorescência indireta, utilizando os anticorpos primários monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup

A marcação com o anticorpo monoclonal anti-Flag na forma amastigota de *L. pifanoi* (Figura 4.15A, 5 e 6) foi observada na bolsa flagelar e no flagelo interno curto, e nas formas procícticas de *L. pifanoi* (Figura 4.15B, 5 e 6), *L. chagasi* (Figura

4.15C, 5 e 6) e *L. amazonensis* (Figura 4.15D, 4 e 5) ao longo de todo flagelo, na bolsa flagelar e em alguns parasitas, uma marcação muito fraca na superfície celular. A marcação com o anticorpo policlonal anti-Sup na forma amastigota de *L. pifanoi* (Figura 4.15A, 7 e 8) foi observada por toda a superfície do corpo; e nas formas procíclicas de *L. pifanoi* (Figura 4.15B, 7 e 8) e *L. chagasi* (Figura 4.15C, 7 e 8) por toda superfície e em alguns parasitas uma fraca marcação no flagelo.

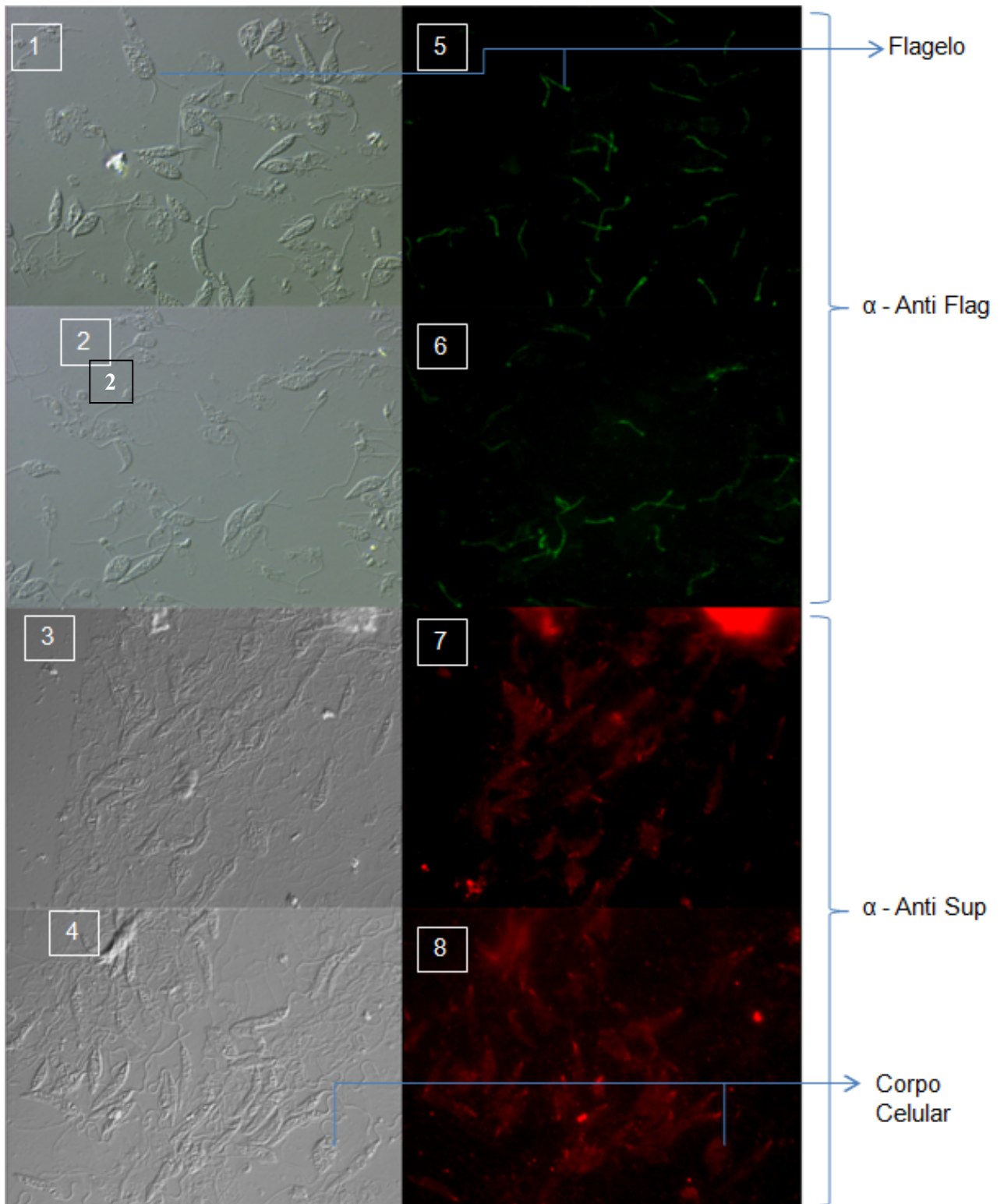
Amastigota de *L. pifanoi*

A



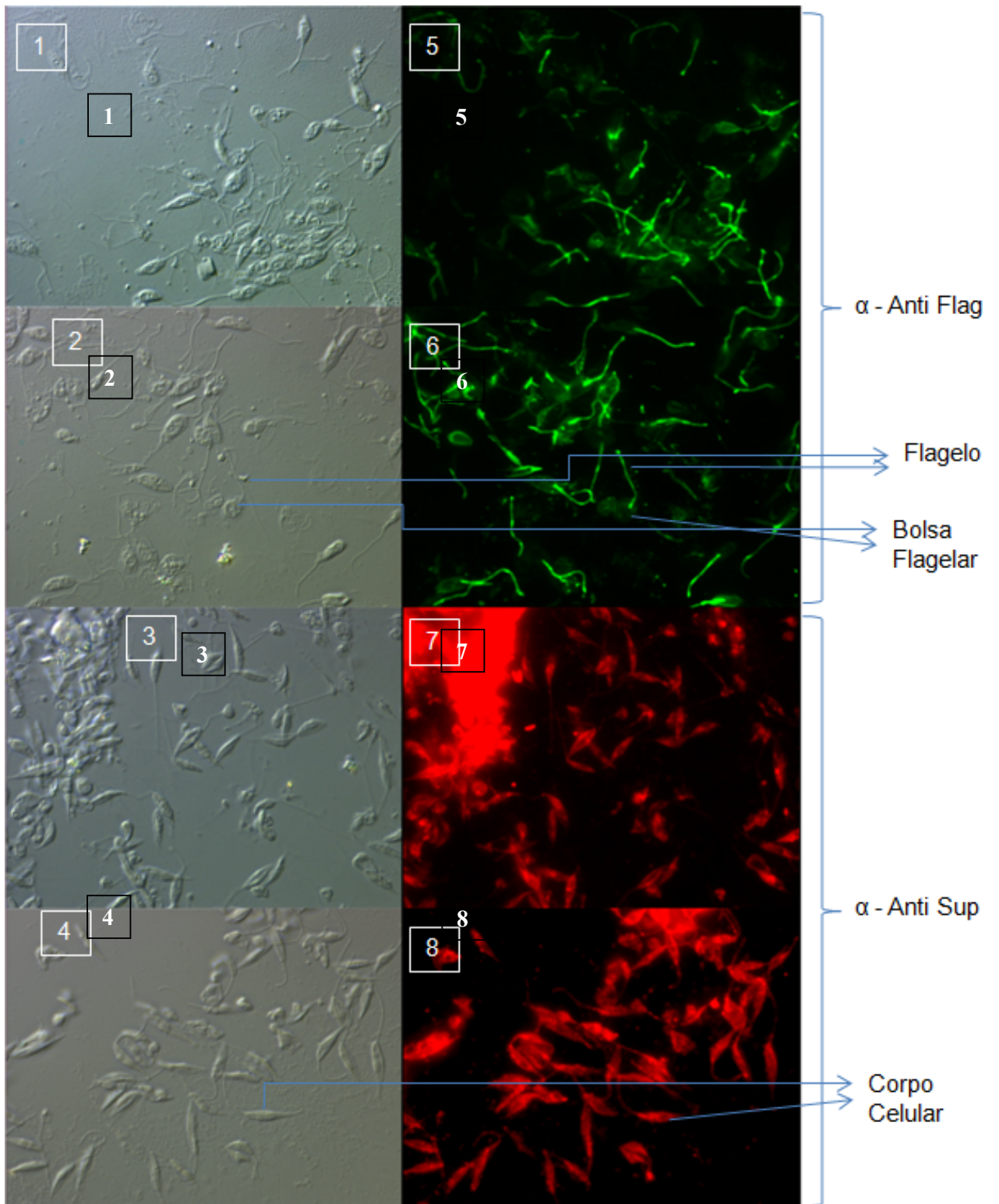
Promastigota de *L. pifanoi*

B



Promastigota de *L. chagasi*

C



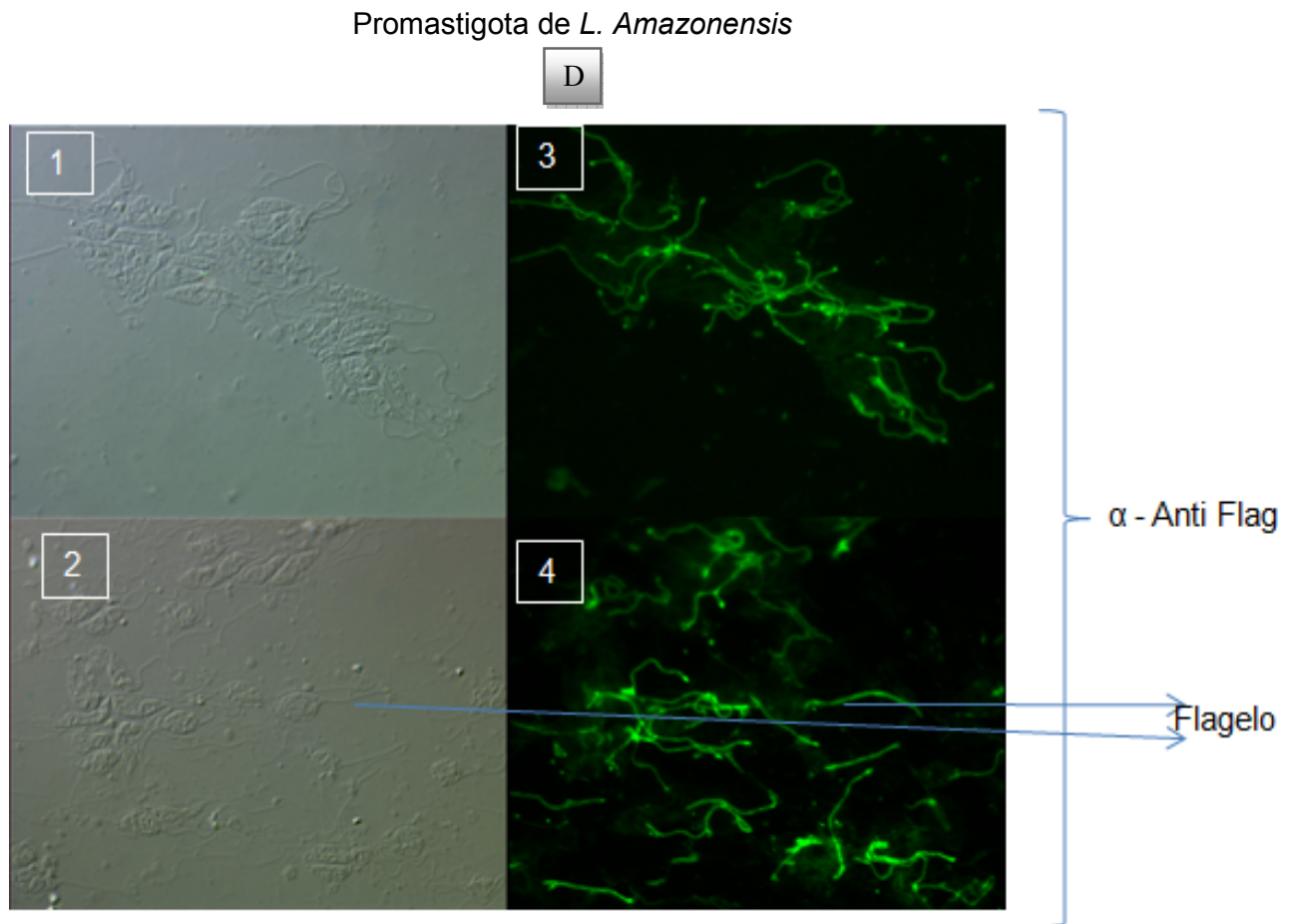


Figura 4.15: Imunofluorescência indireta de *Leishmania* localizando Flag e Sup. (A) Marcação de amastigota de *L. pifanoi* com anticorpo monoclonal anti Flag (A, 5 e 6) e policlonal anti-Sup (A, 7 e 8); (B, C e D). Marcação com o anticorpo monoclonal anti-Flag nos procíclico de *L. pifanoi* (B, 5 e 6), *L. chagasi* (C, 5 e 6) e *L. amazonensis* (D, 3 e 4) e com o policlonal anti-Sup nos procíclicos de *L. pifanoi* (B, 7 e 8) e *L. chagasi* (C, 7 e 8)

4.12) Anticorpos monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup inibem a ligação de *L. chagasi* ao intestino médio de *L. longipalpis*.

