



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DA SOBRE-EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
TRANSLOCADORA (TSPO) NA INFECÇÃO POR *Leishmania*
amazonensis

por

BEATRIZ ROCHA SIMÕES DIAS

TCC apresentado ao Instituto de Biologia
da Universidade Federal Bahia como
exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Salvador, BA
2012

Data da Defesa: 18 de julho de 2012

1. Banca Examinadora

**Patrícia Sampaio Tavares Veras
(Orientadora)**

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Marcus Welby Borges Oliveira

Universidade Federal da Bahia - UFBA

RESUMO

Em trabalho realizado por nosso grupo foi demonstrado que Macrófagos (MΦ) de camundongos CBA controlam a infecção por *L. major* e são permissivos à *L. amazonensis*, sugerindo um papel importante destas células na resolução da infecção. Com intuito de identificar potenciais alvos envolvidos na infecção por *Leishmania*, utilizou-se uma abordagem proteômica, e dentre as proteínas identificadas, foi observado que a expressão da Proteína Translocadora (TSPO), está negativamente modulada na infecção por *L. amazonensis*. Assim, o presente trabalho visa avaliar o papel do TSPO na infecção por *Leishmania*. Inicialmente, a sequência do gene do TSPO foi obtida por RT-PCR a partir de RNAm de macrófagos de camundongo CBA infectados com *L. major* e clonada no pcDNA6.2/C-EmGFP-DEST utilizando o sistema Gateway™. A clonagem do TSPO foi confirmada por sequenciamento e alinhamento com a sequência deste gene disponível no GenBank. Para obtenção de clones sobre-expressando o TSPO, células de linhagem macrófagica J774 foram submetidas à transfecção estável com os plasmídeos pcDNA6.2-TSPO e pcDNA6.2. As células transfectadas com o pcDNA6.2-TSPO apresentaram baixa taxa de sobrevivência em comparação com o controle. A fim de avaliar a funcionalidade do plasmídeo, células CHO foram transfectadas de forma transitória com o pcDNA6.2-TSPO e com imunofluorescência foi demonstrado que as células CHO pcDNA6.2-TSPO apresentaram marcação mais intensa que as CHO pcDNA6.2. Uma vez confirmada a funcionalidade do plasmídeo, foi realizada nova tentativa de transfecção estável de células J774 com pcDNA6.2-TSPO. Apesar destas células continuarem a apresentar alta letalidade, foram obtidos dois clones: J774 pcDNA6.2-TSPO clone 1 e J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2. A expressão do TSPO mostrou-se aumentada 2,09 vezes nas J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2 em comparação com J774 no entanto o clone 1 apresentou uma alteração da expressão do TSPO pouco significativa em comparação ao controle, por análise quantitativa de *western-blot*. Em seguida, os diferentes clones foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e não foi observada diferença no percentual de células infectadas nem no número de parasita por células infectadas entre J774 pcDNA6.2-TSPO clone 1 e os controles. Entretanto, o clone 2 apresentou uma redução no número de células infectadas, no tempo de 6 horas. Essa redução não foi observada no tempo de 48 horas. Nossos dados sugerem que a sobre-expressão do TSPO reduz a fase inicial da infecção de células J774 por *L. amazonensis*. Visto que, foi realizada apenas um experimento em triplicata faz-se necessário o desenvolvimento de estudos adicionais para elucidar o papel desempenhado pelo TSPO na infecção por *Leishmania*.

Palavras-chave: Proteína Translocadora, *Leishmania*, infecção

ABSTRACT

Previous work has shown that macrophages from CBA mice control infection by *L. major* yet are permissive to *L. amazonensis*. In order to identify potential targets involved in *Leishmania* infection, we used a proteomic approach. Translocator Protein (TSPO) was one of the proteins that found to be differentially expressed in CBA macrophages infected with *L. amazonensis* in comparison to those infected with *L. major*. This protein was shown to be downregulated during *L. amazonensis* infection. This study aims to evaluate the role TSPO plays in *Leishmania* infection. Initially, total RNA from *L. major*-infected macrophages was purified and used to obtain the gene coding for the TSPO by RT-PCR. Then, cloning of TSPO amplicon on the pcDNA6.2/C-EmGFP-DEST was performed using Gateway™ system to generate the plasmid pcDNA6.2-TSPO. The cloning was confirmed by sequencing and alignment with the TSPO gene sequence available in GenBank. Then pcDNA6.2-TSPO and pcDNA6.2 were used to transfect J774 cells obtaining, respectively, J774 cells overexpressing TSPO and control mock-transfected cells. J774 pcDNA6.2-TSPO cells showed low survival rate in comparison to control. In order to evaluate the construction of our plasmid, CHO cells were transiently transfected with pcDNA6.2-TSPO and immunofluorescence analysis demonstrated a more intense staining in CHO pcDNA6.2-TSPO cells in comparison to mock-transfected cells. Once confirmed the construction of our plasmid, we further attempt to overexpress TSPO stably in J774 cells. Although these cells continue to present high lethality, we obtained two clones: J774 pcDNA6.2 clone 1 and J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2. TSPO expression was found to be increased 2,09 times in J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2 in comparison to control cells, however we didn't detected significant differences between the J774 pcDNA6.2 clone 1 and the control, using quantitative western blot analysis. J774 cells overexpressing TSPO were infected with *L. amazonensis* metacyclic promastigotes (ratio 10:1) and the percentage of infected J774 pcDNA6.2-TSPO clone 1 shown to be similar to that in control mock-transfected cells. However, clone 2 presented a reduction in the number of infected cells after 6 hours of infection. This reduction was no longer observed after 48 hours of infection. Our data suggest a possible role of TSPO overexpression on the initial infection phase of *L. amazonensis* infected J774 cells. Since, only one experiment in triplicate was performed is necessary to carry out further studies to elucidate the role that the TSPO plays in *Leishmania* infection.

Keywords: Translocator Protein, *Leishmania*, infection

AGRADECIMENTOS

A Dra. Patrícia Veras pela orientação, apoio e por me mostrar como a pesquisa de qualidade deve ser desenvolvida;

A Carlos Eduardo Guedes pela co-orientação, dedicação e ensinamentos;

A Niara Almeida e Kercia Pinheiro pela amizade e convívio diário;

À "família" LPBI: Antônio Petersen, Camila Meira, Camila Victória, Carla Rocha Carolina Leite, Christiana Vinhas, Deborah Fraga, Flávia Paixão, Isaac Queiroz, José Geraldo Bomfim, Juliana Perrone, Lairton Borja, Leila Bastos, Luana Palma, Luciano Vasconcellos, Manuela Solcà, Marcelo Bordoni, Marcos Farias, Mateus Mota, Roberto Teixeira, Rodrigo Araújo, Samira Meireles, Sírio Melo pela ajuda diária e por tornarem meus dias mais divertidos;

Aos meus pais, Louro e Tânia, por todo amor, dedicação e incentivo a minha vida acadêmica;

À minha avó e minha irmã, Hélvia e Carla, pelo carinho, atenção e por sempre estarem torcendo por mim;

A um certo alguém por ter tornado meus dias melhores;

Aos meus amigos que me acompanharam nessa longa jornada e me ajudaram direta ou indiretamente;

Aos meus amigos da turma 2007.1, em especial Ana Camila, Carolina Prudente, Luiza Passos, Gabrielle Winandy, Pedro Dantas, Francisco Sanches, Grazielle Quintela e Vinícius Ferreira, por todos os momentos que passamos durante os cinco anos de faculdade

Meu eterno agradecimento

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

AGRADECIMENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DAS FIGURAS

LISTA DE ABREVIACÕES E ABREVIATURAS

1.INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Parasito.....	10
1.2. Modelo Murino.....	12
1.3. Interação Macrófago- <i>Leishmania</i>	14
1.4. Modelo CBA.....	16
1.4. TSPO.....	18
2.OBJETIVO GERAL.....	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Cultivo de células.....	21
3.2. Obtenção da sequência do gene codificante para o TSPO.....	22
3.3. Clonagem.....	23
3.3.1 Clonagem do TSPO no vetor de entrada.....	23
3.3.2. Transformação de <i>E. coli</i> com o Clone de entrada pENTER-TSPO.....	24
3.3.3. Reação em cadeia da polimerase das colônias transformadas com o Clone de entrada pENTER-TSPO.....	24
3.3.4. Extração do plasmídeo das colônias transformadas com o Clone de entrada pENTER-TSPO.....	25
3.3.5. Reação em cadeia da polimerase do Clone de entrada pENTER-TSPO purificado.....	25
3.3.6. Clonagem do TSPO no vetor de expressão.....	25
3.3.7. Transformação de <i>E. coli</i> com o Clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO.....	26
3.3.8. Reação em cadeia da polimerase das colônias transformadas com Clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO.....	27

3.3.9. Extração do plasmídeo das colônias transformadas com Clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO.....	27
3.3.10. Sequenciamento do Clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO.....	27
3.4. Transfecção de células J774 e CHO com o plasmídeo pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO.....	28
3.5. <i>Western blot</i> das células J774 transfectadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO.....	28
3.6. Imunofluorescência das células CHO transfectadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO.....	29
3.7. Parasitos.....	29
3.9. Separação de promastigotas metacíclicas de <i>L. amazonensis</i> usando gradiente de ficoll.....	30
3.9. Infecção de células com promastigotas metacíclicas de <i>L. amazonensis</i>	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Amplificação do gene do TSPO a partir de macrófagos de camundongos CBA.....	31
4.2. Confirmação da construção do pENTER-TSPO.....	34
4.3. Confirmação da construção do pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO.....	36
4.4. Confirmação da expressão do TSPO por células J774 e CHO transfectadas com o pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO.....	38
4.5. Infecção do clones J774 pcDNA 6.2 por <i>Leishmania amazonensis</i> .	41
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático do ciclo de vida <i>Leishmania</i> digenético.....	12
Figura 2: Estrutura do TSPO.....	19
Figura 3: Reação BP.....	23
Figura 4: Reação LR.....	26
Figura 5: PCR com gradiente de temperatura para o gene TSPO.....	32
Figura 6: Gene para o TSPO contendo os adaptadores attB purificado.....	33
Figura 7: Amplificação por PCR de colônias <i>E. coli</i> transformadas com o pENTER-TSPO.....	34
Figura 8: Amplificação por PCR dos plasmídeos purificados.....	35
Figura 9: Plasmídeos purificados.....	36
Figura 10: Alinhamento da sequência do TSPO.	37
Figura 11: Imunofluorescência das células CHO transfectadas.....	39
Figura 12: <i>Western blot</i> das células J774 transfectadas.....	40
Figura 13 – Cinética de Infecção de células J774, J774 pcDNA6.2, J774 pcDNA6.2 clone 1 e J774 pcDNA6.2 clone 2 por <i>L. amazonensis</i>	42

LISTA DE ABREVIACOES E ABREVIATURAS

- ANT – Translocador do nucleotídeo adenine (*adenine nucleotide transporter*)
- ATP – Adenosina trifosfato
- CHO – Célula de ovário de *hamster* (*Chinese hamster ovary*)
- DMEM – “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”
- DNA – cido desoxirribonucléico
- GPI – Glicofosfatidilinositol
- Gp63 – Glicoproteína de 63kDa
- H₂O₂ – Peróxido de hidrognio
- IBP – Proteína ligante de isoquinolina
- IFN- γ – Interferon-gama
- IL – Interleucina
- LC – leishmaniose cutânea
- LCD – leishmaniose cutâneo-difusa
- LMC – leishmaniose mucocutânea
- LPG – Lipofosfoglicano
- LT- Leishmaniose tegumentar
- LV – Leishmaniose visceral
- MPTP – Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*)
- NO – xido nítrico
- PBR – Receptor benzodiazepínico periférico (*periferial benzodiazepinic receptor*)
- PCR- Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- PKC – Proteína cinase C
- qRT-PCR – PCR em tempo real (real time PCR)
- RNA – cido ribonucléico
- rIFN- γ – Interferon-gama recombinante
- RT-PCR – Reação da transcriptase reversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*)
- TGF- β – Fator transformador do crescimento- β
- Th1 – Células T “helper” 1

Th2 – Células T “helper” 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (*tumour necrosis factor - α*)

TSPO – Proteína translocadora (*Translocator protein*)

VDAC – Canal de ânions dependente de voltagem (*voltage-dependent anion channel*)

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose causada por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* e representa uma doença emergente que permanece como um importante problema de saúde pública, especialmente por sua alta incidência em países em desenvolvimento (SANTOS *et al.*, 2008; PERINOTO *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde, esta doença acomete cerca de 12 milhões de pessoas em todo mundo e está presente em 88 países, dos quais 72 estão localizados em países em desenvolvimento (BASANO & CAMARGO, 2004). Além disso, 90% dos casos de leishmaniose tegumentar (LT) ocorrem em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru. Apesar de serem declarados oficialmente somente 600.000 novos casos por ano, estima-se que esse número na realidade alcance 2 milhões de pessoas e que cerca de 350 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas. Devido à grande incidência, ampla distribuição e gravidade da doença, a leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das seis doenças infecto-parasitárias de maior importância (WHO, 2010). No Brasil, a LT é endêmica, sendo registrados cerca de 30 mil casos novos por ano, atingindo todos os estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O curso da infecção por *Leishmania* apresenta características clínicas variadas que dependem de fatores do parasito e da resposta imune do hospedeiro. Existem duas apresentações clínicas principais de leishmaniose: a LT que compromete pele e mucosa e a leishmaniose visceral (LV) que atinge, principalmente, os órgãos internos. No Novo Mundo, as espécies causadoras de LT são principalmente: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania mexicana*; enquanto que as descritas no Velho Mundo são: *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopia* (GRIMALDI & TESH, 1993).

