Área de submissão: CB

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA* GENETICAMENTE MODIFICADA PARA EXPRESSAR CONSTITUTIVAMENTE A PROTEÍNA FLUORESCENTE YELLOW CAMELEON-NANO 50: UMA FERRAMENTA PARA SCREENING DE COMPOSTOS ANTILEISHMANIAIS QUE INTERFEREM NA HOMEOSTASE DO CÁLCIO

Laura Aquino Silva[1], Jhonatan Santos de Lima[1], Natalia Caroline Silva Costa Coelho[1], Márcia Aparecida Silva Graminha[1]

1 Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara-SP.

As leishmanioses são parasitoses causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que apresentam diversas manifestações clínicas e são tidas como um problema de saúde pública nas Américas. Atualmente, os fármacos disponíveis para tratamento de leishmanioses estão relacionados a efeitos adversos frequentes, elevada toxicidade, teratogenicidade, difícil administração e alto custo. Assim, faz-se necessário o estudo de novas opções terapêuticas. Os mecanismos de sinalização do Ca^{2+} vêm sendo considerados alvos interessantes para ação de moléculas leishmanicidas, visto que a homeostase desse íon está envolvida em processos importantes no metabolismo do parasita e em sua infectividade. A avaliação desses compostos requer ensaios funcionais nos quais o emprego de métodos fluorimétricos baseados em indicadores fluorescentes por meio de expressão de proteínas geneticamente modificados representa uma abordagem promissora. Sendo assim este trabalho, este trabalho tem desenvolvido uma *Leishmania* geneticamente modificada que expressa uma proteína de forma constitutiva, visto que a expressão de genes exógenos em *Leishmania* utilizando-se vetores extracromossomais apresenta limitações como heterogeneidade da população de necessidade de pressão seletiva com antibiótico, que podem ser contornadas com o uso de sistemas de expressão constitutiva derivados da utilização do locus cromossômico 18S rRNA para integração de genes, possibilitando a expressão de transgenes a longo prazo. **OBJETIVO**: O estudo visa gerar cepas transgênicas de *Leishmania amazonensis* que expressam constitutivamente o indicador de Ca^{2+} *Yellow Cameleon-nano50* (YC-nano50), almejando possibilitar sua futura aplicação em estudos de avaliação de drogas que possam interferir na homeostase de cálcio. **MATERIAIS E MÉTODOS**: Os plasmídeos pLEXSYneo-2.1 e pcDNA3, que contém o gene da proteína fluorescente *Yellow Cameleon-nano50*, foram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Bam*HI. Os produtos foram aplicados em eletroforese em gel de agarose 1% e as respectivas bandas de interesse foram purificadas. Ligou-se o inserto YC-nano50 no vetor pLEXSY empregando-se a enzima T4 DNA ligase na proporção 5:1 (inserto:vetor). Foi realizada a transformação por eletroporação utilizando a linhagem Top 10 de *Escherichia coli*, selecionando os transformantes em meio LB contendo 50mg/µL de ampicilina. Realizou-se a confirmação dos clones por digestão com as mesmas enzimas e visualização do produto em eletroforese em gel de agarose 1%. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**: Os fragmentos de interesse dos plasmídeos pLEXSYneo-2.1 e pcDNA3 foram corretamente obtidos e os transformantes selecionados. Entretanto, não observou-se bandas compatíveis com clones positivos na análise por eletroforese, denotando que não houve êxito na construção do plasmídeo recombinante. Apesar disso, os primers para confirmaçãodos candidatospor sequenciamento foram desenhados.**CONCLUSÃO**: As técnicas empregadas permitiram a obtenção dos respectivos fragmentos para construção do plasmídeo recombinante. Contudo, ainda não houve confirmação da construção. Assim, prentende-se efetuar novas ensaios de ligação, com ajuste nas proporções de inserto e vetor, seguida de novas transformações e seleção, almejando a obtenção de um clone recombinante e sua confirmação, seguida de extração e triagem para tranfecção em *L. amazonensis*.

Palavras chaves: *Leishmania*, expressão constitutiva, sinalização de Ca^{2+},locus cromossômico 18S rRNA.

Apoio financeiro: FAPESP (processo: 2024/23195-6), Finep (processo:).