Anticorpos monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup foram usados para testar o papel de Flag e Sup na ligação de *L. chagasi* ao intestino médio de *L. longipalpis* *ex-vivo*. Experimento prévio, incubando 2×10^7 parasitas com o intestino em 2 diferentes tempos de incubação: 25 min e 45 min, demonstrou que a incubação de 25 min foi mais eficiente que de 45 min (Figura 4.16).

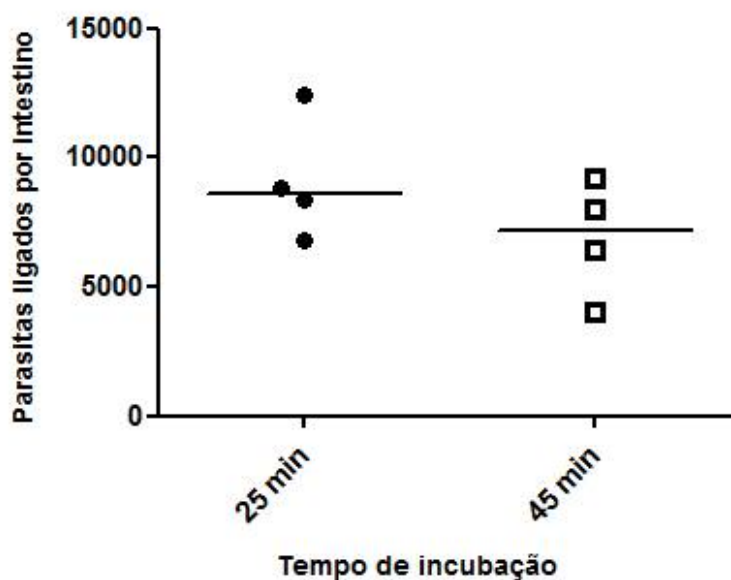


Figura 4.16: Ligação de parasitas *L. chagasi* ao intestino de *L. longipalpis*, testando 2 períodos de incubação: 25 min (●) e 45 min (□).

Promastigotas procíclicos de *L. chagasi*, numa concentração de 2×10^7 , foram incubados previamente com anticorpo monoclonal anti-Flag ou PBS, numa diluição de 1:100, por 30 min em meio RPMI suplementado e então incubados com os intestinos abertos por 25 min. Após as lavagens, o anticorpo monoclonal anti-Flag mostrou uma inibição no número de parasitas ligados ($P= 0,0158$) comparado com o intestino pré-incubado com PBS (Figura 4.17A). O mesmo experimento foi realizado com o anticorpo policlonal anti-Sup ou soro pré-imune, na diluição de 1:100, e foi observado também uma inibição da ligação dos parasitas ($P= 0.0496$) comparado com o intestino pré-incubado com soro pré-imune (Figura 4.17B).

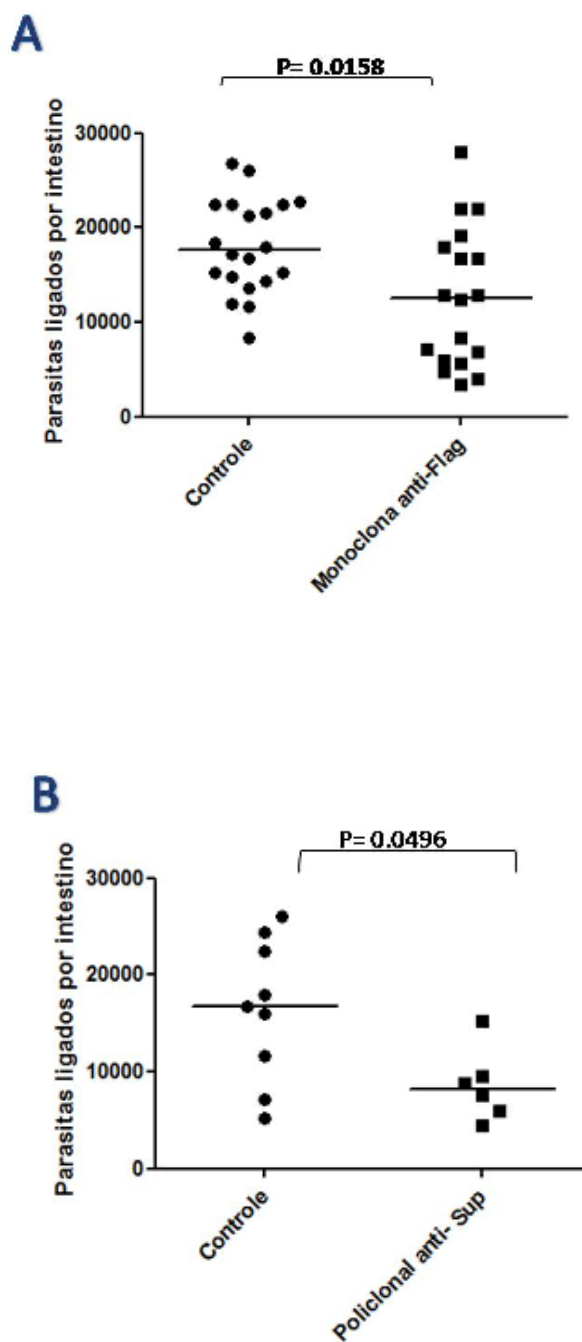


Figura 4.17: Inibição da ligação ex-vivo. Ligação ex-vivo de 2×10^7 parasitas *L. chagasi* ao intestino de *L. longipalpis*, previamente incubados com 1:100 de: (A) PBS (●) ou anticorpo monoclonal anti-Flag (■); (B) soro pré-imune (●) ou anticorpo policlonal anti-Sup (■).

4.13) Identificação de uma proteína do intestino que se liga ao parasita biotinilado

Para identificar um potencial receptor para *L. chagasi*, proteínas do intestino de *L. longipalpis* alimentados com sangue foram separadas por SDS-PAGE, transferidas a membrana de nitrocelulose e incubadas com parasitas biotinilados. A revelação da reação (Figura 4.18) mostrou a presença de uma proteína no intestino de aproximadamente 27 kDa, que aparece nos 3 experimentos, quando incubados com o parasita biotinilado (Linhas 2, 4 e 6). Nas membranas que não foram incubadas com o parasita biotinilado (Linhas 1, 3 e 5), controle das reações, uma proteína de aproximadamente 129 kDa apareceu marcada.