A LT é uma doença de evolução crônica que pode apresentar-se sob três formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutâneo-difusa (LCD). A LC caracteriza-se pela presença de úlcera de fundo granuloso e bordas elevadas, podendo ser única ou múltipla, com tendência à cura espontânea e boa resposta ao

tratamento. A LMC é secundária à lesão cutânea e geralmente surge após a cura espontânea ou ao tratamento inadequado da LC. Esta forma clínica de LT é caracterizada por uma lesão inicial no local da picada do flebótomo e pelo surgimento posterior de lesões metastáticas nas mucosas das vias aéreas superiores: nariz, boca e eventualmente, faringe e laringe. A LCD é uma forma rara, porém grave, de apresentação da doença, que no Brasil é causada pela *L. amazonensis*. Esta manifestação clínica inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e evolui com formação de placas e múltiplos nódulos não ulcerados por todo o corpo do paciente.

Nos últimos 20 anos o número de casos vem crescendo progressivamente, observando-se surtos epidêmicos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica. No período de 1985 a 2005, verificou-se uma média anual de 28.568 casos de LT e um predomínio nos indivíduos maiores de 10 anos, 90% dos casos, e do sexo masculino, 74% (Ministério da Saúde, 2007).

1.1. PARASITO

A leishmaniose é causada por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. Estes parasitas apresentam duas fases distintas em seu ciclo de vida: um estágio flagelado no vetor (*Lutzomyia* – Novo Mundo; *Phlebotomus* – velho Mundo) e um estágio amastigota no hospedeiro vertebrado (GRIMALDI & TESH, 1993). As formas promastigotas são circulares, com flagelo presente na bolsa flagelar e medem de 3 a 7µm de diâmetro. Por sua vez, as formas promastigotas são alongadas, flageladas e medem cerca de 10 a 20µm de diâmetro. O ciclo de vida se inicia quando os flebotomíneos fêmeas ao realizarem o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado ou em um animal reservatório ingerem macrófagos parasitados (Figura 1). A lise dos macrófagos infectados resulta na liberação das formas amastigotas no estômago dos flebotomíneos, estas rapidamente se diferenciam em promastigotas procíclicas que migram para o trato digestivo do vetor, onde se multiplicam por fissão binária (BATES & ROGERS, 2004). No intestino dos flebotomíneos ocorre a metaciclogênese, isto é, a transição das formas

promastigotas não-infecciosas procíclicas em promastigotas metacíclicas altamente infecciosas (SACKS, 1992). Neste processo, as promastigotas procíclicas sofrem um conjunto de alterações morfológicas, ultraestruturais e também na expressão gênica. Promastigotas metacíclicas são geralmente mais alongadas e finas do que as formas procíclicas e apresentam um flagelo mais alongado e maior motilidade em meio de cultura (SACKS, 1985). Além disso, as promastigotas metacíclicas apresentam um alongamento do LPG devido a um maior número de glicosforilação e o carboidrato mais abundante na porção terminal desta molécula em comparação com o presente em promastigotas procíclicas (McCONVILLE *et al*, 1992). Após transformação em formas metacíclicas, as promastigotas migram para o aparelho bucal do flebótomo e durante o novo repasto sanguíneo são inoculadas na pele do hospedeiro mamífero, juntamente com a saliva. As promastigostas são fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário, onde assumem a forma amastigota. À medida que as formas amastigotas multiplicam-se, os macrófagos se rompem e liberam os parasitas, que podem ser fagocitadas por outros macrófagos, dando continuidade ao ciclo de vida dos parasitos *Leishmania* (BATES & ROGERS, 2004).

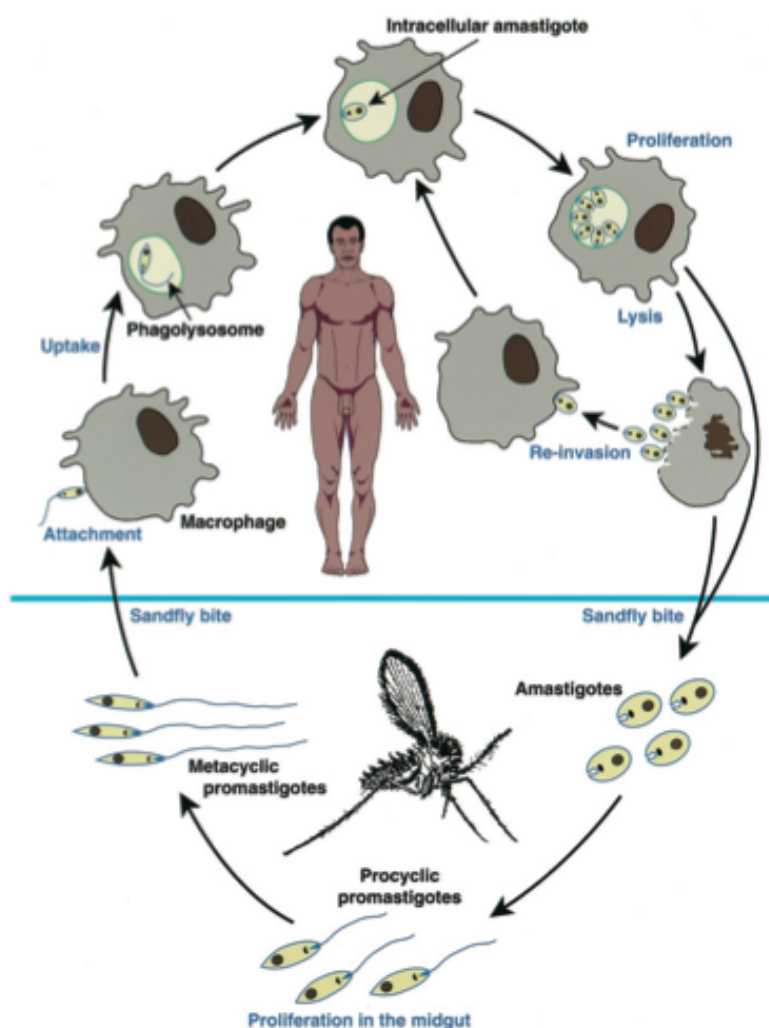


FIGURA 1. Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da *Leishmania*. (Handmam *et al*, 2001)

1.2. MODELO MURINO

Apesar de não reproduzir fielmente a doença em humanos (HANDMAM *et al*, 2001), modelos experimentais de leishmaniose têm sido desenvolvidos para a caracterização da doença e seu impacto sobre o hospedeiro (PEREZ *et al*, 1978; HOWARD *et al.*, 1980; HEINZEL *et al.*, 1989; AFONSO & SCOTT, 1993; AWASTHI *et al*, 2004). Modelos animais são capazes de mimetizar as características patológicas e as respostas imunológicas observadas em seres humanos quando expostos a uma variedade de *Leishmania* spp. com diferentes características patogênicas (GARG & DUBE, 2005). Assim como em humanos, leishmaniose murina pode apresentar cursos distintos de infecção, dependendo tanto do perfil

genético do hospedeiro quanto da espécie de *Leishmania* infectante (ANDRADE *et al*, 1984). Animais resistentes a determinadas espécies de *Leishmania* desenvolvem uma lesão pequena e localizada e são capazes de desenvolver uma resposta imune mediada por células que resulta na eliminação do parasito e na cura espontânea da lesão. Histologicamente, esta lesão é caracterizada por granuloma composto por um infiltrado proeminente de linfócitos, células epiteliais e escasso parasitismo ANDRADE *et al*, 1984; HANDMAM *et al*, 2001). Linhagens de camundongos susceptíveis demonstram lesões difusas com crescimento progressivo e intenso parasitismo. Nestes casos, há formação de infiltrados contendo um grande número de macrófagos parasitados, ausência de granuloma e uma quantidade reduzida de linfócitos e de células plasmáticas. Em animais susceptíveis se observa disseminação dos parasitos para órgãos viscerais como: baço, fígado e medula óssea, provocando alterações acentuadas na função destes e eventualmente pode resultar em morte (ANDRADE *et al*, 1984; HANDMAM *et al*, 2001).

Resistência ou susceptibilidade de uma linhagem de camundongo a uma determinada espécie de *Leishmania* está intimamente relacionado com a ativação polarizada de um dos dois subconjuntos de linfócitos CD4+, Th1 associado à resistência ou Th2 associado à progressão da doença. A subdivisão em células Th1 e Th2 é baseada no padrão de citocinas que eles produzem (SHANKAR & TITUS, 1995; DeKREY *et al*, 1998; HANDMAM *et al*, 2001).

A imunidade protetora conferida pelos linfócitos Th1 está associada à produção de citocinas que ativam os macrófagos para destruir os organismos intracelulares, principalmente por meio de mecanismos mediados por óxido nítrico (NO) (HANDMAM *et al*, 2001). As células Th1 secretam interleucina 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (MOSMAMM & COFFMAN, 1989; LIBLAU *et al*, 1995; TYTUS *et al*, 1989). Por outro lado, o fenótipo de susceptibilidade às infecções por determinadas espécies de *Leishmania* é comumente associado com a expansão de linfócitos do tipo Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-10 mas não IFN- γ , e auxiliam na ativação de células B (BOGDAN *et al*, 1991 LIBLAU *et*

al, 1995). Além disso, observa-se a produção de fatores de desativação de macrófagos como: TGF- β e prostaglandina E (BARRAL *et al*, 1993; STENGER *et al*, 1994).

A polarização Th1/Th2 não explica a resistência ou suscetibilidade a todas as espécies de *Leishmania*. Camundongos C57BL/10 resistentes à infecção por *L. major*, podem desenvolver lesões ulceradas quando infectados por *L. amazonensis* (AFONSO & SCOTT, 1993). Esta ausência de resistência não se correlaciona com a presença de uma resposta Th2 característica, sugerindo que a susceptibilidade de C57BL/10 à infecção por *L. amazonensis* é devido a uma falha em montar uma resposta Th1, ao invés da presença de uma resposta Th2. Por sua vez, camundongos BALB/c, que são susceptíveis à maioria das espécies de *Leishmania*, não desenvolvem lesões cutâneas quando infectados com *L. braziliensis* (DEKREY *et al*, 1997). A resistência dos BALB/c a *L. braziliensis* parece dever-se à ausência de uma resposta Th2 e não à presença de uma resposta Th1 (SOUSA-FRANCO *et al*, 2006).

1.3. INTERAÇÃO MACRÓFAGO-*Leishmania*

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que vive e se multiplica dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (RUSSEI *et al*, 1987). A interação macrófago-*Leishmania* é um exemplo de uma complexa interação parasita-hospedeiro que envolve múltiplos receptores da célula hospedeira e ligantes do parasito (MOSSER & ROSENTHAL, 1993; AWASTHI *et al*, 2004).

A ligação dos parasitas com a superfície celular dos macrófagos ocorre através de receptores CR1 e CR3 (MOSSER & EDELSON, 1985; BLACKWELL *et al.*, 1985) e de receptores de reconhecimento de padrão como receptores fucose-manose, *toll-like* e *scavenger* (GOUGH & GORDON, 2000). Esses receptores reconhecem ligantes presentes na superfície do parasita, sendo LPG (lipofosfoglicano) e gp63 (glicoproteína de 63 KDa) as principais envolvidas na interação macrófago-*Leishmania* (RUSSEI, 1987; BEVERLEY & TURCO, 1998).

