Maíra Natali Nassar

**Análise estrutural e funcional da região
promotora de rDNA de *Leishmania (Viannia)*
braziliensis e estudo comparativo com as regiões
de *Leishmania (Leishmania)***

São Paulo

2009

Maíra Natali Nassar

**Análise estrutural e funcional da região
promotora de rDNA de *Leishmania (Viannia)*
braziliensis e estudo comparativo com as regiões
de *Leishmania (Leishmania)***

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador(a): Lucile Maria
Floeter-Winter

São Paulo

2009

Ficha Catalográfica

Nassar, Maíra Natali

Análise estrutural e funcional da região promotora de rDNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo comparativo com as regiões de *Leishmania (Leishmania)*

Número de páginas: 120

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia

1. Leishmania 2. RNA ribossômico 3. Promotor gênico 4. Transcrição gênica I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Aos meus pais, Solange e Paulo,
por toda força, apoio e compreensão
em cada momento da minha jornada

“A pior coisa que pode acontecer na vida de uma pessoa não é quando seu projeto não dá certo, seu plano de ação não funciona ou quando a viagem termina no lugar errado. O pior é não começar. Esse é o maior naufrágio.”

Amyr Klink – Mar Sem Fim

Agradecimentos

Agradeço inicialmente à professora Dra Lucile Maria Floeter-Winter, por ter me recebido em seu laboratório. Agradeço os puxões de orelhas, os conselhos, as discussões e principalmente os ensinamentos.

Agradeço também ao Mario Gustavo Mayer por me ensinar diversas técnicas de biologia molecular. Pela paciência e prontidão. Pela amizade que surgiu nas longas horas trabalhando juntos. Pelas discussões intermináveis. Por toda ajuda, profissional e pessoal. Agradeço pelo grande amigo que ganhei.

Agradeço ao vizinho de bancada Emerson Martins pelas discussões dos experimentos finais, pelos auxílios “computacionais”, por dividir pipetas, reagentes, poços de gel de agarose mesmo quando eu pedia 48 emprestados.

Agradeço ao Ricardo Zampieri pelo apoio técnico e toda ajuda.

À Carolina, Emerson e Mario por terem tanto me apoiado durante todo o projeto e principalmente na fase final do trabalho, não permitindo que eu desistisse. E, principalmente, por tornarem essa fase divertida.

Aos amigos do “Bat Lab”: Ricardo, Marcos, Mario, Fernanda, Emerson, Carolina, Rafaella e Camila pelos ensinamentos que cada um, de sua forma, me proporcionou.

À Luci, Adriana e Wilton do Departamento de Bioquímica, pelos auxílios experimentais no seqüenciamento e no uso do Citômetro de Fluxo. À Adriana e Wilton pela amizade que surgiu durante os experimentos.

Aos “amigos do fumódromo” pelas discussões filosóficas de sempre.

À Rafaella, Ana Paula, Paloma, Piero, Carol, Mara, Eduardo, Fabiano, Mario e Emerson, por nossa amizade ter superado o limite do departamento e por estarem sempre dispostos a me ouvirem.

Aos professores do departamento Cida Visconti, Célia Garcia, Débora Chadi, Regina Markus e aos integrantes de seus laboratórios, pela disposição em emprestar equipamentos e reagentes, e pela gentileza com que sempre me trataram.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia D. Irani, Gisele e Rosely pelos serviços prestados.

Aos amigos de “fora”: Fabiana, amiga acima de tudo, pelos conselhos em cada momento da minha vida, Robert por ser sempre tão teimoso comigo, Camila pela amizade que vem crescendo desde a faculdade, Marcos por toda força e bronca.

Aos amigos que estão e estiveram em minha vida acadêmica. Cada um, de forma única, foram importantes nessa jornada.

À minha família: Paulo, Solange, Paulinho por todo carinho e força. Em especial a Solange por sua amizade incondicional e Paulo por me apoiar em cada escolha.

Resumo

Um conjunto de quadros clínicos conhecidos genericamente por Leishmaniose, que representa um sério problema de Saúde Pública, tem como agentes etiológicos protozoários do gênero *Leishmania*. Em seu ciclo de vida, o parasita apresenta dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), de acordo com a posição ocupada pela forma promastigota no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado.