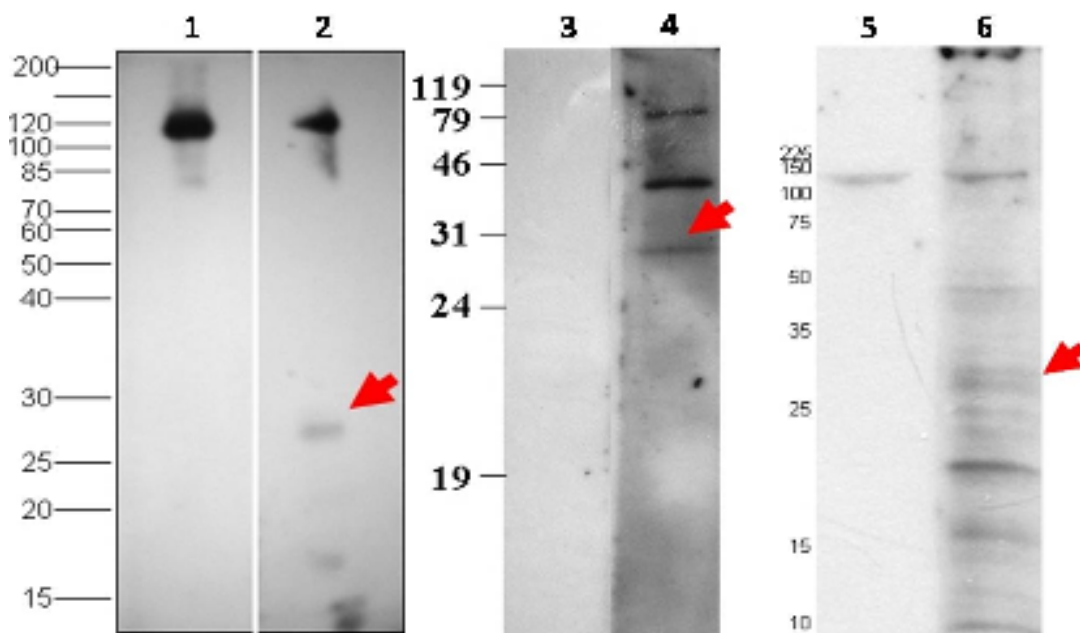


Figura 4.18: Ligand Blot de proteínas do intestino de *L. longipalpis* com parasita biotinilado. Extrato protéico total de intestino de *L. longipalpis* dissecado 72 hs após alimentação sanguínea, interagindo com *L. chagasi* biotinilada de cultura de fase log (linhas 2, 4 e 6) e controle (1, 3 e 5)

4.14) “Pull Down” de extrato protéico de células embrionárias de *L. longipalpis* (LL5)

Na tentativa de identificar uma proteína de *L. longipalpis* que se liga a proteína Flag ou Sup, experimento de “Pull Down” (Figura 4.19) com extrato protéico de células embrionárias de *L. longipalpis*, LL5, foi realizado neste primeiro momento. O pellet e o sobrenadante de cada condição: resina pura (Linhas 2 e 3), resina conjugada a proteína de fusão Flag/MBP (Linhas 4 e 5), resina conjugada a proteína recombinante Sup (Linhas 6 e 7) e resina conjugada a MBP (Linhas 8 e 9); incubados previamente com células LL5, foram separados eletroforéticamente e o gel corado pela prata. Comparado com o controle (Linhas 2 e 3), vemos o perfil protéico, em todas as outras condições, das células LL5. Nas condições com resina conjugada a Flag (Linhas 4 e 5) e na conjugada com MBP (Linhas 8 e 9) aparece em cada uma 1 banda forte de 57.5 kDa e 42.5 kDa, que corresponde às proteínas, respectivamente.

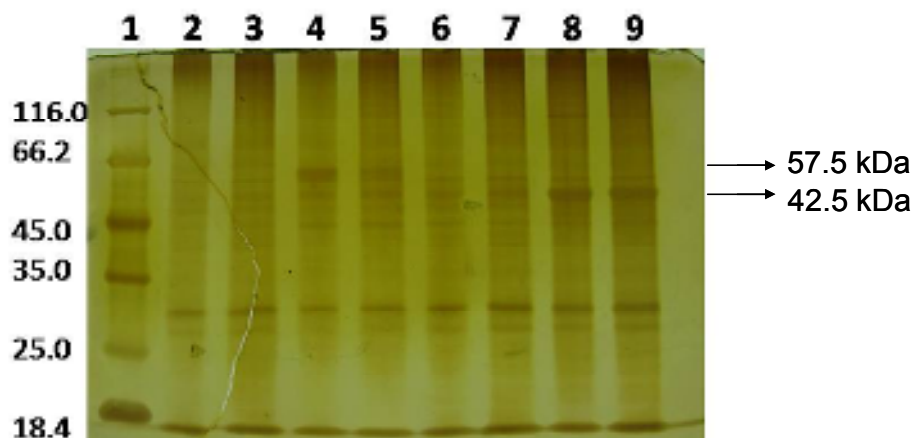


Figura 4.19: Resultado do experimento de Pull Down em gel de SDS-PAGE corado pela prata. A linha 1 corresponde ao padrão de massa molecular; linhas 2 e 3 ao controle negativo; linhas 4 e 5 a proteína de fusão Flag/MBP conjugada a resina; linhas 6 e 7 a proteína recombinante Sup conjugada a resina; linhas 8 e 9: MBP conjugada à resina.

Enquanto existem muitos estudos moleculares sobre mosquitos vetores e sua interação com vírus e parasitos, principalmente plasmódios, poucos são os dados em *L. longipalpis*, e muito pouco se sabe sobre as bases moleculares envolvidas no processo de interação entre flebotomíneos e *Leishmania*. A compreensão destas bases moleculares é de fundamental importância para estudos de competência vetorial e transmissão da leishmaniose.