LPG e gp63 são as moléculas mais abundantes na superfície das

formas promastigotas e encontram-se ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) à membrana da *Leishmania*. O LPG é necessário para o estabelecimento da infecção nos macrófagos e sobrevivência do parasito nos flebotomíneos. Estudos já demonstraram que LPG protege as formas promastigotas contra espécies reativas de oxigênio produzidas durante a fagocitose, da digestão dentro do fagolisossomo e da atividade da proteína cinase C (PKC) (HANDMAN *et al.*, 1986; DESCOTEAUX *et al.* 1991; SPATH *et al.*, 2003). Por sua vez, a gp63 auxilia na entrada da *Leishmania* na célula hospedeira e favorece a sobrevivência das formas promastigotas fagocitadas (CHANG & CHANG, 1986; CHAUDHURI *et al.* 1989). Em parasitos da espécie *L. amazonensis*, a molécula de ligação à heparina e os glicoesfingolipídios específicos de amastigota têm sido associados no processo de infecção da célula por esta espécie de *Leishmania* (LOVE *et al.*, 1993; STRAUS *et al.*, 1993).

Após o contato entre receptores da célula hospedeira e ligantes do parasito, promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* são internalizadas e passam a localizar-se dentro de fagossomos. Esses compartimentos sofrem uma série de alterações via maturação e fusão com endossomos tardios e lisossomos resultando na formação do vacúolo parasitóforo (VP). O VP é um compartimento ácido ($\text{pH} \leq 5$), rico em peptídeos e sua membrana plasmática é rica em proteínas de endossomo tardio e lisossomo. Dentre estas proteínas estão: a bomba vacuolar H^+ -ATPase, proteína G monomérica rab 7, LAMP-1 e LAMP-2 (ANTOINE *et al.*, 1998; DEJARDINS & DESCOTEAUX, 1997). Apesar dos VPs compartilharem tais características há diferenças significativas entre os VPs resultantes da infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Os VPs produzidos na infecção por *Leishmania mexicana* e *L. amazonensis* são grandes e contêm uma grande quantidade de amastigotas, enquanto *L. major* e *L. donovani* produzem VPs pequenos, com pouco espaço ao redor das amastigotas (CHANG & DWYER, 1978; SHEPHERD *et al.*, 1983; RABINOVITCH *et al.*, 1985; LANG *et al.*, 1994).

Leishmania ssp. desenvolveram estratégias que lhes permitem lidar com os mecanismos de defesa de seus hospedeiros (HANDMAN & BULLEN, 2002). A sobrevivência das formas promastigotas dentro do fagolisossomo é dependente da presença de LPG (MCNEELY & TURCO, 1990).

Promastigotas de *L. donovani* mutantes, que não apresentam determinadas unidades-repetitivas de LPG, são rapidamente destruídos após fagocitose. No entanto, a transferência passiva de LPG purificado prolonga significativamente a sobrevivência dos parasitos dentro dos macrófagos (MCNEELY & TURCO, 1990). Quando as formas promastigotas aderem à superfície dos macrófagos, o LPG é transferido do parasita para a membrana plasmática dos macrófagos, que torna-se menos propensa ao fusionamento (TOLSON *et al*, 1990). O bloqueio temporário do fusionamento entre o fagossomo e o lisossomo retarda a maturação do fagolisossomo e possibilita que as formas promastigotas de *L. donovani* se diferenciem em amastigotas (DESJARDINS & DESCOTEAUX, 1997), que são resistentes às enzimas lisossômicas e ao pH ácido do fagolisossomo (Antoine *et al*, 1990).

As formas amastigotas também desenvolveram estratégias para aumentar sua capacidade de sobrevivência dentro dos macrófagos. As amastigotas expressam uma grande quantidade de glicosilfosfatidilinositol de baixo peso molecular na sua membrana plasmática, que podem desempenhar um papel protetor contra as hidrolases e o meio ácido presente no fagolisossomo (ZILBERSTEIN & SHAPIRA, 1994). Outro mecanismo que favorecem a sobrevivência das amastigotas é a redução dos complexos antígeno-MHC-II na superfície celular dos macrófagos. As amastigotas de *L. amazonensis* e *L. mexicana* são capazes de internalizar e degradar os MHC-II que chegam aos VPs (LEAO *et al*, 1995). As moléculas MCH-II quando internalizadas por *L. amazonensis*, se localizam em organelas específicas, denominadas megassomos, onde acredita-se que são rapidamente degradadas por proteases (LEAO *et al*, 1995).

1.4. MODELO CBA

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem da espécie do parasita infectante e do perfil genético do hospedeiro. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que camundongos de um mesmo *background* genético apresentam diferentes perfis de resposta imune quando são infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003). Camundongos da linhagem CBA são

susceptíveis a *L. amazonensis* e quando infectados por este parasito desenvolvem lesão progressiva, caracterizada por uma grande quantidade de macrófagos vacuolizados intensamente parasitados, infiltração difusa e extensas áreas de necrose, além disso, as células do linfonodo drenante produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000). Por outro lado, camundongos desta linhagem são capazes de controlar a infecção por *L. major*. Neste modelo observa-se a produção de IFN- γ e IL-10 pelas células do linfonodo e as lesões apresentam infiltrado inflamatório misto, com macrófagos e linfócitos pouco parasitados, formação de granuloma e fibrose que levam à cura espontânea da lesão. A resistência ou susceptibilidade de camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* está intimamente relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 e Th2, respectivamente (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000).

Estudos *in vitro* foram realizados com intuito de analisar a interação entre macrófagos e *L. amazonensis* ou *L. major*. Macrófagos peritoneais de camundongo CBA infectados com *L. amazonensis* apresentam uma maior carga parasitária do que aqueles infectados com *L. major* (GOMES *et al.*, 2003). A diferença no percentual de infecção e na carga parasitária sugerem que o contato inicial entre o macrófago e *Leishmania* ssp. é suficiente para ativar a resposta imune do hospedeiro favorecendo ou não a infecção. Este estudo também demonstrou que macrófagos infectados com *L. major* produzem mais H₂O₂ do que infectados por *L. amazonensis*, indicando a participação de espécies reativas de oxigênio no controle da infecção por *L. major* (GOMES *et al.*, 2003). Macrófagos peritoneais de camundongos CBA tratados com IFN- γ recombinante (rIFN- γ) produzem níveis similares de NO quando infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. No entanto, o IFN- γ só é capaz de reduzir significativamente a infecção por *L. major*. Além disso, TNF- α recombinante (rTNF- α) sozinho é capaz de reduzir o percentual de macrófagos de CBA infectados por *L. major* e quando associado a rIFN- γ reduz significativamente o percentual de células infectadas tanto com *L. major* quanto com *L. amazonensis*. Esses resultados demonstram que *L. amazonensis* é resistente ao NO induzido por IFN- γ e que TNF- α realça a

atividade leishmanicida do macrófago de CBA pré-ativado com IFN- γ (GOMES *et al.*, 2003).

Em conjunto, esses dados sugerem um papel importante dos macrófagos na resolução da infecção e dos parasitas no direcionamento da resposta imune do hospedeiro (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003).

1.5. TSPO

Como abordado no tópico anterior, macrófagos de camundongos CBA desencadeiam diferentes respostas imuno-inflamatórias quando são infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Com intuito de identificar os fatores responsáveis por essa diferença, em nosso laboratório foi utilizada uma abordagem proteômica, com a qual mostrou-se que algumas proteínas encontram-se diferentemente expressas pelos macrófagos na infecção por *L. amazonensis* e *L. major*. Dentre as proteínas diferentemente expressas em macrófagos infectados por *L. major* e *L. amazonensis*, a proteína translocadora (TSPO) mostrou expressão reduzida na infecção por *L. amazonensis*.

O TSPO anteriormente identificado como receptor benzodiazepínico periférico (do inglês *peripheral benzodiazepinic receptor* – PBR) localiza-se principalmente na membrana mitocondrial, porém também já foi encontrado no núcleo, na membrana plasmática de eucariotos e em leucócitos polimorfonucleares (KRESTININA *et al.*, 2009). Muitas funções fisiológicas são atribuídas ao TSPO, incluindo crescimento e proliferação celular, esteroidogênese, transporte de colesterol da membrana mitocondrial externa para a matriz mitocondrial, quimiotaxia, imunidade celular e respiração celular (CHEN *et al.*, 2008). Além dessas funções, o TSPO exerce importante papel na via de apoptose mitocondrial e está intimamente associado ao canal de ânion voltagem-dependente (do inglês *voltage-dependent anion channel* - VDAC) e com o transportador de nucleotídeo adenina (do inglês *adenine nucleotide transporter* - ANT), os quais formam o poro de permeabilidade mitocondrial (do inglês *mitochondrial permeability transition*

por - MPTP) (ZENO *et al*, 2009) (Figura 2). As diversas funções exercidas pelo TSPO podem ser moduladas por ligantes endógenos e sintéticos. Alguns desses ligantes possuem alta afinidade em concentração nanomolar com o TSPO e podem atuar de maneira agonista ou antagonista ao TSPO.

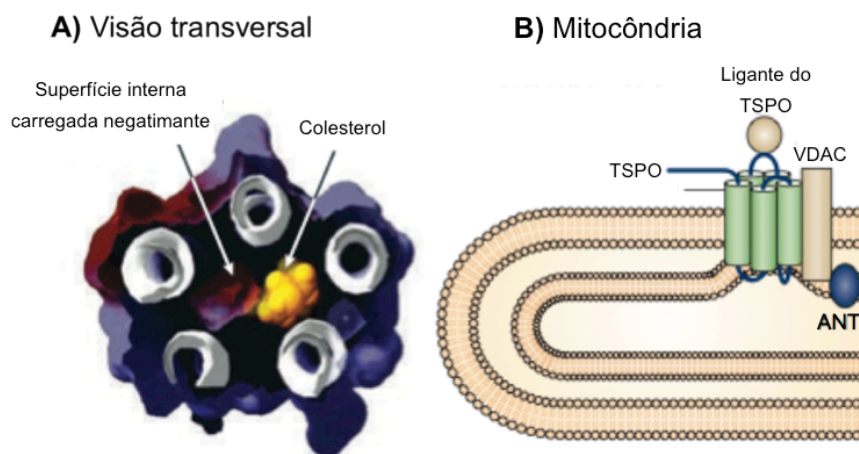


FIGURA 2. **Estrutura do TSPO.** A proteína translocadora (TSPO) monomérica (18 kDa) forma uma estrutura de canal com cinco alfa hélices transmembrana. A) Visão transversal do modelo tridimensional do TSPO. B) localização do TSPO na membrana mitocondrial externa, onde está associado com o Canal de Ânions Dependente de Voltagem (VDAC) e com o Translocador do Nucleotídeo Adenina (ANT). (Adaptado de RUPPRECHT *et al*, 2010).

A presença do TSPO e sua conservação em espécies eucarióticas e procarióticas sugerem uma função básica e essencial dessa molécula que é reforçada pelo fato do *knockout* do gene do TSPO levar à morte de ratos em fase embrionária (LACAPÈRE & PAPADOPOULOS, 2003). Assim, devido à importância dessa proteína e ao fato desta ser diferentemente expressa em macrófagos de CBA infectados com *L. major* e *L. amazonensis*, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o papel do TSPO na infecção por *Leishmania*. Para isso, o efeito da sobre-expressão do TSPO foi avaliado sobre a infecção por *L. amazonensis*. Nossa hipótese é que a sobre-expressão do TSPO em macrófagos favorece o controle da infecção por *L. amazonensis*. Investigar o papel dessa proteína na infecção por *Leishmania* abre perspectivas para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas no tratamento dessa patologia.