Genes que codificam RNA ribossômico são exclusivamente transcritos pela RNA polimerase I. A região promotora dessa polimerase é conhecida como espécie-específica. Estudos anteriores, baseados em ensaios de expressão transiente com construções nas quais a expressão do gene repórter CAT era dirigido por diferentes regiões do promotor mostraram que em *Leishmania* há um reconhecimento espécie-específico, mas que espécies filogeneticamente relacionadas reconhecem melhor o promotor do que a espécie homóloga.

A caracterização estrutural da região promotora de RNA pol I de *L. (V.) braziliensis* possibilitou mapear o sítio de início de transcrição e definir a provável região promotora de RNA pol I desse organismo. Quando comparamos o 5' ETS da região estudada, com a região correspondente das demais espécies do subgênero *L. (Leishmania)*, notamos uma alta similaridade tanto no tamanho, quanto na sequência de nucleotídeos. Já na região IGS os blocos de repetição apresentam tamanho similar, porém seqüências distintas,

assim como a sequência à montante do ETS. Não foi determinado o número de blocos de repetição presente em cada cístron de *L.(V.) braziliensis*.

Os estudos de ligação de fatores nucleares à região central do promotor mostraram que houve um reconhecimento diferencial dessa região entre a espécie homóloga *L. (V.) braziliensis* e as espécies heterólogas *L. (V.) guyanensis*, pertencente ao mesmo subgênero e *L. (L.) amazonensis*. Os complexos protéicos associados a essa região central apresentaram maior afinidade com a espécie heteróloga *L. (V.) guyanensis*.

O fato de ser o ensaio de CAT trabalhoso e demorado levou à busca de outro repórter que evidenciasse a funcionalidade da região promotora ao mesmo tempo em que permitisse a quantificação dessa expressão, de modo a medir a força do promotor. Neste trabalho iniciamos a padronização para utilizar GFP como gene repórter no estudo da funcionalidade de promotores. Foi possível mostrar que a GFP é detectável em microscopia confocal e que as células que expressam GFP podem ser quantificadas em FACS, no entanto, essas detecções só foram possíveis em parasitas selecionados por uma marca de seleção, ou seja, numa transfecção estável. Assim, substituir o gene repórter CAT pelo gene GFP foi inadequado para os ensaios de transfecção transiente, impedindo que fosse medida a atividade da região promotora de *L. (V.) braziliensis* em diferentes espécies.

Abstract

Leishmaniasis is the generic name of a serious public health problem that is caused by protozoa of the genus *Leishmania*. In its lifecycle, the parasite has two hosts, a vertebrate and an invertebrate. The genus *Leishmania* is divided into two subgenera: *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Vianna)*, according to the position occupied by the promastigotes form at the gut of the invertebrate host.

Genes that encode ribosomal RNA are exclusively transcribed by RNA polymerase I. The promoter region of the RNA polymerase I is known to present a species-specific recognition. Previous studies, based on transient expression assays with constructions in which the expression of the reporter gene CAT was directed by different regions of the promoter showed that RNA pol I promoter in *Leishmania* is species-specific, but in phylogenetically related species the expression of the reporter gene is higher than in the homologous species.

The structural characterization of the promoter region of RNA pol I of *L. (V.) braziliensis* enabled to map the site of initiation of transcription and to define the promoter region of RNA pol I. The comparison of the determined 5' region of the ETS region, with the corresponding region of other species of the subgenus *L. (Leishmania)*, showed a high similarity both in size, as in the sequence of nucleotides. However, the IGS region and the repetitive blocks of nucleotides have similar size but different sequences.

The studies of binding of nuclear factors to the central region of the promoter showed that there was a recognition between the species counterpart *L. (V.) braziliensis* and the heterologous species *L. (V.) guyanensis*, belonging

to the same subgenus and *L. (L.) amazonensis*, that belongs to another subgenus. The complex protein associated with this central region showed greater affinity with the heterologous species *L. (V.) guyanensis*.

The fact that to quantify the CAT expression represents a laborious and time consuming test lead us to search for another reporter that could identified the functionality of the promoter region and at the same time allowed the quantification of expression in order to measure the strength of the promoter.