A habilidade do parasita *Leishmania* de se ligar ao intestino do flebotomíneo, durante a excreção do bolo alimentar digerido, é essencial para o desenvolvimento da transmissão da infecção. Em estudos prévios de interação de *Leishmania* em flebotomíneos específicos, exemplificado pelo par natural *P. papatasi* e *L. major*, tem-se relatado a importância da molécula de LPG, presente na superfície do parasita, na adesão ao intestino do vetor (Kamhawi et al., 2000, 2004 e 2006; Sacks et al., 2000; Butcher et al., 1996; Pimenta et al., 1994). A adesão de *L. major* ao intestino de *P. papatasi* é mediada por modificações da molécula de galactose nas unidades repetidas da molécula de LPG. Esta observação foi inicialmente verificada em experimentos usando *L. major* mutante, deficiente na galactosilação da molécula de LPG, que perdeu a capacidade de manter a infecção no intestino de *P. papatasi*, após a excreção do bolo alimentar. Caracterização bioquímica deste mutante revelou uma similaridade estrutural com o LPG de *L. donovani*, uma espécie cuja inabilidade de se ligar e manter a infecção no intestino de *P. papatasi* tem sido correlacionado com a ausência de resíduos de galactose na cadeia lateral da sua molécula de LPG (Butcher et al., 1996).

Por outro lado, observações iniciais por microscopia eletrônica do flagelo aderindo firmemente as células epiteliais do intestino (Killick-Kendrick et al., 1974), levantaram a hipótese de que outra molécula, que não o LPG, poderia estar envolvida no processo de adesão ao intestino de flebotomíneos. Cuvillier et al. em 2003, utilizando promastigotas de *L. amazonensis* expressando a proteína G mutante LdARL-3A, observaram que a super-expressão desta proteína conduzia ao desaparecimento do flagelo. Quando estes parasitas aflagelados foram usados em infecção artificial de *L. longipalpis*, estes desapareceram do intestino do inseto após

digestão/ excreção do bolo alimentar, mostrando assim a importância do flagelo na adesão. Além disto, *L. major* mutante na molécula de LPG foi capaz de manter a infecção no intestino de vetores permissíveis (Myskova et al., 2007). Foi visto também que anticorpo monoclonal obtido a partir de frações flagelares de *Leishmania* reconhecia uma proteína flagelar (Flag) e que o mesmo era capaz de inibir a adesão do parasita a frações do intestino do flebotomíneo (Ismach et al., 1989, Warburg et al., 1989). Dada a possibilidade de outras moléculas do parasita estarem envolvidas no processo de adesão ao intestino do flebotomíneo, iniciamos um processo de caracterização de duas proteínas da *Leishmania* nomeadas como Flag e Sup. Escolhemos como objeto de nossos estudos o par natural *L. chagasi* - *L. longipalpis*, pelo fato de serem os principais responsáveis pela leishmaniose visceral no Brasil

A sequência de Flag de *L. chagasi*, não disponível em banco de dados, foi obtida a partir da amplificação e seqüenciamento do gene (Figura 4.2). Observamos que a sequência obtida possui um sinal de miristilação na extremidade N-terminal que é característico das proteínas pertencentes à família SMPs. Este sinal de miristilação é requerido para o direcionamento da proteína para o flagelo (Tull et al., 2004). Foi realizado um alinhamento através do programa blast contra um banco de seqüências de tripanosomatídeos e através de um alinhamento múltiplo com seqüências de maiores hits, verificamos que Flag de *L. chagasi* apresenta uma alta similaridade com seqüências de Flag depositadas das espécies de *L. infantum*, *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei* (Figura 4.3A). Esta alta similaridade observada sugere um alto grau de conservação da proteína nos parasitas tripanosomatídeos, possivelmente resultado de uma forte pressão seletiva que fez com que a proteína sofresse poucas modificações ao longo do processo evolutivo.

Como observado na árvore filogenética (Figura 4.3B), apesar de serem proteínas com alto grau de conservação, conseguimos visualizar a formação de um grupo pertencente ao gênero *Leishmania*, outro a *T. cruzi* e como grupo externo *T. brucei*. O que podemos inferir a partir dos clades formados é que as modificações tenham surgido em função do ciclo de vida de cada gênero, já que *Leishmania* e *T.*

cruzi se aderem ao intestino dos seus respectivos vetores enquanto que *T. brucei* não se adere ao intestino para estabelecer a infecção, apenas penetra-o para cair na homolinfa. Proteínas que apresentam um grau de similaridade maior do que 30%, podem ser consideradas como proteínas que possuem a mesma função (homólogas). Dado o alto grau de similaridade entre as sequências de Flag, podemos inferir que a proteína tenha a mesma função nestas espécies de tripanosomatídeos.

Experimento de Dot Blot (Figura 4.10) foi feito para testar a reatividade do monoclonal anti Flag, policlonal anti-Flag/MBP, policlonal anti-Sup e policlonal anti-MBP, com as proteínas expressas Flag, Sup e MBP. Observamos que o anticorpo monoclonal não reconheceu nenhuma proteína. O fato dele não ter reconhecido a proteína de fusão Flag/MBP, pode ter sido por razões estruturais da proteína na qual o sítio de reconhecimento pudesse não estar exposto. O anticorpo policlonal anti-Flag/MBP reconheceu a proteína de fusão Flag/MBP e também a proteína MBP. Era esperado que o anticorpo reconhecesse a proteína MBP, uma vez que a proteína de fusão Flag/MBP, a partir do qual foi obtido, possui a proteína de fusão MBP. O mesmo resultado foi visto com o anticorpo policlonal anti-MBP, que reconheceu a proteína de fusão Flag/MBP e MBP, por ambas terem a proteína ligadora de maltose. Já o anticorpo policlonal anti-Sup, além de reconhecer a proteína recombinante Sup a partir do qual foi obtido, reconheceu as outras proteínas usadas. A repetição do experimento com diluições maiores do anticorpo Sup, iria responder a questão se o reconhecimento da proteína Flag/MBP e MBP, foi inespecífico.

Resultados de experimentos de Western Blot com proteínas totais das espécies de promastigotas de *Leishmania* utilizando anticorpos monoclonal e policlonal anti-Flag/MBP, reforçam a idéia de que Flag seja uma proteína conservada (Figura 4.11B e C). Além disto, observamos que Flag é expressa em maior quantidade em *L. chagasi* e *L. donovani*, espécies que causam a leishmaniose visceral; enquanto que nas espécies que causam a leishmaniose tegumentar: *L. pifanoi*, *L. major*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*, Flag é expresso em níveis menores

A diferença de intensidade de marcação observada entre as espécies pode não estar ligada à quantidade de proteína (expressão), mas sim ao fato do anticorpo ser mais específico para uma dada sequência protéica, apesar de Flag ser bastante conservado entre as espécies de *Leishmania*. Como a mesma quantidade de proteína de cada espécie foi utilizada (Figura 4.11A), este resultado nos sugere de que pode ocorrer expressão diferencial da proteína dependendo da espécie de *Leishmania* investigada. Estes resultados são diferentes dos obtidos por Tull e colaboradores em 2004. Neste artigo foi visto por Western blot que Flag era expresso em níveis comparáveis em procíclicos de *L. major*, *L. donovani* e *L. mexicana*, utilizando anticorpo policlinal contra a região C-terminal de Flag de *L. major*.