2. OBJETIVOS

GERAL

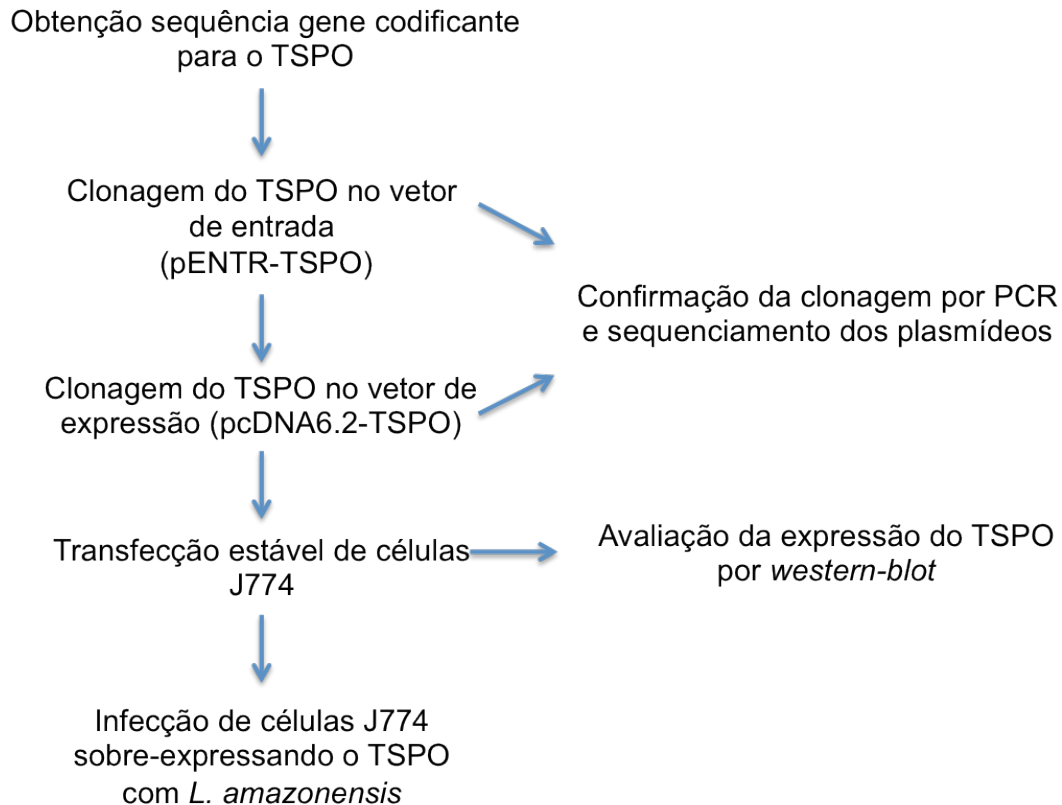
Avaliar o papel do TSPO no controle da infecção por *L. amazonensis*.

ESPECÍFICOS

- A. Clonar o plasmídeo contendo o inserto do TSPO utilizando o sistema Gateway™.
- B. Obter clones com expressão estável do TSPO.
- C. Avaliar o efeito da superexpressão do TSPO sobre a infecção de células de linhagem macrófaga J774 por *L. amazonensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

- Desenho experimental



3.1. Cultivo de células

Células de linhagem macrófágica J774 foram utilizadas no presente trabalho, pois diferentemente dos macrófagos primários são possíveis de serem transfectadas, o que permitiu avaliar o efeito da sobre-expressão do TSPO na infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. As células J774 foram cultivadas em meio RPMI completo suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina e 2 mM de 6-thioguanina. As células CHO (do inglês *Chinese hamster ovary*) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado com 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) pH 7,4, 2mM de glutamina, bicarbonato de sódio 2 g/L e 10% de soro bovino fetal (meio DMEM completo). Estas células foram mantidas em cultura por até sete passagens em estufa a 37°C suplementada com 5% de CO₂.

3.2. Obtenção da sequência do gene codificante para o TSPO

RNAs de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA infectados com *Leishmania major* foram utilizados para realização de RT-PCR do gene TSPO. O RT-PCR é um processo que ocorre em duas etapas. A primeira caracteriza-se pela transcrição reversa da fita de RNA mensageiro maduro em cDNA e a segunda pela amplificação de um cDNA alvo com o uso de um par de *primers* específico. Os *primers* TSPOattB1 *forward* e TSPOattB2 *reverse* foram desenhados, contendo adaptadores para recombinação no sistema Gateway™, com base na sequência do TSPO de *Mus musculus* depositada no GenBank (número de acesso: 12257). Na primeira etapa o RNA foi linearizado numa reação de 10 minutos a 70°C no termociclador em presença de oligo dT 0,5 µg/µl e água deionizada. Para a síntese da primeira fita foram adicionados em microtubo: 1 µg do RNA já linearizado, 1 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, tampão da PCR 1x, 2 U/µL de Rnase OUT e 4 U/µL da enzima transcriptase reversa, durante 2h a 42 °C. Uma alíquota de 5 µl da reação (100 ng de cDNA) foi submetida a uma PCR com gradiente de temperatura para a amplificação do cDNA alvo, a reação foi realizada em volume de 25 µl (200 µM de cada dNTP; 1,25U de pfu DNA polimerase (Fermentas); tampão com MgSO₄ 1x e 0,5 µM de cada *primer* e submetida às seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 45 seg, 45 a 65 °C por 45seg e 72 °C por 1min e uma etapa de extensão final realizada a 72 °C por 5min. O produto foi avaliado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Uma vez determinada a temperatura de anelamento ideal, as PCRs subseqüentes foram realizadas com essa temperatura. Para a purificação do DNA amplificado, a banda contendo o *amplicon* de interesse foi isolada do gel de agarose com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante. O produto da purificação foi visualizado em gel de agarose a 1,5%.

3.3. Clonagem

3.3.1 Clonagem do TSPO no vetor de entrada

O produto da PCR, contendo o gene codificante para o TSPO e os adaptadores attB1 e 2, foi submetido à clonagem no sistema Gateway™ (Life Technologies, Inc.). Para a realização da reação BP (Figura 3) foi adicionado em um microtubo 3 µl (~80 ng) do *amplicon* TSPO, obtido após a purificação, 1 µl do pDONR 221 (150 ng), 4 µl de TE pH 8,0 e 2 µl do *mix* de enzimas BP Clonase II™ (1x). Depois de incubada por 18h a 25 °C, foi adicionado 1 µl de Proteinase K (2 µg/µl), e a solução foi incubada, em banho-maria, por 10min a 37 °C, finalizando assim a reação. Como controle negativo da recombinação, os mesmos componentes da reação exceto a enzima BP Clonase II™ foram incubados nas mesmas condições. Como controle positivo, a reação BP foi realizada utilizando-se o pEXP7-tet, que contém o gene de resistência à tetraciclina flanqueado por sítios attB, em substituição ao *amplicon* TSPO.

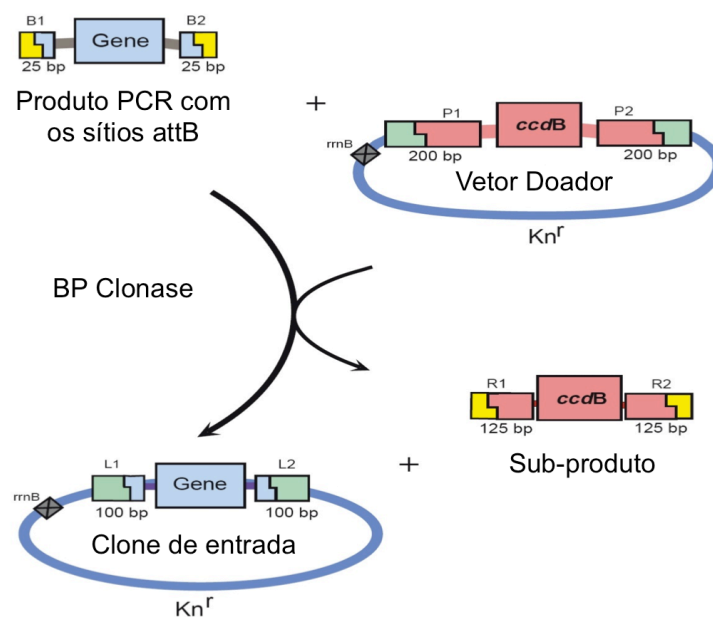


FIGURA 3 - **Reação BP**. Esquema da obtenção do Clone de Entrada, a partir da recombinação sítio-específica attB (produto da PCR) mais attP (Vetor Donor) (Manual Gateway™, 2009).

3.3.2. Transformação de *E. coli* com o Clone de entrada pENTER-TSPO

Bactérias *E. coli* DH5- α foram cultivadas em meio LB a 37 °C, a 250 rpm por 18 h. Decorrido esse intervalo, 50 μ l da cultura foram transferidos para um tubo com 10 ml de meio LB e submetido à agitação, nas condições anteriormente citadas, por 2h e 30min. Após mensuração da densidade óptica (D.O.) (600 nm) da cultura e obtido um valor de 0,218, as bactérias foram colocadas no gelo por 10 min e, em seguida, submetidas a uma centrifugação de 5min a 1800 xg a 4 °C. Para tornar as bactérias quimicamente competentes, o *pellet* foi ressuspenso em 10 ml de CaCl₂ (50 mM) e a solução centrifugada por 5min a 1800 xg e 4 °C. O *pellet* foi novamente ressuspenso em 1 ml de CaCl₂ (50 mM) e aliqotado em volumes de 100 μ l.

Uma alíquota de 100 μ l de bactérias DH5- α competentes foi transformada com 1 μ l do pENTER-TSPO (100 ng). Em seguida, esta ressuspensão foi mantida em gelo por 30min, submetida a um choque térmico na temperatura de 42 °C por 90seg e recolocada em gelo. Após 30seg, 1 ml de LB foi adicionado em cada uma das alíquotas e estas foram incubadas a 37 °C por 1h para permitir que a bactéria expressasse o gene de resistência ao antibiótico de seleção. Alíquotas de bactérias quimicamente competentes também foram transformadas com os produtos das reações controle. Cerca de 100 μ l das bactérias transformadas foram distribuídas em placas de petri contendo meio LB-ágar e o antibiótico de seleção. Foi utilizado o antibiótico Tetraciclina (20 μ g/ml) para as bactérias transformadas com o produto da reação BP controle positivo e Kanamicina (50 μ g/ml) para as demais. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16h e alocadas em geladeira a 4 °C.

3.3.3. Reação em cadeia da polimerase das colônias transformadas com o Clone de entrada pENTER-TSPO

Para confirmar a transformação das bactérias DH5- α , cinco diferentes colônias foram coletadas aleatoriamente da placa de petri (LB agar e 50 μ g/ml de Kanamicina), e submetidas à PCR convencional. A reação foi realizada em um volume de 50 μ l (200 mM de cada dNTP; 2,5 U taq DNA

polimerase; 10 µl de tampão com MgCl₂ e 0,5 µM de cada primer TSPO*att*B1 *forward* e TSPO*att*B2 *reverse*) utilizando-se as seguintes condições: 94 °C por 15min, desnaturação inicial a 94 °C por 4min seguida de quarenta ciclos de 94 °C por 45seg, 48 °C por 45seg e 72 °C por 1min e uma extensão final realizada a 72 °C por 5min. O produto foi avaliado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

As mesmas colônias utilizadas na PCR foram cultivadas em meio LB com 50 µg/ml de Kanamicina a 37 °C, 250 rpm por 18h. Após o crescimento, 800 µl do meio de cultura contendo as bactérias foram alíquotados em criotubos contendo 70 µl de DMSO e preservados a -70 °C.

3.3.4. Extração do plasmídeo das colônias transformadas com o Clone de entrada pENTR-TSPO

As colônias de *E. coli* PCR positivas para o pENTR-TSPO foram utilizadas para a extração deste plasmídeo por meio do Plasmid® Mini Kit (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.3.5. Reação em cadeia da polimerase do Clone de entrada pENTER-TSPO purificado

Para confirmar a inserção do gene codificante do TSPO no pENTR-TSPO, uma alíquota dos plasmídeos purificados foi submetida à PCR. A reação foi realizada em um volume de 25 µl (200 mM de cada dNTP; 1,25U taq DNA polimerase; 10 µl de tampão com MgCl₂ e 0,5 µM dos *primers* TSPO*att*B1 e TSPO*att*B2 sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C seguida de quarenta ciclos de 94 °C por 45seg, 48 °C por 45seg e 72 °C por 1min e uma extensão final realizada a 72 °C por 5min. O produto foi avaliado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

3.3.6. Clonagem do TSPO no vetor de expressão

Uma vez obtido o plasmídeo de entrada pENTR-TSPO, foi realizada a reação de recombinação LR (Figura 4) do sistema Gateway™ com a finalidade de inserir esse gene no plasmídeo de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-DEST. Para a realização da reação LR foi adicionado em um microtubo 1 µl (~150 ng) do pENTR-TSPO purificado, 1 µl do pcDNA™6.2/C-

EmGFP-DEST (150 ng), 6 μ l de TE pH 8,0 e 2 μ l do *mix* de enzimas LR Clonase II™ (1x). Depois de incubada por 18h a 25°C, foi adicionado 1 μ l de Proteinase K (2 μ g/ μ l) e a solução foi novamente incubada, em banho-maria, por 10min a 37 °C, finalizando assim a reação. Como controle positivo, a reação LR foi realizada utilizando-se o pENTR™-gus em substituição ao pENTR-TSPO. O controle negativo seguiu o mesmo princípio utilizado na construção do vetor de entrada (pENTR-TSPO).

