

## **LEISHMANIA AMAZONENSIS-GFP, AVALIAÇÃO DO DECAIMENTO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA E ESTRATÉGIAS PARA A SUA SELEÇÃO**

SOLANGE DOS SANTOS COSTA<sup>1</sup>, BARTIRA ROSSI-BERGMANN<sup>2</sup>, MÁRJORIE DE ASSIS GOLIM<sup>3</sup>,  
FÁBIO TRINDADE MARANHÃO COSTA<sup>1</sup>, SELMA GIORGIO<sup>1</sup>

Recentemente o método de transfecção gênica da Green Fluorescent Protein (GFP) usado em *Leishmania* tem facilitado o monitoramento de ensaios *in vitro* e *in vivo* para a avaliação de fármacos leishmanicidas. Os parasitas transfectados, entretanto expressam de forma heterogênia o gene GFP e o plasmídeo é perdido na ausência de pressão seletiva ao marcador de resistência. Com a perda da intensidade de fluorescência torna-se necessária a seleção dos parasitas fluorescentes utilizando o antibiótico geneticina. Até o presente não há relatos sobre a investigação do decaimento da intensidade de fluorescência dos parasitas-GFP e os métodos de seleção são destinados as formas promastigotas e não aos amastigotas, forma encontrada no hospedeiro vertebrado. Os objetivos deste trabalho foram: 1- investigar a dinâmica do decaimento da intensidade de fluorescência de promastigotas de *L. amazonensis*-GFP durante um período longo (7 meses); 2- avaliar a eficiência dos protocolos de seleção para promastigotas e amastigotas. Os métodos de análise foram a citometria de fluxo e a microscopia de fluorescência. A seleção de promastigotas-GFP ( $5 \times 10^5$ /ml) foi feita com 1mg/ml de geneticina. O acompanhamento por 7 meses da cultura de promastigotas mostrou que 70% dos parasitas não estavam fluorescentes, mas foi possível estabelecer uma seleção eficaz de 80-90% de parasitas-GFP selecionando-os bimensalmente. Os testes com amastigotas-GFP ( $1 \times 10^7$ /ml) isolados da lesão de camundongos Balb/c e cultivados em meio 199 com 1mg/ml de geneticina e o testes *in vivo* dos amastigotas-GFP após aplicação de 3 a 6 doses de geneticina (40mg/kg) *intra-lesão* em camundongos Balb/c com 90 dias de infecção, mostraram que a seleção de amastigotas é possível, apesar da eficiência ser baixa (10% a 20% de parasitas fluorescentes). Concluímos que apesar da seleção de promastigotas-GFP ser mais eficaz, é possível o desenvolvimento de testes com amastigotas-GFP. Apoio: FAPESP, CAPES e CNPq.

<sup>1</sup> INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<sup>2</sup> INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO – UFRJ

<sup>3</sup> HEMOCENTRO DE BOTUCATU – UNESP solangecost@gmail.com