Realizamos experimento similar utilizando anticorpo policlinal anti-Sup de *L. amazonensis*, onde observamos uma forte marcação da proteína de 15 kDa de *L. chagasi* e *L. donovani* e uma fraca marcação em *L. pifanoi*, *L. amazonensis* e *L. major*, como visto com o anticorpo monoclonal e policlinal anti-Flag; e ausência de marcação em *L. mexicana* (Figura 4.11D). A marcação inespecífica de outras bandas observadas neste experimento, pode ter ocorrido devido a presença de histidina nestas proteínas, lembrando que a proteína recombinante Sup a partir do qual foi obtido o anticorpo é conjugado a uma cauda de histidina.

Leifso et al. em 2007 mostraram por tecnologia de microarranjo, que 94% dos genes analisados em *L. major* eram expressos nas formas evolutivas amastigotas e promastigotas. Este resultado demonstra que a maior parte do genoma de *L. major* é expresso constitutivamente em ambos os estágios de vida. Por isotope coded affinity tag e espectrometria de massa, os autores observaram que 72% das proteínas identificadas em promastigota e amastigota axênica de *L. infantum* eram constitutivamente expressas em ambos os estágios. Como as seqüências de Flag e Sup são bastante parecidas, primers foram desenhados para diferenciar os dois genes (Figura 4.12), com o objetivo de analisar a expressão gênica por RT-PCR nas formas amastigota e procíclica de *L. pifanoi*. Que foi utilizada neste experimento de

análise da expressão gênica, devido a disponibilidade de uma cultura de amastigotas axênicas estabelecida. Os resultados de RT-PCR (Figura 4.13 e 4.14) sugerem que os genes Flag e Sup são transcritos diferencialmente entre as espécies, com uma diferença de transcrição significativa de Sup de amastigota em relação a Sup de promastigota. Além disto, observamos que na forma amastigota há mais transcritos do gene Flag do que do gene *sup*, o mesmo valendo quando se observa a transcrição destes genes na forma procíclica, com a ressalva de que *sup* é transcrito em níveis bem baixos. Esperaríamos que a forma amastigota, por possuir um flagelo interno curto, tivesse uma baixa transcrição de Flag, o que não foi observado.

Como a normalização com um controle interno apropriado é crítico para a geração de resultados confiáveis com significância biológica, foram utilizados primers que amplificam uma região conservada do gene da actina nas espécies de *Leishmania*. Na figura 4.13, observamos que a mesma quantidade de RNAm foi utilizada para as formas amastigota e procíclica na reação com os primers de actina. A ausência de DNA genômico foi confirmada nos controles negativo, o que nos assegura que o resultado observado no experimento de RT-PCR está relacionado unicamente com os transcritos.

Em relação à localização celular destas proteínas, alguns estudos já tinham sido feitos. Ismach et al. em 1989, utilizando o mesmo anticorpo monoclonal anti-Flag, observaram por microscopia de imunofluorescência marcação no flagelo de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* e, além disto, viram que a intensidade era mais forte em *L. amazonensis*. Tull et al. em 2004, também observaram por imunofluorescência indireta, marcação no flagelo de promastigota de *L. major* utilizando o anticorpo policlonal anti-região C-terminal de Flag e por Western blot observaram ausência da proteína na forma amastigota derivado de lesão de *L. major*.

Nós investigamos a localização das proteínas Flag e Sup por imunofluorescência indireta, nas formas procíclica de *L. pifanoi*, *L. chagasi* e *L. amazonensis* e amastigota de *L. pifanoi* (Figura 4.15). Utilizando o anticorpo monoclonal anti-Flag, foi observada marcação na bolsa flagelar e no flagelo interno na forma amastigota de *L. pifanoi* evidenciando a presença da proteína Flag ao contrário do observado no experimento de Western Blot de Tull (2004). Entretanto, nas formas procíclicas de *L. pifanoi*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, marcações foram visualizadas ao longo do flagelo, na bolsa flagelar e, em alguns parasitas, na superfície celular. Além disso, a intensidade de marcação no flagelo de procíclicos de *L. chagasi* e *L. amazonensis* foi mais forte do que em *L. pifanoi*, sugerindo uma maior abundância da proteína nestas duas espécies. A marcação observada na bolsa flagelar é coerente ao relembramos que o flagelo emerge desta estrutura e de que a bolsa é responsável pelo tráfico de proteína. Como só foi observada marcação anti-Flag no corpo em alguns parasitas, podemos sugerir que tal marcação tenha sido inespecífica. A repetição do experimento utilizando uma menor concentração do anticorpo, responderia a esta questão. Utilizando o anticorpo policlonal anti-Sup, foi observada marcação na superfície do corpo na forma amastigota de *L. pifanoi* e procíclica de *L. pifanoi* e *L. chagasi*, além de uma leve marcação no flagelo de alguns parasitas. A marcação observada no flagelo pode significar a presença da proteína Sup nesta estrutura ou uma marcação inespecífica. Uma vez que o anticorpo policlonal foi obtido a partir da proteína Sup, que é bem parecida com Flag, o anticorpo produzido pode não ser tão específico para Sup. Observamos também que a intensidade de marcação em procíclicos de *L. chagasi* é maior do que procíclicos de *L. pifanoi*.

A utilização de anticorpos em ensaios de inibição ex-vivo, tem sido utilizado para avaliar a capacidade de inibição da adesão de promastigotas ao intestino do flebotomíneo (Kamhawi et al., 2004, Warburg et al., 1989). Pinto da Silva et al. em 2005, observaram que incubando *L. amazonensis* previamente com anticorpo monoclonal 3A1-La, que reconhece um epítopo do parasita, houve inibição da adesão ao intestino de *L. longipalpis*. Além disto, eles observaram que esta inibição

era dose dependente, sugerindo que o epítopo, que é reconhecido pelo anticorpo monoclonal 3A1-La, é importante para a adesão de promastigotas às células epiteliais do intestino do vetor. Saraiva et al. em 2006 observaram que incubando previamente parasitas com anticorpo anti-F ML, que é um ligante de manose e fucose de *L. donovani*, houve inibição da ligação de *L. chagasi* e *L. donovani* ao intestino de *L. longipalpis*. É sugerido que existe um receptor específico para F ML no intestino de *L. longipalpis* envolvido na adesão de *L. chagasi* e *L. donovani*.