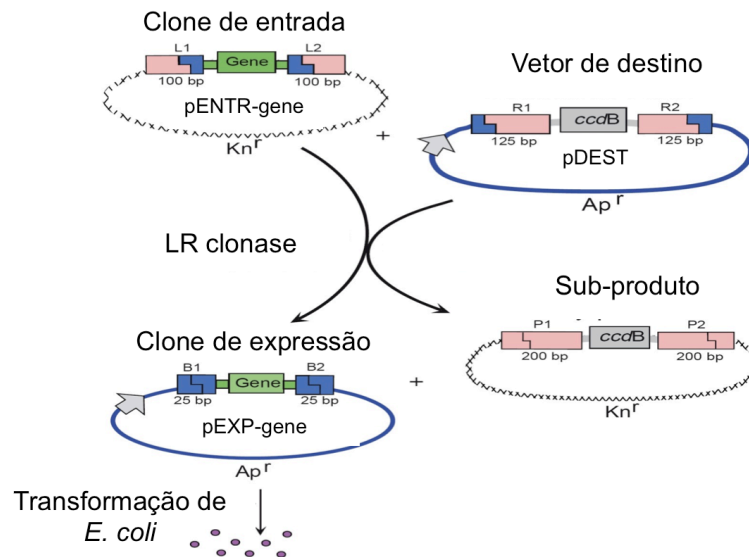


FIGURA 4 - **Reação LR.** Esquema da obtenção do Clone de Expressão, a partir da recombinação sítio-específica *attL* (clone de entrada) mais *attR* (Vetor pcDNA™6.2/C-EmGFP-DEST) (Manual Gateway™, 2009).

3.3.7. Transformação de *E. coli* com o Clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO

O processo de transformação de bactérias *E. coli* com o pcDNA6.2™-TSPO ocorreu de maneira similar a descrita no item 3.3.2 *Transformação de E. coli com o Clone de entrada (pENTR-TSPO)*. O único aspecto divergente foi o fato da Ampicilina (100 μ g/ml) ter sido utilizada como antibiótico de seleção.

3.3.8. Reação em cadeia da polimerase das colônias transformadas com Clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO

Para determinar se as colônias de bactérias que cresceram no meio de seleção realmente possuíam o plasmídeo pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO foi empregada a mesma metodologia descrita no item 3.3.3. *Reação em cadeia da polimerase das colônias transformadas com o Clone de entrada pENTER-TSPO.*

3.3.9. Extração do plasmídeo das colônias transformadas com Clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO

A extração do plasmídeo pcDNA6.2-TSPO das colônias de *E. coli* DH5- foi realizada com a mesma metodologia descrita no item 3.3.4 *Extração do plasmídeo das colônias transformadas com o Clone de entrada pENTER-TSPO.*

3.3.10. Sequenciamento do Clone de entrada (pENTER-TSPO) e do Clone de expressão (pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO)

Para o sequenciamento do gene do TSPO presente no de entrada, obtido com o emprego da metodologia acima descrita, foram utilizados dois *primers* específicos, M13 Forward e M13 Reverse (Tabela 1) e para o sequenciamento do gene do TSPO presente no clone de expressão foi utilizado o *primer* específico, TK poly A (Tabela 2). As sequências foram obtidas utilizando o kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 e analisadas no sequenciador 3100 Genetic Analyzed (Applied Biosystems). O alinhamento da sequencia obtida foi realizado com o auxílio do programa MegAlign (Lasergene DNASTAR).

Tabela 1

Primers utilizados para o sequenciamento do clone de entrada.

Primer	Sequencia (5' – 3')
M13 Forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13 Reverse	AGCGGATAACAATTCACACAGG

Tabela 2

Primer utilizado para o sequenciamento do clone de expressão

Primer	Sequencia (5' - 3')
TK poly A	TTGTCTCCTTCCGTGTTTCA

3.4. Transfecção de células J774 e CHO com o plasmídeo pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO

Células de linhagens macrofágicas J774 e CHO foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO e, como controle, com o plasmídeo pcDNA6.2 não contendo o inserto do gene TSPO pelo método LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 células por poço em com meio RPMI sem antibiótico. Após 24h, os meios de cultura foram substituídos por meios sem antibiótico e sem soro bovino fetal (SBF). Com intuito de otimizar a eficiência da transfecção foram utilizadas duas diferentes proporções de DNA (μg): Lipossomo (μl), 1:1 e 1:3, respectivamente. Decorridas 5h, foram adicionados 400 μl de meio de cultura sem antibiótico. No dia seguinte, foi realizada a imunomarcação das células CHO transfectadas. Em paralelo, foi iniciado o processo de seleção das células J774 pcDNA6.2-TSPO e J774 pcDNA6.2 com expressão estável a partir de 3ª adição do antibiótico de seleção blasticidina na concentração de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ao meio de cultura. Após oito semanas os clones obtidos foram expandidos e congelados.

3.5. Western blot das células J774 transfectadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO

Extratos de J774, J774 pcDNA6.2 sem o inserto do TSPO, J774 pcDNA6.2-TSPO clone 1 e J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2 foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% por 2h10min a 150V e 20mA. Extrato de testículo foi utilizado como controle positivo. Uma vez realizada a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose por 45min a 300 mA e 50 V. A membrana foi incubada overnight a 4 °C , sob leve agitação, com anti-TSPO (1:1500,

Everest EB09203) e anti-actina (1:1000, SIGMA). Após diversas lavagens a membrana foi incubada por 1h à temperatura ambiente com os respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase. A revelação das bandas foi realizada utilizando o Kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE). Nesta etapa, a membrana foi colocada em contato direto com filme sensível à quimioluminescência por alguns segundos e por 30min. Após a exposição, o filme foi mergulhado em solução reveladora, seguida de solução fixadora, por cerca de 30seg cada. A intensidade das bandas foi medida utilizando o software ImageJ.

3.6. Imunofluorescência das células CHO transfectadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO

Células CHO apresentando transfecção estável dos plasmídeos pcDNA6.2-TSPO e J774-pcDNA6.2 foram plaqueadas na concentração de 10^5 células por poço. Após 24h, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e armazenadas a 4 °C. Para a imunomarcação do TSPO as lâminulas contendo as células foram expostas ao anticorpo anti-TSPO (1:50) e, posteriormente, ao anticorpo secundário (anti-cabra 1:200) conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 594 vermelho fluorescente. Como controle negativo da imunomarcação, as células foram incubadas com IgG de cabra em substituição ao anti-corpo primário. As lâminas foram então montadas utilizando o kit Vectashield com DAPI (VECTOR) e observadas em microscópio de fluorescência. As imagens foram obtidas em campos aleatórios, nos aumentos de 400x e 1000x.

3.7. Parasitos

Culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas por até 6 passagens sucessivas em meio Schneider (SIGMA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (GIBCO) e 0,1% de gentamicina a 50µg/ml (SIGMA). As promastigotas foram cultivadas em estufa B.O.D. a 24 °C e o crescimento foi acompanhado diariamente, por contagem em câmara de Neubauer.

3.8. Separação de promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* usando gradiente de ficoll

Inicialmente promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram recolhidas e lavadas em meio DMEM (GIBCO) a 1.781xg por 10min à 25°C. Após a centrifugação, o *pellet* foi resuspenso em DMEM e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Em seguida, para a separação das metacíclicas, 2×10^8 parasitos foram adicionados em 2mL de DMEM e sob estes foram adicionados 2mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences) a 10% diluído em Meio 199 e 2 ml de Ficoll a 40% diluído em PBS. O gradiente foi submetido à centrifugação a 365 xg a 25 °C por 10 minutos com a desaceleração ajustada para zero. As metacíclicas acumuladas na fase do Ficoll 10% foram recolhidas e lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% a 1781xg por 10 minutos a 25°C. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer para posterior realização dos experimentos.

3.9. Infecção de células com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*

As células J774, J774-pcDNA6.2, J774-pcDNA6.2-TSPO clone 1 e J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2 foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 10:1. Após 6h, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 6 e 48h. Após os diferentes tempos, as células foram fixadas com álcool absoluto durante 15min e coradas com hematoxilina e eosina. A percentagem de células infectadas e a carga parasitária foi determinada por meio de microscopia óptica, no aumento 1000x, e foi realizada a contagem de no mínimo 400 macrófagos por lamínula.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação do gene do TSPO a partir de macrófagos de camundongos CBA

Para clonagem do gene do TSPO, foi realizada inicialmente a reação de RT-PCR. Em seguida, a partir do cDNA obtido foram testadas diferentes temperaturas de anelamento, que variaram de 45 a 65°C, para determinar a ideal para amplificação do gene do TSPO, utilizando os *primers* TSPOattB1 e TSPOattB2. A análise do gel de agarose revelou uma banda com tamanho entre 500 e 600pb, nas reações em que a temperatura de anelamento foi de 45°C; 45,3°C; 46,2°C; 48,2°C e 50,4°C, com uma maior quantidade de material amplificado nas temperaturas de 45°C; 46,2 °C e 48,2°C (canaletas 2, 4 e 5, respectivamente) (Figura 5). O fragmento amplificado apresentou tamanho equivalente ao esperado, uma vez que a seqüência do gene TSPO de *Mus musculus* possui 510pb e cada um dos adaptadores para o sistema Gateway™ 25pb, totalizando 560pb. Para as PCRs subsequentes foi escolhida 48,2°C (canaleta 5), uma vez que esta foi a maior temperatura a apresentar um bom nível de amplificação.

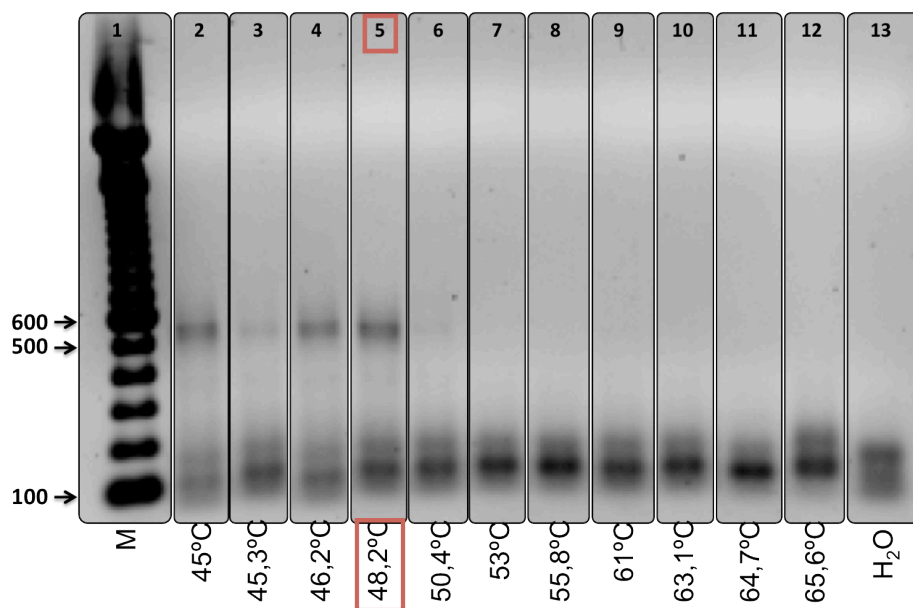


FIGURA 5 - **PCR com gradiente de temperatura para o gene TSPO**. RNAs de macrófagos de camundongos CBA infectados com *Leishmania major* previamente obtidos foram utilizadas para amplificação do gene TSPO por RT-PCR com os *primers* TSPOattB1 e TSPOattB2. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de 100pb; Canaletas 2 – 12: *amplicons* da PCR com diferentes temperaturas de anelamento 45°C; 45,3°C; 46,2°C; 48,2°C; 50,4°C; 53°C; 55,8°C; 61°C; 63,1°C; 64,7°C e 65,6°C, respectivamente; Canaleta 13: mix da pcr contendo água em substituição ao cDNA.