In the present work, we began the standardization for the use of GFP gene as reporter in the study of the functionality of promoters. It was possible to show that GFP is detectable in confocal microscope and the cells that express GFP can be quantified in FACS, however, these findings were made possible only in parasites selected by the mark, ie in a stable transfection. So, the replacement of CAT by GFP reporter showed to be inadequate for testing promoters in transient transfection. This prevented the measure of the activity of the promoter region of *L. (V.) braziliensis* in different species.

Introdução

1. Histórico da Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença não contagiosa, que apresenta uma evolução crônica que acomete pele e cartilagem, ou órgãos internos de forma localizada ou difusa, sendo causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901 emend. GROBBEN, 1905), ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963, emend). Esses protozoários causam infecções de caráter zoonótico que atingem o homem e seus animais domesticados de maneira secundária. A leishmaniose visceral acomete o sistema linfo-monocitário de forma sistêmica, progredindo até a morte.

A leishmaniose tegumentar americana, também conhecida como LTA, é uma doença associada ao homem desde os primórdios. Na literatura encontramos relatos e descrições datados desde o século I dC (Lainson, 1997; Camargo e Barcinski, 2003). Cerâmicas pré-colombianas feitas por índios do Peru, datadas de 400 a 900 dC, foram encontradas em nosso continente. Os indivíduos representados nessas cerâmicas apresentavam lábios e narizes desfigurados, sinais característicos de espúndia, uma das denominações populares da leishmaniose mucocutânea (Lainson e Shaw, 1988).

No Brasil, a primeira citação de LTA foi encontrada no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827. Nesse documento foi

relatada a viagem de um Frei que percorreu as regiões do vale amazônico, onde observou a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas a picadas de inseto, tendo como consequência lesões destrutivas de boca e nariz (Paraguassu-Chaves, 2001).

No Brasil, em 1885 Cerqueira relatou a existência de doenças de pele, identificadas clinicamente como botão de Biskra. Na Itália em 1895, Breda descreveu a doença em italianos que viajaram a São Paulo (Pessôa, 1982).

A natureza leishmaniótica das lesões nasofaríngeas e de pele foram confirmadas pela primeira vez no Brasil em 1909 por Lindenberg, que isolou formas de Leishmânia idênticas a *Leishmania tropica* (Wright, 1903) em lesões cutâneas de trabalhadores residentes próximos da mata no interior de São Paulo (Pessôa, 1982).

Gaspar Vianna batizou essa forma isolada de *Leishmania braziliensis* por considerar esse parasita diferente da *L. tropica*. Vianna estudou a grande epidemia que ocorreu no início do século XX no Estado de São Paulo com a construção da Estrada de Ferro Noroeste. O desmatamento para a posterior construção da estrada fez com que os vetores migrassem da copa das árvores para o solo, fazendo seu repasto sanguíneo nos trabalhadores da região. Como isso ocorreu na região de Bauru, a doença foi denominada “úlceras de Bauru” ou “nariz de tapir” (Silveira e cols., 1997).

Até meados dos anos 70, no Brasil, todos os casos de LTA eram diagnosticados como *L. braziliensis*. Com o desenvolvimento e o aprimoramento das técnicas de análise, com o aumento de estudos ecológicos e epidemiológicos, novas espécies foram descritas (Lainson, 1997; Silveira e cols., 1997; Marzochi, 1992; Ministério da Saúde do Brasil 1994 e 2000).

2. Ciclo de vida do parasita

O agente etiológico da Leishmaniose é um parasita obrigatório, com um ciclo digenético. No hospedeiro vertebrado, o parasita encontra-se na forma amastigota, intracelular obrigatória de macrófagos. Sua morfologia celular é arredondada ou ovóide, variando de tamanho entre 2 a 6 μm em extensão e 1,5 a 3 μm de largura, com um flagelo muito reduzido. Os macrófagos fagocitam os parasitas, formando os vacúolos digestivos ou fagolisossomos. Nesse compartimento, os parasitas se multiplicam por divisão binária, rompendo o macrófago e liberando novos amastigotas, aptos a infectar novos macrófagos. Ao fazer um repasto sanguíneo em um vertebrado parasitado, o hospedeiro invertebrado, mosquitos flebotomíneos (Ordem Díptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae), sugam junto com o sangue, macrófagos periféricos infectados com leishmânias. Uma vez no tubo digestivo do mosquito, as formas amastigotas são liberadas e se diferenciam em promastigotas, formas delgadas, com cerca de 1,4 μm de largura e 20 μm de comprimento, com um flagelo típico. Essas formas se multiplicam

