

Direcionando a morte de *Leishmania*: um avanço biotecnológico.

Izadora B. Paladine¹, Selma Giorgio², Daniel R. Abánades²

1. Estudante de IC do Instituto de Biologia, IB, UNICAMP – Campinas, SP; *izadora.paladine@gmail.com

2. Pesquisador do Instituto de Biologia, IB, UNICAMP – Campinas, SP

Palavras Chave: *Leishmania*, Plasmídeo, Gene tóxico

Introdução

Parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos de um amplo espectro de doenças conhecidas como leishmaniose, afetando mamíferos, incluindo os seres humanos. A infecção é iniciada pela inoculação de formas promastigotas existentes no inseto vetor durante a picada para a pele de hospedeiros mamíferos, onde as células fagocitam rapidamente os parasitos. Os promastigotas são englobados na vesícula parasitófora, onde o decréscimo de pH, em combinação com 37 °C da temperatura corporal do mamífero, provoca a transformação para a forma de amastigota¹. O processo de diferenciação amastigota é impulsionado por uma drástica mudança na expressão gênica, ativando e silenciando genes específicos desse estágio de vida². A forma amastigota é a forma patogênica do parasito e este utiliza diversos mecanismos para fugir da resposta imune do hospedeiro, permitindo a sobrevivência do parasita, ampliando a infecção e causando a doença.

Resultados e Discussão

Foi utilizado o plasmídeo pFL-AMA³, o qual restringe a expressão gênica especificamente para a forma amastigota. Nesse plasmídeo, foram incluídas duas sequências que codificam para proteínas tóxicas com o objetivo de causar danos ao parasita: forma ativa de tripsina bovina e avidina de ovo, obtendo dois plasmídeos diferentes: pFL-AMA-TrypTox e pFL-AMA-AviTox, respectivamente. Promastigotas de *Leishmania infantum* foram transfectados com ambos plasmídeos pFL-AMA-Tóxicos e selecionados na presença de Puromicina. Como controle nos ensaios, parasitas não transfectados WT (wild type) ou transfectados com a versão fluorescente não tóxica do plasmídeo (pFL-AMA-mCherry) foram usados. Primeiramente, provamos que promastigotas transfectados com pFL-AMA-Tóxicos não tem sua viabilidade afetada pela presença do plasmídeo através de curvas de crescimento. Por outro lado, durante diferenciação axênica para a forma amastigota (pH 5.5 e 37°C) os parasitas que possuem os plasmídeos tóxicos apresentaram queda drástica em sua viabilidade, de acordo com sua capacidade de metabolizar MTT e re-diferenciação a promastigota (pH 7.2 e 26°C), em comparação com os parasitas controles.

Além disso, macrófagos de linhagem canina DH82 foram infectados com promastigotas transfectados com os plasmídeos tóxicos e com os controles, e a sua capacidade de infecção foi avaliada utilizando coloração de Giemsa ao longo de 6 dias. Nenhuma diferença significativa em sua capacidade de infectar macrófagos foi observada entre os parasitas transfectados e os controles. Finalmente, para demonstrar o “suicídio” desses parasitas *in vivo*, fêmeas de camundongos susceptíveis Balb/c foram infectadas por via intraperitoneal com os

promastigotas transfectados com os genes tóxicos e com os controles. Após 10 ou 20 semanas de infecção, esses camundongos foram eutanaziados para análise de sua carga parasitária no baço. Aproximadamente metade dos camundongos inoculados com as linhagens tóxicas não apresentaram parasitas em baço após 10 semanas, como foi demonstrado por diluições seriadas. Por outro lado, parasitas sobreviventes foram cultivados em presença ou ausência de Puromicina e nenhuma forma de vida foi observada nas culturas com a droga de seleção, exceto parasitas extraídos de camundongos infectados com o plasmídeo fluorescente pFL-AMA-mCherry. Dessa maneira, nós demonstramos que promastigotas portadores dos plasmídeos pFL-AMA-Tóxicos também não sobrevivem no hospedeiro mamífero. Além disso, após 20 semanas de infecção, camundongos infectados com as linhagens de parasitas pFL-AMA-AviTox apresentaram redução de sua carga parasitária enquanto que o controle de parasitas selvagens apresentou um aumento, em relação aos dados de 10 semanas de infecção. Dessa forma, esses dados parecem indicar que camundongos infectados por parasitas pFL-AMA-AviTox estão controlando a infecção. Futuros ensaios poderão confirmar essa hipótese.

Conclusões

Mostramos nesse trabalho que parasitas *Leishmania infantum* transfectados com as versões tóxicas do plasmídeo pFL-AMA sofrem uma morte dirigida a forma amastigota. Apresentamos, pela primeira vez, um sistema capaz de conduzir uma morte programada a forma intracelular patogênica do parasita, o que pode permitir uma nova aproximação para explorar o processo de interações parasita-hospedeiro. Além disso, os experimentos *in vivo* nos permitem propor uma possível modulação do sistema imunológico, possibilitando a abertura para o estudo de uma nova vacina "atenuada". Dessa forma, concluímos com esse trabalho a apresentação de uma nova e poderosa ferramenta biotecnológica e biomédica.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela subvenção do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

1 Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*.1994;48:449-70.

2 Brotherton MC, Racine G, Foucher AL, Drummelsmith J, Papadopoulou B, Ouellette M. Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *J Proteome Res* 2010 Aug 6;9(8):3842-53.

3 Arruda LV. Desenvolvimento de plasmídeo para expressão protéica dependente da fase do ciclo de vida em *Leishmania*. Salvador. Tese [Doutorado em Patologia] – Fundação Oswaldo Cruz; 2013.