Além da banda citada observou-se no gel uma banda correspondente a um segundo fragmento amplificado com cerca de 100 pb, que pode ser atribuída à amplificação de dímeros de *primers* (Figura 5). Para remoção destes dímeros do produto de amplificação obtido na PCR, uma vez que eles podem interferir na clonagem por apresentarem os adaptadores do sistema GATEWAY™, foi realizada a purificação da banda correspondente ao fragmento amplificado de 510pb com o Kit QIAquick® Gel Extraction. A figura 6 mostra a banda do fragmento de amplificação purificado a partir do gel de PCR, sem a presença das bandas correspondentes aos dímeros de *primers*.

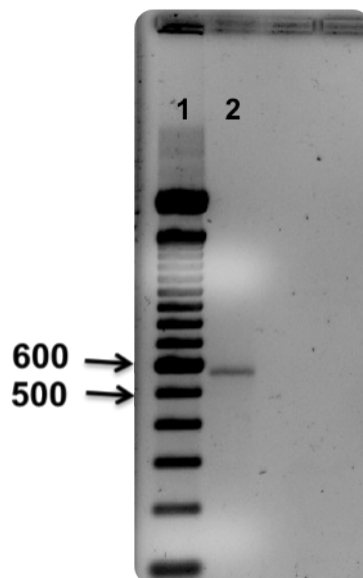


FIGURA 6 - **Gene para o TSPO contendo os adaptadores attB purificado.** O produto da PCR com os *primers* TSPOattB1 e TSPOattB2 à temperatura de 48°C foi purificado utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction. O produto purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de 100 pb; Canaleta 2: amplicon purificado.

4.2. Confirmação da construção do pENTER-TSPO

Para confirmação da clonagem, utilizando a reação BP pelo sistema Gateway™, e do sucesso da transformação das bactérias *E. coli* com o gene de interesse, foi realizada uma PCR convencional a partir das colônias das bactérias transformadas com o pENTER-TSPO. O gel de agarose mostra uma banda correspondente ao produto de amplificação de 560pb nas colônias 1 e 3 (canaletas 2 e 4, respectivamente) (figura 7).

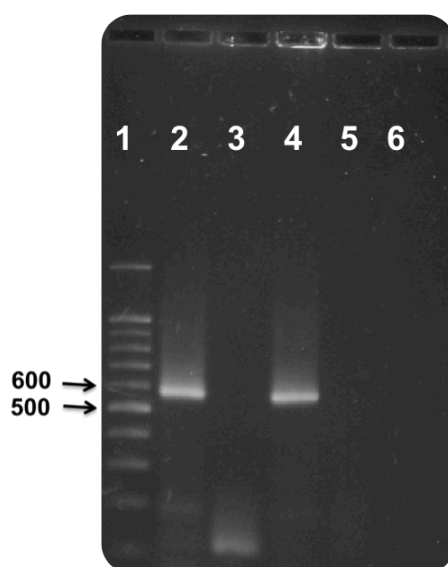


FIGURA 7 - Amplificação por PCR de colônias de *E. coli* transformadas com o pENTER-TSPO. Cinco diferentes colônias de *E. coli* foram submetidas à PCR com os primers TSPOattB1 e TSPOattB2 à temperatura de 48°C. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de 100 pb; canaletas 2 - 5: PCRs das colônias 1, 2, 3 e 4, respectivamente; Canaleta 6: mix da PCR contendo água em substituição ao cDNA.

Para uma adicional confirmação que o gene do TSPO foi clonado no plasmídeo pENTER-TSPO, foi realizado uma PCR utilizando os plasmídeos purificados tendo o gene de interesse como inserto. A figura 8 mostra uma banda de tamanho entre 500 e 600pb correspondente ao fragmento resultante da PCR, usando como molde (template) plasmídeos purificados a partir das colônias 1 e 3 de *E. coli*. O tamanho apresentado por estas duas bandas equivale ao esperado, como descrito no item 4.1.

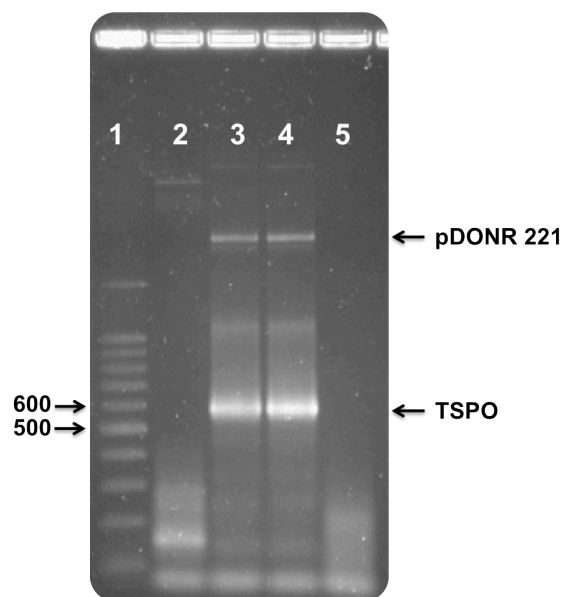


FIGURA 8 - **Amplificação por PCR dos plasmídeos purificados.** Plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* transformadas foram submetidas à PCR com os primers TSPOattB1 e TSPOattB2 a Tm de 48°C. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de 100 pb; canaletas 2: pDONOR 221, Canaleta 3: pENTER-TSPO extraído colônia 1, Canaleta 4: pENTER-TSPO extraído colônia 3 ; Canaleta 5: mix da PCR contendo água em substituição ao cDNA.

4.3. Confirmação da construção do pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO

Com o intuito de verificar a integridade do produto da reação de recombinação LR, o pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO purificado, extraído das colônias 1 e 3 de *E. coli* transformadas, foi submetido à eletroforese em gel de agarose. Na figura 9, observa-se no gel de agarose uma banda entre 5.000 e 6.000 pb nas canaletas 2 e 3. Essa banda apresenta tamanho esperado, uma vez que na reação de recombinação LR o pcDNA™6.2/C-EmGFP-DEST (7443 pb) perde cerca de 2264pb e recebe 710pb (equivalentes à seqüência do TSPO, 510pb, e ao sítio *attL*, 200pb) resultando no clone de expressão com 5889pb.

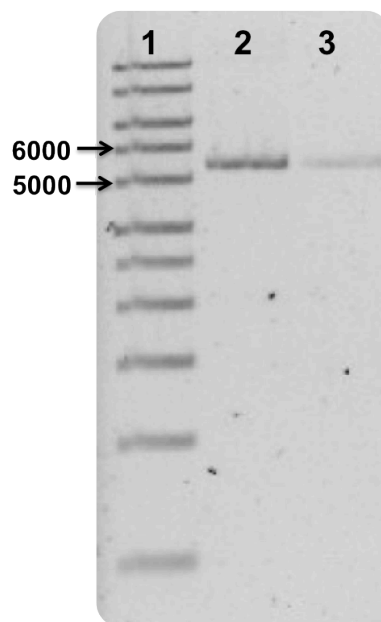


FIGURA 9- **Plasmídeos purificados.** Plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* transformadas com o produto da reação LR foram visualizados em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de 1 kb; Canaleta 2: pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO extraído da colônia 1; Canaleta 3: pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO extraído da colônia 3.

Em seguida, foi realizado o sequenciamento do clone de expressão pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO. O alinhamento da sequência obtida a partir do sequenciamento do inserto do clone de expressão com a sequência do TSPO já disponível no GenBank apresentou cerca de 100% de similaridade, confirmando a clonagem do gene. A ausência de alinhamento das bases nas posições 495, 497, 501 e 507 (retângulo laranja) deve-se a mutações silenciosas realizadas no desenho dos *primers* TSPOattB1 e TSPOattB2, com intuito de otimizar a performance destes diminuindo a possibilidade da formação de dímeros de *primers* e *hairpin*.

TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	ATGCCTGAATCCTGGGTGCCTGCCGTGGGCCTCACTCTGGTGCCAGCCTGGGGGGCTTC 60 ATGCCTGAATCCTGGGTGCCTGCCGTGGGCCTCACTCTGGTGCCAGCCTGGGGGGCTTC 60 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	ATGGGAGCCTACTTTGTACGTGGCGAGGGCCTCCGGTGGTATGCTAGCTTGACAGAAACCC 120 ATGGGAGCCTACTTTGTACGTGGCGAGGGCCTCCGGTGGTATGCTAGCTTGACAGAAACCC 120 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	TCTTGGCATCCGCCTCGCTGGACACTGGCTCCCATCTGGGGCACACTGTATTCAGCCATG 180 TCTTGGCATCCGCCTCGCTGGACACTGGCTCCCATCTGGGGCACACTGTATTCAGCCATG 180 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	GGGTATGGCTCCTACATAGTCTGGAAAGAGCTGGGAGGTTTACAGAGGACGCTATGGTT 240 GGGTATGGCTCCTACATAGTCTGGAAAGAGCTGGGAGGTTTACAGAGGACGCTATGGTT 240 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	CCCTTGGGTCTCTACACTGGTCACTGGCTCTGAACTGGGCGTGGCCCCCATCTTCTTT 300 CCCTTGGGTCTCTACACTGGTCACTGGCTCTGAACTGGGCGTGGCCCCCATCTTCTTT 300 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	GGTGCCCGGCAGATGGGCTGGGCCTTGGCCGATCTTCTGCTTGTCAGTGGGGTGGCGACT 360 GGTGCCCGGCAGATGGGCTGGGCCTTGGCCGATCTTCTGCTTGTCAGTGGGGTGGCGACT 360 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	GCCACAACCCTGGCTTGGCACCGAGTGAGCCCGCCGGCTGCCCGCTTGCTGTACCCCTTAC 420 GCCACAACCCTGGCTTGGCACCGAGTGAGCCCGCCGGCTGCCCGCTTGCTGTACCCCTTAC 420 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	CTGGCCTGGCTGGCTTTTGCCACCGTGCTCAACTACTATGTATGGCGTGATAACTCTGGC 480 CTGGCCTGGCTGGCTTTTGCCACCGTGCTCAACTACTATGTATGGCGTGATAACTCTGGC 480 *****
TSPO-Genbank pCDNA6.2-TSPO	CGGCGAGGGGGCTCCGGCTCCAGAGTGA 510 CGGCGAGGGGGCTCCGGCTCCAGAGTGA 510 *****

FIGURA 10 – **Alinhamento da sequência do TSPO.** As sequencias foram obtidas utilizando o kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 e analisadas no sequenciador 3100 Genetic Analyzed (Applied Biosystems), com o auxílio do programa MegAlign (Lasergene DNASTAR). O alinhamento apresentou 100% de similaridade, confirmando a clonagem do gene.

4.4. Confirmação da expressão do TSPO por células J774 e CHO transfectadas com o pcDNA™6.2/C-EmGFP-TSPO

Após a clonagem, o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO foi usado para transfectar células J774. Inicialmente, as culturas de células submetidas à transfecção com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO apresentaram menor taxa de sobrevivência quando comparadas às células controle transfetadas com plasmídeo vazio, J774 pcDNA6.2. Também, foi demonstrado por qRT-PCR que as células J774 transfetadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO expressaram de forma similar o gene do TSPO em comparação com aquelas transfetadas com o plasmídeo vazio (dado não mostrado).

Para verificar se a dificuldade em transfectar as células J774 seria devido a algum erro na construção do plasmídeo pcDNA6.2-TSPO, foi realizada a transfecção transitória de células CHO com o mesmo plasmídeo. As células CHO transfetadas com o plasmídeo contendo o inserto do TSPO apresentaram uma marcação mais intensa em relação à transfetada com o plasmídeo controle (Figura 11), verificado por imunofluorescência. Esse achado indica que o gene do TSPO inserido no plasmídeo pcDNA6.2 foi expresso por células de mamífero da linhagem CHO, mostrando não haver nenhum erro nessa construção.