intensamente por divisão binária e quando atingem um grande número diferenciam-se em formas metacíclicas infectivas, de rápido movimento, corpo pequeno e longos flagelos que invadem porções anteriores do esôfago e proventrículo do mosquito. No próximo repasto sangüíneo, a regurgitação do material aspirado assegura a inoculação das formas infectantes em um novo hospedeiro vertebrado. No tegumento desse novo hospedeiro, essas formas são fagocitadas por macrófagos e diferenciam-se na forma amastigota (Rey, 2001).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), de acordo com a posição ocupada pela forma promastigota no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (Lainson e Shaw, 1988). No Brasil encontramos espécies pertencentes a ambos os subgêneros, destacando-se entre elas *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*.

Quanto à forma clínica, didaticamente as leishmanioses podem ser divididas de acordo com os principais agentes etiológicos: *L. (V.) guyanensis* (responsável pela forma cutânea difusa), *L. (V.) braziliensis* (responsável pela forma cutâneo-mucosa), *L. (L.) amazonensis* (responsável pela forma clínica cutânea, porém alguns casos podem desenvolver a forma clínica difusa e incurável da doença) e *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* (responsável pela forma visceral).

A LTA é uma zoonose primária de mamíferos silvestres como roedores, marsupiais, edentados e primatas. O homem está sujeito a

adquirir a doença ao entrar em contato com áreas florestais onde existem as enzootias pelas diferentes espécies de *Leishmania* (<http://www.who.int/emc/disease/leish/index.html>).

A *L.(V.) braziliensis* apresenta-se distribuída em todo o território nacional, e também em vários países da América do Sul e Central. São conhecidas poucas informações sobre seus hospedeiros silvestres tendo sido apenas relatado a presença desse parasita em roedores (*Akodon sp.*, *Proechimys sp.*, *Rattus sp.*, *Oryzomys sp.* e *Rhipidomys sp.*) e no marsupial *Didelphis* (Brandão-Filho e cols. 2003). Na transmissão peridoméstica, apresentam-se como hospedeiros: cavalos, cães, jumentos e até gatos (Tolezano e cols. 2007). No homem essa espécie é responsável pela leishmaniose cutânea e a cutâneo-mucosa (Lainson, 1997; Silveira e cols., 1997; Marzochi, 1992; Ministério da Saúde do Brasil 1994 e 2000).

Quanto ao vetor invertebrado, na Serra dos Carajás, encontramos como vetor o *Psychodopygus wellcomei* (de comportamento antropofílico, fazendo repasto sanguíneo diurno e apresentando uma de maior atividade nas estações de chuva), além de outras espécies que vêm se adaptando em áreas peridomésticas, e ainda as de florestas primárias (*Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia*, *Lu. carreraei*).

Quanto à distribuição geográfica e epidemiológica estima-se que as leishmanioses, tanto na forma cutânea como visceral, apresentam

uma equivalência de 12 milhões de casos no mundo, sendo que cerca de 350 milhões de pessoas estão em 88 países ameaçados de contrair a doença. Desses países, 72 são países em desenvolvimento. A Leishmaniose visceral quase em sua totalidade pode ser encontrada no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão. Já a leishmaniose muco-cutânea é encontrada no Brasil, Bolívia e Peru. Com relação à leishmaniose cutânea, os países ameaçados correspondem ao Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria ([http: /www.who.int/emc/disease/leish/index.html](http://www.who.int/emc/disease/leish/index.html)).

3. Controle da expressão de rDNA pela RNA polimerase I

Em eucariotos, o processo de transcrição de genes é bastante complexo e existem três RNA polimerases, denominadas RNA polimerase I, II e III. Essas RNA polimerases apresentam diferentes especificidades, em relação aos fatores de transcrição e sítios promotores nos genes que transcrevem. Os mRNA (RNA mensageiro) são sintetizados pela RNA polimerase II (RNA pol II); rRNA (RNA ribossômico), pela RNA polimerase I (RNA pol I) e tRNAs, snRNAs, e outros RNA pequenos, pela RNA polimerase III (RNA pol III), sendo que para essas duas RNA polimerases o RNA é o produto final da expressão gênica.