Com o intuito de avaliar o papel de Flag e Sup no processo de adesão, *L. chagasi* incubados previamente com anticorpo monoclonal anti-Flag e policlonal anti-Sup, foram incubados com o intestino inteiro de *L. longipalpis* em ensaios *ex-vivo*. Estas condições são diferentes das empregadas no experimento por Warburg et al. em 1989, onde uma suspensão de flagelos de *L. major* previamente incubada com o monoclonal anti-Flag foi colocada em contato com intestinos de *P. papatasi*, e foi observada uma inibição da interação. Em nosso experimento, observamos que pré-incubação dos parasitas com o monoclonal resultou numa diminuição significativa de promastigotas ($p= 0,0158$) ligados ao intestino de *L. longipalpis* em comparação ao controle (Figura 4.17A). A mesma inibição da ligação foi observada com o anticorpo policlonal anti-Sup ($p=0,0496$) (Figura 4.17B). Como o número de intestinos ($N=6$) foi pequeno no experimento com o policlonal anti-Sup, é necessário fazer novos experimentos para aumentar este n e confirmar a inibição observada. Vale acrescentar que os parasitas pré-incubados com os anticorpos permaneceram viáveis e móveis como o controle, ao final do experimento. Como os anticorpos utilizados foram capazes de inibir a adesão de *L. chagasi*, podemos sugerir a presença de um receptor no intestino de *L. longipalpis* que reconhece a proteína Flag e/ou Sup do parasita.

Muitas das interações parasita-hospedeiro são baseadas em eventos mediados por receptor. Em termos da identificação de uma molécula no intestino do flebotomíneo que esteja envolvido no processo de adesão do parasita, foi descrita a presença de uma galectina no intestino de *P. papatasi* que reconhece a molécula de

LPG de *L. major* (Kamhawi et al., 2004). Na tentativa de identificarmos um possível receptor no intestino de *L. longipalpis* experimentos de “ligand blot” (Figura 4.18), conforme descritos por Dias et al. em 2007 foram utilizados. Proteínas totais do intestino de *L. longipalpis* separados numa membrana de nitrocelulose foram incubadas com *L. chagasi* previamente biotinilados. Observamos a marcação de uma proteína de 129 kDa nos controles, que provavelmente corresponde a uma proteína endógena biotinilada no intestino do inseto. Este tipo de reação com avidina abre precedente para uma ampla gama de interações e marcações inespecíficas, pois se sabe que muitas proteínas são naturalmente biotiniladas, por isto a necessidade de um controle. Além disso, foi vista a marcação de uma proteína de aproximadamente 27 kDa que aparece nas condições de incubação com o parasita biotinilado. Esta banda não aparece no controle. Especulamos que esta proteína específica possa ser um candidato a receptor que reconhece uma molécula na superfície do parasita.

Acreditamos que no intestino de vetores permissíveis como *L. longipalpis*, o receptor presente no intestino possa reconhecer moléculas conservadas entre as espécies do parasita *Leishmania*. Na tentativa de complementar os resultados obtidos no “ligand blot”, experimento de “pull down” foi realizado (Figura 4.19). Neste primeiro momento foram usadas proteínas das células LL5, que são células embrionárias de *L. longipalpis*, para testarmos a técnica e devido ao fato destas células serem de fácil obtenção. As proteínas alvos, Flag e seu controle MBP, e Sup, foram conjugadas a resina de sefarose e incubadas com extrato protéico de células LL5. Observamos que a resina controle não conjugada, exibiu um padrão de bandas similar ao padrão de bandas da resina conjugada com proteína de fusão Flag/MBP, MBP e Sup. Este perfil similar de proteínas visto em todas as condições, nos leva a deduzir que o bloqueio dos grupos ativos da resina não tenha sido eficaz permitindo que as proteínas das células LL5 se ligassem inespecificamente à resina. Logo, não foi possível a identificação de alguma proteína potencialmente envolvida na interação com o parasita. Apesar do experimento não ter produzido resultados positivos, observamos que houve conjugação das proteínas Flag e MBP, uma vez

que foi observada marcação forte das bandas referentes a estas proteínas 57,5 kDa e 42,5 kDa. Devido a concentração do gel, a marcação de 18 kDa correspondente a proteína recombinante Sup não pôde ser vista com clareza, uma vez que as proteínas menores de 18,4 kDa não tiveram uma boa separação eletroforética. A fim de melhorar o resultado obtido, poderia-se usar uma outra solução para o bloqueio dos grupos ativos da resina.

Os mecanismos de controle da leishmaniose são falhos, tanto ao nível de controle do inseto vetor quanto ao nível de tratamento, e não existe uma vacina eficaz. Logo, moléculas envolvidas no estabelecimento da *Leishmania* no hospedeiro invertebrado podem ser alvos moleculares em potencial para o combate ao parasito, pois são moléculas cruciais na manutenção do seu ciclo de vida no vetor. O papel de Flag e Sup neste processo começa a ser desvendando, porém mais estudos precisam ser feitos para elucidar a função destas proteínas.

- ↪ Alvar J, Yactayo S, Bern C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in parasitol* 22(12): 552-557
- ↪ Andrade A F B; Saraiva E M B. 1999. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitol Res* 85: 576-581.
- ↪ Bastin P, Pullen T J, Moreira-Leite F F, Gull Keith. 2000. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes and Infection* 2: 1865-1874.
- ↪ Beverley S M, Dobson D E. 2004. Flypaper for parasites. *Cell* 119: 311-312.
- ↪ Blum H, Beier H, Gross H J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- ↪ Bradford M M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254
- ↪ Brazil R P, Brazil B G. 2003. Biologia de Flebotomíneos neotropicais, In Rangel E F, Lainson R (Eds) *Flebotomíneos do Brasil*, Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 257-274.
- ↪ Butcher B A, Turco S J, Hilty B A, Pimenta P F, Panunzio M, Sacks D L. 1996. Deficiency in B1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania* sand fly interaction. *J Biol Chem.* 271(34): 20573-20579.
- ↪ Chagas E, Cunha A M.; Ferreira L C; Deane L; Deane G;Guimarães F.N; Von Paumgarten M. J.; Sá B. 1938. Leishmaniose visceral americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 33: 89-229