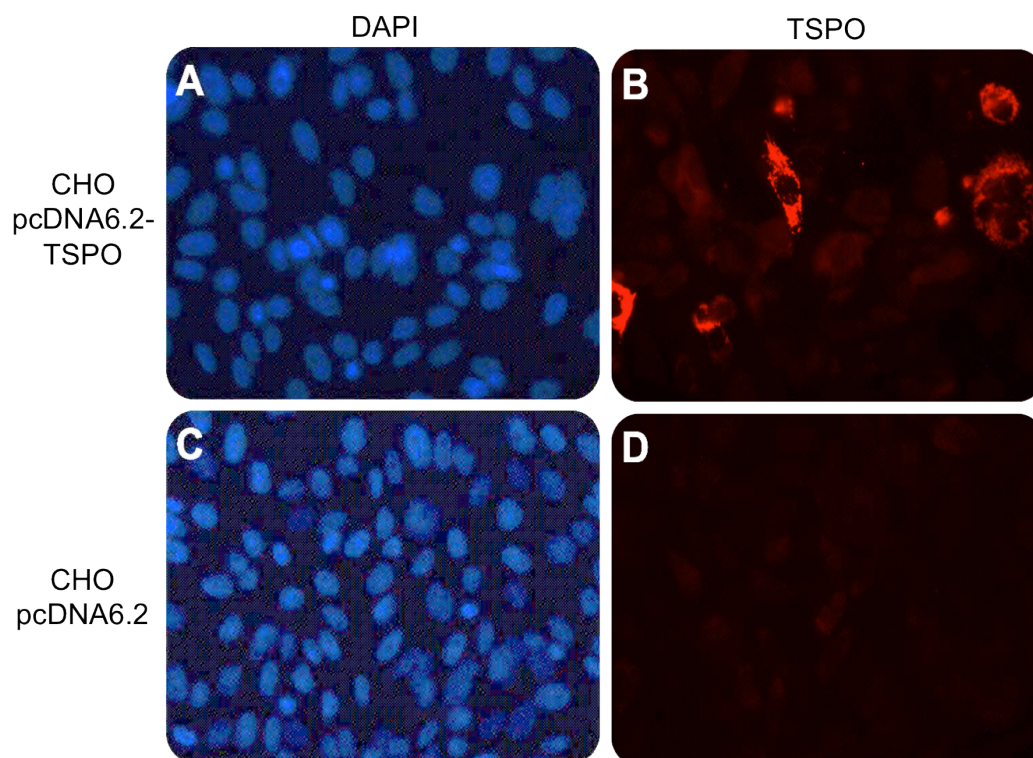


FIGURA 11 - **Imunofluorescência das células CHO transfetadas** – **A** Células CHO transfetadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO marcadas com o DAPI; **B** Células CHO transfetadas com o plasmídeo pcDNA6.2-TSPO; **C** Células CHO transfetadas com o plasmídeo pcDNA6.2 marcadas com o DAPI; **D** Células CHO transfetadas com o plasmídeo pcDNA6.2. As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 por poço e, após 24 horas, foram submetidas a transfecção com pcDNA6.2-TSPO ou pcDNA6.2. No dia seguinte à transfecção, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%. A imunomarcagem do TSPO foi realizada utilizando-se o anticorpo primário anti-TSPO e anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo vermelho (Alexa Fluor 594). As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência sob aumento de 400x.

Em seguida, foi realizada nova tentativa de transfecção estável das células J774 com o pcDNA6.2-TSPO. As células J774 transfectadas com este plasmídeo continuaram a apresentar uma alta letalidade, porém após diversas tentativas dois clones sobreviveram ao processo de seleção: J774 pcDNA6.2-TSPO clone 1 e o J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2. No entanto apenas o clone 2 mostrou sobre-expressão do TSPO, verificado por *western-blot*. A figura 12 ilustra o resultado do *western-blot* realizado a partir do extrato protéico dos clones 1 e 2, evidenciando uma banda de 18kDa correspondente à detecção do TSPO nesses extratos e outra banda de 42kDa, correspondente à β -actina, utilizada como referência. A banda do TSPO correspondente ao extrato de células J774 transfectadas com pcDNA6.2-TSPO clone 2 apresentou expressão 2,09 vezes maior quando comparado à J774 não transfectada. Já os extratos de J774 pcDNA6.2 e pcDNA6.2-TSPO clone 1 apresentaram uma alteração da expressão pouco significativa de 0,1 e 0,09 vezes em comparação à J774, respectivamente.

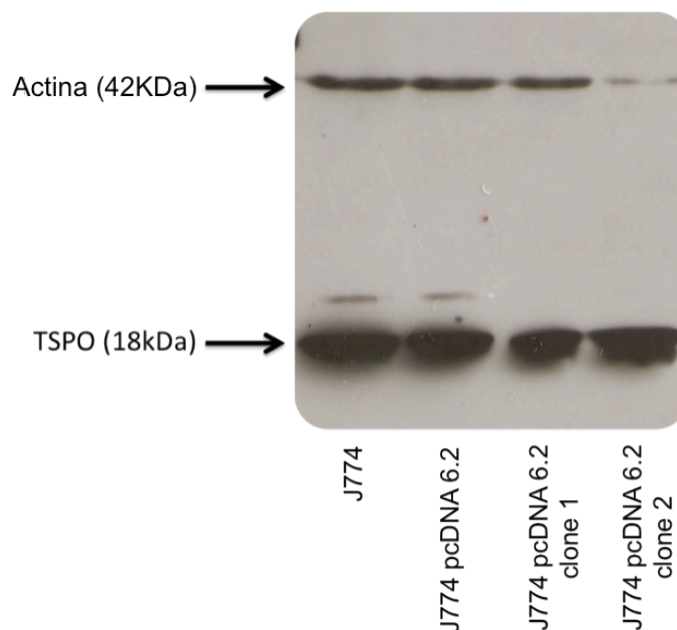


FIGURA 12 - **Western blot das células J774 transfectadas.** Extratos protéicos de J774 não transfectadas, J774 transfectadas com pcDNA6.2, J774 transfectada com o pcDNA6.2-TSPO clone 1 e J774 transfectada com pcDNA6.2-TSPO clone 2 foram submetidas à eletroforese e, posteriormente, transferidos para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com os anticorpos anti-actina (1:10000) e anti-TSPO (1:1500) seguido de incubação com anticorpos secundários conjugados à peroxidase. A revelação foi realizada com o Kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE).

4.5. Infecção do clones J774 pcDNA 6.2 por *Leishmania amazonensis*

Com intuito de avaliar o papel do TSPO na infecção por *Leishmania*, células J774 pcDNA 6.2-TSPO clone 1 e J774 pcDNA 6.2-TSPO clone 2 foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Nosso resultado demonstrou que não houve diferença no percentual de células infectadas e no número de *Leishmania* por célula entre a J774 pcDNA 6.2 clone 1 e os controles nos diferentes tempos estudados (Figura 13 a e b). No entanto, observa-se uma redução no percentual de células infectadas nas J774 pcDNA6.2 clone 2 quando comparadas com o controle no tempo de 6 horas. Esta diferença deixou de ser observada no tempo de 48 horas (Figura 13 c).

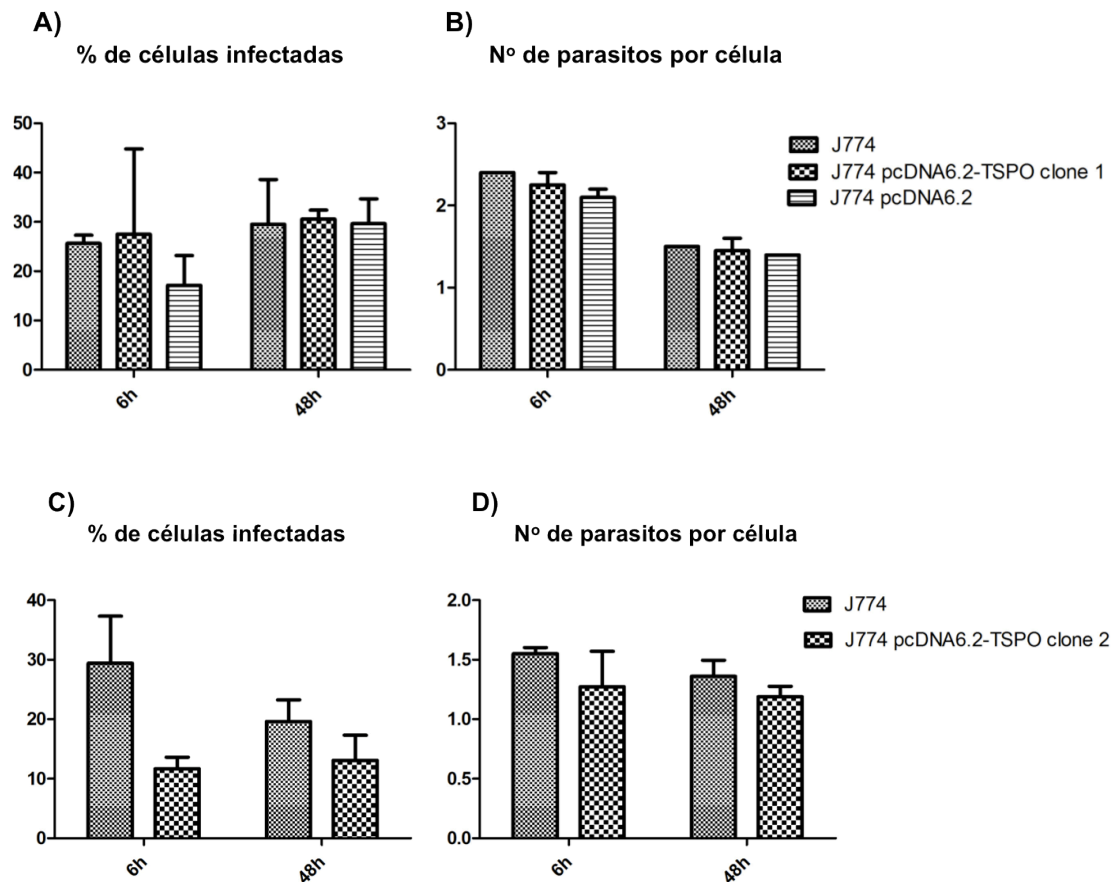


FIGURA 13 – Cinética de Infecção de células J774, J774 pcDNA6.2, J774 pcDNA6.2 clone 1 e J774 pcDNA6.2 clone 2 por *L. amazonensis*. A e C Percentual de células infectadas; B e D Número de parasitos por célula. Células J774, J774 pcDNA6.2, J774 pcDNA6.2 clone 1 e J774 pcDNA6.2 clone 2 foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 10:1. Após 6 horas de infecção as células foram lavadas e re-incubadas por um período adicional de 6 e 48 horas. Nestes tempos, as células foram lavadas e fixadas. Em seguida, as lamínulas foram coradas com hematoxilina e eosina e o percentual de macrófagos infectados e número de parasitos por macrófago foi quantificado por microscópio ótico, no aumento 1000x. Em cada lamínula no mínimo 400 células foram contadas.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho o gene codificante para o TSPO de *Mus musculus* foi clonado no vetores pENTER (vetor de entrada do sistema Gateway™) e pcDNA6.2 (vetor de expressão do sistema Gateway™). O pcDNA6.2-TSPO purificado foi visualizado em gel de agarose (Figura 9) e a clonagem foi confirmada por meio do sequenciamento e alinhamento com a sequência do TSPO já disponível no GenBank, apresentando as modificações anteriormente introduzidas na sequência do *primer* TSPOattB2 (Figura 10).

O processo de clonagem foi realizado utilizando o sistema Gateway™ que é uma sistema de recombinação sítio-específica *in vitro* baseada na maquinaria de recombinação do bacteriófago λ . Este sistema é constituído por duas reações de recombinação denominadas BP e LR. A reação BP transfere o fragmento de DNA do produto da PCR flaqueado pelo sítio *attB* para um vetor doador, gerando um clone de entrada (Figura 3). Por sua vez, a LR que *in vitro* correspondente a reação de excisão do bacteriófago λ , consiste na transferência do gene alvo do clone de entrada para um clone de expressão (Figura 4) (SASAKI *et al*, 2003). Este método de clonagem apresenta como vantagem a possibilidade de clonagem de um ou mais genes mantendo a orientação e o quadro de leitura durante o processo de recombinação. Além de permitir a rápida transferência do gene de interesse entre diferentes plasmídeos sem a necessidade de subclonagem (Manual do Gateway™, 2009).

A transfecção de células CHO com o plasmídeo pcDNA 6.2-TSPO resultou na expressão do gene inserido num sistema heterólogo, permitindo a confirmação da clonagem *in frame* do TSPO, utilizando-se um anticorpo anti-TSPO murino, uma vez que este não apresentou reação cruzada com o TSPO naturalmente expresso pela célula de hamster (*Cricetulus griseus*). Por tratar-se de uma transfecção transitória foram observadas marcações, apenas, em algumas células, como pode ser visto na figura 11.

Após confirmada a expressão do gene de interesse pelo plasmídeo pcDNA6.2-TSPO, células J774 foram transfectadas e submetidas à seleção. Após esse período, as células transfectadas com o plasmídeo contendo o

inserto do TSPO apresentaram uma alta mortalidade em comparação com as células transfectadas com o plasmídeo controle. A sobrevivência das células J774 pcDNA6.2 exclui a possibilidade da mortalidade dos clones J774 pcDNA6.2-TSPO dever-se à baixa eficiência da transfecção, pois se este processo não houvesse ocorrido, ambos os grupos apresentariam nível similar de sobrevivência.