Resumidamente, a transcrição ocorre com a ligação de fatores iniciadores de transcrição e a ligação da RNA polimerase específica à região promotora do gene que será transcrito. Essa associação é denominada complexo de iniciação. Em seguida ocorre a formação da fita de RNA e então a sua elongação, nessa etapa ocorre a ligação ao complexo de fatores de elongação. Sinais de terminação fazem com que todo o complexo se desligue da cromatina, desmontando o complexo e liberando a molécula de RNA sintetizada.

Na transcrição de mRNA, durante a elongação, ainda ocorre a adição de um “capping” na extremidade 5’; o “splicing” ou retirada de íntrons, pela associação da maquinaria de processamento de RNA ou spliceossomo; e a poliadenilação da extremidade 3’, pela ação da enzima PoliA polimerase.

Na maioria das espécies de eucariotos os genes de rRNA se repetem de 100 a 5000 vezes por genoma haplóide. Em células de mamífero em crescimento são requisitados 2×10^6 ribossomos a cada 15 horas de geração. A transcrição dos genes se dá com a elongação de aproximadamente 30 nucleotídeos/segundo (Solner-Webb e Tower, 1986) sendo, portanto, muito eficaz e rápida para suprir a necessidade da célula. Os genes de rRNA estão localizados em um ou poucos sítios da cromatina chamados organizadores de nucléolos. Nucléolos são organelas densas que se formam durante a interfase e consistem dos sítios onde se localiza a maquinaria de transcrição do rDNA, os fatores

de seu processamento e a montagem dos ribossomos com a reunião das proteínas ribossômicas que foram endereçadas a esse local.

O transcrito primário consiste de precursor de 35-47 S (ou 6-15 kb), que é processado por meio de uma série de clivagens de endonucleases para originar as espécies maduras de rRNA (Sollner-Webb e Tower, 1986).

Em vertebrados, uma unidade padrão de transcrição de rDNA codifica o precursor de rRNA, que contém as seqüências do 18S (ou SSU) que fará parte da subunidade menor do ribossomo; 28S (ou LSU) e 5.8S, que juntamente com o rRNA 5S, transcrito de outro *locus*, farão parte da subunidade maior do ribossomo. Cada unidade contém elementos seqüenciais importantes que regulam a transcrição do pré-rRNA, tais como a região promotora de transcrição, estimuladores (enhancers), espaçadores transcritos ou não, terminadores de transcrição, origem de replicação, e barreira de forquilha de replicação que previne a forquilha de replicação de colidir com a RNA polimerase I durante a fase S. A disposição em *tandem* dos múltiplos genes de rDNA é útil para aumentar a dosagem gênica e para manter a similaridade das seqüências de rRNA (ver esquema na figura 1).

Com a exceção de espécies muito relacionadas, seqüências promotoras de rDNA de eucariotos tem divergido significativamente. Esse sítio consiste na região gênica na qual se liga a maquinaria de transcrição, ou seja RNA pol I e seus fatores de iniciação. Consistente

com essa disparidade de seqüência, a transcrição de rDNA é geralmente específica a ordens taxonômicas, o promotor de um grupo não costuma ser reconhecido pela maquinaria de outros promotores (para revisão Heix e Grummt 1995).

Crucialmente, há um fino balanço entre o crescimento da célula e a acumulação de rRNAs sendo essencialmente controlado ao nível da transcrição de rDNA (Russell e Zomerdjik, 2005).

Figura 1: Organização dos genes de rRNA. (A) Microscopia eletrônica de cromatina nuclear de levedura. O longo rRNA (seta) surge como resultado da transcrição pelo complexo RNA pol associado a seus fatores. Se observa vários complexos ao longo do gene, indicado por uma seta rDNA. A transcrição se inicia pelo promotor (P) e termina no terminador (T). (B) Representação de uma unidade de rDNA (não em escala). A transcrição por RNA pol I produz o precursor rRNA 47S, que é em parte processado e modificado por metilação e pseudo-uridinilação para produzir os rRNAs maduros: 18S, 5.8S e 28S. A região do promotor contém o domínio central (core) no qual se situa o sítio de início de transcrição (+1), e o domínio à montante, responsável pelo reconhecimento de vários fatores de iniciação. Vários elementos terminadores de transcrição estão localizados no final 3' de cada região transcrita dos genes de rRNA e imediatamente à montante do sítio de início de transcrição (T₀) (ilustração extraída de Russell e Zomerdjik, 2005).