- ↪ Cuvillier A, Miranda J C, Ambit A, Barral A, Merlin G. 2003. Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated *LdARL-3A-Q70L* overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. *Cell Microbiol* 5(10): 717–728.
- ↪ Dantas-Torres F. 2006. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the Law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(1): 117-118.
- ↪ Dias F A, Santos A L S, Ferreira-Pereira A, Romeiro A, Zimmermann L T, Nascimento M T C, Atella G C, Saraiva E M, Linden R, Lopes A H. 2007. Development of a Ligand Blot Assay using biotinylated live cells. *J Biomol Screening* 12(7): 1006-1010.
- ↪ Evangelista L G, Leite A C R. 2002. Histochemical localization of N-acetyl-galactosamine in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*. *J Med Entomol* 39(3): 432-439.
- ↪ FUNASA. Boletim epidemiológico: Leishmaniose Visceral no Brasil, 2002.
- ↪ Gontijo C M F, Melo M N. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*, 7(3): 338-349.
- ↪ Hoare C A, Wallace F C. 1996. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212: 1358-1386
- ↪ Ilg T. 2000. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol today* 16(11): 489-497.
- ↪ Ismach R, Cianci C M L, Caulfield J P, Langer P J, Hein A, McMahon-Pratt D. 1989. Flagellar membrane and paraxial rod proteins of *Leishmania*: characterization employing monoclonal antibodies. *J Protozool*, 36(6): 617-624.
- ↪ Jacobson R L, Slutzky G M, Greenblatt C L, Schnur L F. 1982. Surface reaction of *Leishmania*. I. Lectin-mediated agglutination. *Ann Trop Med Parasitol* 76(1): 45-52.

- ↪ Kamhawi S, Modi G B, Pimenta P F P, Rowton E, Sacks D L. 2000. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitol* 121: 25-33.
- ↪ Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham V M, Kumar S, Lawyer P G, Turco S J, Barillas-Mury C, Sacks D L, Valenzuela. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119: 329-341.
- ↪ Kamhawi S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends in parasitol* 22: 439-445.
- ↪ Killick-Kendrick R, Molyneux D H, Ashford R W. 1974. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Trans R Soc Trop Medical Hyg* 68: 269.
- ↪ Lainson R, Rangel E F. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil- a review. *Mem inst Oswaldo Cruz* 100(8): 811-827.
- ↪ Landfear S M, Ignatushchenko M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 115: 1-17.
- ↪ Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster W R. 2007. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 152: 35-46.
- ↪ Lindoso J A L, Goto H. 2006. Leishmaniose Visceral: situação atual e perspectivas futuras. *Boletim Epidemiol Paulista* 26(3).

- ↪ Maingon R D C, Ward R D, Hamilton J G C, Bauzer L G S R, Peixoto A A. 2007. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? Trends in parasitol 24(1): 12-17.
- ↪ Marcelino-Nascimento L. 2005. Proteínas pequenas miristiladas, Flag e Sup, em parasitas do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*). Rio de Janeiro; Mestrado- IOC/Fiocruz.
- ↪ Mauricio I L, Stothard J R, Miles M A. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol today 16(5): 188-189.
- ↪ Molyneux D H. 1977. Vector relationships in the Trypanosomatidae. Adv Parasitol. 15: 1-82.
- ↪ Murray H W, Berman J D, Davies C R, Saravia N G. 2005. Advances in leishmaniasis. The Lancet 366: 1561-1577.
- ↪ Myskova J, Svobodova M, Beverley S M, Volf P. 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes infect 9: 317-324.
- ↪ Pimenta P F P, Turco S J, McConville M J, Lawyer P G, Perkins P V, Sacks D L. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science 256(5065): 1812-1815.
- ↪ Pimenta P F P, Saraiva E M B, Rowton E, Modi G B, Garraway L A, Beverley S M, Turco S J, Sacks D L. 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proc Natl Acad Sci 91: 9155-9159.

- ↪ Pinto-da-Silva L H, Fampa P, Soares D C, Oliveira S M P, Souto-Padron T, Saraiva E M. 2005. 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.* 35: 757-764.
- ↪ Rogers M E, Ilg T, Nikolaev A V, Ferguson M A J, Bates P A. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430:463-467.
- ↪ Rojas J L C. 1997. Biological, biochemical and molecular characterization of FLAG-1, a *Leishmania* membrane-associated flagellar protein. Yale;. Doutorado – Yale University.
- ↪ Sacks D L, Perkins P V. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417-1419.
- ↪ Sacks D L. 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol.* 3(4): 189-196.
- ↪ Sacks D L, Kamhawi S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55: 453-483.
- ↪ Sacks D L, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco S J. 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *PNAS* 97(1): 406-411.
- ↪ Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406-25.
- ↪ Saraiva E M, Barbosa A F, Santos F N, Borja-Cabrera G P, Nico D, Souza L O P, Mendes-Aguiar C O, Souza E P, Fampa P, Parra L E, Menz I, Dias-Jr J G, Oliveira S M, Palatnik-de-Souza C B. 2006. The F ML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine. *Vaccine* 24: 2423-2431.

- ↪ Simpson L. 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 41: 363-82.
- ↪ Soares R P, Macedo M E, Ropert C, Gotijo N F, Almeida I C, Gazzinelli R T, Pimenta P F P, Turco S J. 2002. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* 121: 213-224.
- ↪ Soares R P P, Turco S J. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*): a review. *An Acad Bras Cienc* 75(3): 301-330.
- ↪ Svodobova M; Volf P; Killick-Kendrick R. 1996. Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of phlebotomine sandflies. *Ann Trop Med Parasitol* 90(3): 329-336.
- ↪ Tull D, Vince J E, Callaghan J M, Naderer T, Spurck T, McFadden G I, Currie G, Ferguson K, Bacic A, McConville M J. 2004. SMP-1, a member of a new family of small myristoylated proteins in kinetoplastid parasites, is targeted to the flagellum membrane in *Leishmania*. *Mol Biol Cell* 15: 4775-4786.
- ↪ Volf P, Skarupová S, Man P. 2002. Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Eur. J. Biochem.* 269: 6294-6301.
- ↪ Volf P, Myskova J. 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in parasitol* 23(3): 91-92.
- ↪ Walters L L, Modi G b, Chaplin G L, Tesh R B. 1989. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41(3): 295-317.

↪ Warburg A, Tesh R B, McMahon-Pratt D. 1989. Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sand fly midgut epithelium. J Protozool 36(6): 613-617.

↪ World Health Organization. Division of control of tropical diseases. Leishmaniasis control. 2005. WHO/CTD.