A mortalidade das células J774 pcDNA6.2-TSPO pode ser consequência dos efeitos pro-apoptóticos do TSPO. Estudos sugerem que o TSPO mitocondrial pode modular as funções do MPTP formado pelo VDAC e ANT (CHELLI *et al*, 2004; JORDÀ *et al*, 2005; MAASER *et al*, 2001), que são moléculas intimamente associadas ao TSPO. Assim, a superexpressão do TSPO poderia provocar a abertura prolongada do MPTP que resultaria na diminuição do potencial de membrana mitocondrial e liberação de citocromo c. Em consequência, a cascata de caspase seria ativada o que levaria à apoptose. Outra possível explicação para a baixa sobrevivência das células J774 pcDNA6.2-TSPO é o papel fundamental do TSPO na célula. Já foi demonstrado que o *knockout* deste gene resulta em letalidade embrionária precoce em camundongos (LACAPÈRE & PAPADOPOULOS, 2003). Além disso, o TSPO é uma proteína altamente conservada evolutivamente que está associada a uma série de funções básicas entre elas: resposta imune (MASSOCO & PALERMO-NETO, 2003; TORRES *et al*, 2000), desenvolvimento celular (RECHICHI *et al*, 2008) e atividade mitocondrial (KRESTININA *et al*, 2009; GRACHEV *et al*, 2009). Logo, apenas as células apresentando um pequeno aumento na expressão (sobre-expressão) do TSPO estariam sobrevivendo enquanto as células com um aumento exacerbado na expressão desta proteína estariam morrendo.

Na literatura, há poucos trabalhos com células sobre-expressando o TSPO e nestes a transfecção é transitória (RECHICHI *et al*, 2008) ou as células são submetidas a seleção por apenas 24 horas (FAVREAU *et al*, 2009). Em contrapartida, neste trabalho, os clones sobre-expressando o TSPO foram selecionados por oito semanas. Apesar da dificuldade encontrada na transfecção, dois clones sobreviveram ao processo de seleção: J774 pcDNA 6.2-TSPO clone 1 e J774 pcDNA 6.2-TSPO clone 2.

Os extratos de J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2 apresentaram um aumento de 2,09 vezes, na expressão do TSPO quando comparados com J774 não transfectada, no entanto as células J774 pcDNA6.2 clone 1 apresentaram uma alteração da expressão do TSPO pouco significativa de 0,09 vezes em comparação ao controle (Figura 12).

Uma vez obtidos estes clones, foi avaliado o efeito do TSPO em dois momentos após a infecção: inicial de 6 horas e tardio de 48 horas. Inicialmente, foi avaliado o efeito do TSPO sobre a infecção utilizando o clone 1 de células J774 pcDNA6.2-TSPO e não foi observada diferença no percentual de células infectadas e no número de parasitos por células infectada em relação as células controle (Figura 13a e b). Por sua vez, as células J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2 infectadas com *L. amazonensis* apresentaram um menor percentual de células infectadas em comparação com as células J774 controle (Figura 13c). Este achado corrobora com o resultado obtido no *western-blot*, no qual apenas o clone 2 apresentou sobre-expressão do TSPO em relação a J774 não transfectada (Figura 12). Massoco e Palermo-Neto, 2003 demonstraram que em cavalos, o pré-tratamento de macrófagos e neutrófilos com um ligante do TSPO, diazepam, provoca redução na fagocitose de *Staphylococcus aureus* bem como na produção de radicais livres de oxigênio por estas células. Também já foi evidenciado que a sobre-expressão induzida do TSPO protege camundongos neonatos contra a infecção letal por vírus Sindbis (JOHNSTON *et al*, 2001) e pelo mixoma poxivirus (EVERETT *et al*, 2000). O fato da diferença no percentual de infecção entre J774 pcDNA6.2-TSPO clone 2 e J774 deixar de ser observada no tempo de 48 horas sugere um possível papel do TSPO sobre a fase inicial da infecção. No entanto, foi realizado apenas um experimento em triplicata, sendo necessário a realização de repetições para determinar o possível papel que o TSPO desempenha na infecção por *Leishmania*. Além disso, pretendemos utilizar ligantes agonistas e antagonistas do TSPO para esclarecer o papel desta proteína na infecção por *Leishmania*, avaliar o potencial de membrana mitocondrial e a produção de radicais de oxigênio por células sobre-expressando o TSPO infectadas por *Leishmania*.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que a sobre-expressão do TSPO reduz a fase inicial da infecção de *L. amazonensis* por células J774.

7. REFERÊNCIAS

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v. 61, n. 7, p. 2952-9, Jul 1993.

ANDRADE, Z. A. *et al.* Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am J Pathol**, v. 114, n. 1, p. 137-48, Jan 1984.

ANTOINE, J. C. *et al.* The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 392-401, Oct 1998.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v. 119, p. 238-258, Jun 2004

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med**, v.4, n.6, p. 601-609, Sep 2004.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev Bras Epidemiol**, vol. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BARRAL, A. *et al.* Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 8, p. 3442-6, Apr 15 1993.

BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends Microbiol**, v. 6, p. 35-40. 1998

BLACKWELL, J. M. *et al.* Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J Exp Med**, v. 162, n. 1, p. 324-31, Jul 1 1985.

BOGDAN, C, *et al.* Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur J Immunol**, v.21, n.2, p. 327-333, Feb 1991.

CHANG, C. S.; CHANG, K. P. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 1, p. 100-4, Jan 1986.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. **J Exp Med**, v. 147, n. 2, p. 515-30, Feb 1978.

CHAUDHURI, G. *et al.* Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **J Biol Chem**, v. 264, n. 13, p. 7483-9, May 5 1989.

CHELLI, B. *et al.* Peripheral benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial transmembrane potential depolarization and apoptosis induction in rat C6 glioma cells. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 1, p. 125-34, Jul 2004.

CHEN, M. K.; GUILARTE, T. R. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. **Pharmacol Ther**, v. 118, n. 1, p. 1-17, Apr 2008.

DEKREY, G. K. *et al.* Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 827-9, Feb 1998.

DESCOTEAUX, A. *et al.* *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. **J Immunol**, v. 146, n. 8, p. 2747-2753, Apr 1991.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **J Exp Med**, v. 185, n. 12, p. 2061-8, Jun 16 1997.

EVERETT, H. *et al.* M11L: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. **J Exp Med**, v. 191, n. 9, p. 1487-98, May 2000.

FAVREAU, F. Expression and modulation of translocator protein and its partners by hypoxia reoxygenation or ischemia and reperfusion in porcine renal models. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 297, n. 1, p. 177-90, Apr 2009.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 2, p. 136-69, Jun 1997.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 439-54, Mar 2006.

GOMES, I. N. *et al.* Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 4, p. 251-260, Apr 2003.

GOUGH, P.J.; GORDON, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. **Microbes Infect**, v. 2, n. 3, p. 305-311, Mar 2000.

GRACHEV, D. E. *et al.* Effect of Ro 5-4864 and PK11195 on protein phosphorylation in mitochondria isolated from primary cultures of rat

astrocytes. **Biochemistry (Mosc)**, v. 4, n. 1, p. 43-49, May 2009.

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 3, p. 230-50, Jul 1993.

HANDMAN, E. *et al.* Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. **J Immunol**, v. 137, n. 11, p. 3608-3613, Dec 1986.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 229-43, Apr 2001.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 8, p. 332-34, Aug 2002.

HEINZEL, F. P. *et al.* Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J Exp Med**, v. 169, n. 1, Jan 1, p. 59-72, 1989.

HOWARD, J. G., C. Hale, *et al.* Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunol**, v.2, n.4, p. 303-14. 1980.

JOHNSTON, C. *et al.* Identification of genes involved in the host response to neurovirulent alphavirus infection. **J Virol**, v. 75, n. 21, p. 10431-45, Nov 2001.

JORDÀ, E. G. *et al.* Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. **Apoptosis**, v. 10, n. 1, p. 91-104, Jan 2005.

KRESTININA, O. V. *et al.* Effect of peripheral benzodiazepine receptor (PBR/TSPO) ligands on opening of Ca²⁺-induced pore and phosphorylation of 3.5-kDa polypeptide in rat brain mitochondria. **Biochemistry (Mosc)**, v. 74, n. 4, p. 421-29, Apr 2009.

LACAPERE, J. J.; PAPADOPOULOS, V. V. Peripheral-type benzodiazepine receptor structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. **Steroids**, v. 68, n. 7-8, p. 569-85, Sep 2003.

LANG, T. *et al.* *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. **J Cell Sci**, v. 107, n. 8, p. 2137-50, Aug 1994 .

LEAO, S. S. *et al.* Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **J Cell Sci**, v. 108, p. 3219-3231, Oct 1995.

LEMOS DE SOUZA, V. *et al.* Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect**, v. 2, n. 15, p.1807-1815, Dec 2000.

LIBLAU, R. S. *et al.* Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. **Immunol Today**, v. 16, n. 1, p. 34-38, Jan 1995.

LOVE, D. C.; ESKO, D. J.; MOSSER, D. M. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **J Cell Biol**, v. 123, p. 759–766, 1993.

MAASER K. *et al.* Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. **Br J Cancer**, v. 85, n. 11, p. 1771-80, Nov 2001.

MASSOCO, C.; Palermo-Neto J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 15, n. 95, p. 11-19, Mar 2003.

McCONVILLE, M. J. *et al.* Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **EMBO J**, v. 11, n. 10, p. 3593–3600, Oct 1992.

McNEELY, T. B.; TURCO, S. J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. **J Immunol**, v. 144, n. 7, p. 2745-50, Apr 1 1990.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 145-73, 1989.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J Immunol**, v. 135, n. 4, p. 2785-9, Oct 1985.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Semin Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. 315-22, Oct 1993.

PERINOTO, A. C. *et al.* Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease. **Anal Chem**, v. 82, n. 23, p. 9763-8, Dec 1 2010.

RABINOVITCH, M. *et al.* Receptor-mediated entry of peroxidases into the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania mexicana amazonensis*. **J Leukoc Biol**, v. 37, n. 3, p. 247-61, Mar 1985.

RECHICHI, M. *et al.* TSPO over-expression increases motility, transmigration and proliferation properties of C6 rat glioma cells. **Biochim**

Biophys Acta, v. 1782, n. 2, p. 118-25, Dec 2008.

RUPPRECHT, R. *et al.* Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 12, p. 971-88, Dec 2010.

RUSSELL, D. G. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. **Eur J Biochem**, v. 164, n. 1, p. 213-221, Apr 1987.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp Parasitol** v. 69, p. 100-103, Jul 1989.

SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Infect Agents Dis**, v. 1, n.4, p. 200-206, Aug 1992.

SANTOS, D. O. *et al.* Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitol Res**, v. 103, n. 1, p. 1-10, Jun 2008.

SASAKI, Y. Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. **J Biotechnol**, v. 107, n. 3, p. 233-43, Feb 2004.

SHANKAR, A. H.; TITUS, R. G. T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med**, v. 81, n. 3, p. 845-55, Mar 1 1995.

SHEPHERD, V. L. *et al.* Receptor-mediated entry of beta-glucuronidase into the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania mexicana amazonensis*. **J Exp Med**, v. 157, n. 5, p. 1471-82, May 1 1983.

SOUSA-FRANCO, J. *et al.* Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 2, p. 390-400, Feb 2006.

SPATH, G. F. *et al.* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 16, p. 9536-41, Aug 5 2003.

STENGER, S. *et al.* Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med**, v. 180, n. 3, p. 783-93, Sep 1 1994.

STRAUS, A.H. *et al.* Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis*. **J Biol Chem**, v. 268, p. 13723-13730, 1993.

TITUS, R. G. *et al.* Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 170, n. 6, p. 2097-104, Dec 1 1989.

TOLSON, D. L. *et al.* Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. **Infect Immun**, v. 58, n. 11, p. 3500-7, Nov 1990.

TORRES, S. R. *et al.* Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 17, n. 408, p. 199-211, Nov 2000.

ZENO, S. *et al.* CoCl₂ induces apoptosis via the 18 kDa translocator protein in U118MG human glioblastoma cells. **Biochemistry**, v. 48, p. 4652-4661 2009.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 449-70, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. Brasília, 2 edição, 2007.

ESTADOS UNIDOS. Gateway® Technology with Clonase™ II. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Invitrogen, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações científicas, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en_>.