Como já mencionado, à exceção de espécies muito relacionadas, seqüências promotoras de rDNA de eucariotos tem divergido significativamente. Com poucas exceções, os promotores de rDNA compartilham organizações modulares, consistindo de um domínio central ou core (CP) e elementos à montante (UCE). O alinhamento estereoespecífico de ambas as seqüências é crucial para um início de transcrição eficiente (Russell e Zomerdjik, 2005). Análises de parâmetros estruturais dos promotores de genes ribossômicos em diferentes organismos, variando de humanos a plantas avasculares, revelaram a conservação de aspectos estruturais específicos, menos as seqüências bases que são fundamentais para o funcionamento do promotor (Marilley e Pasero 1996; Marilley e cols. 2002). Aparentemente, um código estrutural, em adição à seqüência primaria, dirige a interação DNA-proteína no promotor de rDNA e deve ter uma função muito importante no controle da transcrição (Russell e Zomerdjik, 2005).

Estudos de transcrição *in vitro* e modificações genéticas pontuais permitiram isolar as regiões essenciais para a regulação do promotor de RNA pol I. Os principais modelos biológicos foram *Xenopus*, *Drosophila*, *Saccharomices* e *Rattus*. Foi denominado domínio central a região compreendida entre os nucleotídeos -45 e + 20 do promotor, sendo que essa região é necessária e suficiente para que ocorra a transcrição (Sollner-Webb e Tower, 1986). Acreditava-se que essa região era

responsável pela espécie seletividade (Paule e White, 2000; Jacob e Ghosh, 1999; Grummt, 1999).

No domínio central ocorre a ligação de RNA pol I e alguns fatores que auxiliam no reconhecimento do promotor, além de fatores de alongação e terminação da transcrição. Resumidamente, a iniciação da transcrição de rDNA é mediada por um complexo multiprotéico específico contendo RNA pol I e pelo menos quatro fatores basais de transcrição. A formação do complexo pré-iniciador da transcrição necessita da ligação à montante de UBF (upstream binding factor) (Jantzen et al. 1990, Paule e White, 2000; Jacob e Ghosh, 1999; Grummt, 1999) e do fator seletivo do promotor, chamado TIF-IB (transcription factor I B) em ratos (Clos et al. 1986); de SL1 (complexo protéico formado pelas proteínas TBP-TATA-[binding protein] e TAF's [RNA pol I-specific TBP associated factors]) em humanos (Learned et al. 1985).

A região que se encontra entre os nucleotídeos -150 a -200 é denominada domínio à montante do promotor. Essa região aumenta a atividade do domínio central e sua ausência não limita o início da transcrição. O fator UBF se liga a esse domínio junto de fatores que auxiliam na manutenção da transcrição (Paule e White, 2000; Jacob e Ghosh, 1999; Grummt, 1999).

Encontramos também associada ao promotor, uma região rica em elementos repetitivos ("enhancers"). Esses elementos se ligam aos fatores de transcrição potencializando a transcrição. Em 1994, Pikaard e

cols. descreveram a presença do fator UBF ligado aos elementos repetitivos do gene de rDNA de *Xenopus*, junto de outros fatores de transcrição. Jacob descreveu em 1995 que determinados eucariotos possuíam outros fatores ligados a essa região repetitiva.

Os genes ribossômicos foram os primeiros caracterizados em eucariotos e até hoje representam os genes mais estudados. Houve um grande progresso no entendimento da transcrição ao nível molecular. Foram desenvolvidas tecnologias para clonagens de genes de rRNA e sua transcrição foi determinada como espécie-específica, diferentemente das RNA's pol II e III. Sollner-Webb e Tower (1986) demonstraram que a transcrição por RNA pol I pode ser tolerada entre as espécies. Alguns sistemas *in vitro* foram utilizados para testar a espécie seletividade da transcrição. Proteínas nucleares de camundongo reconheceram o promotor de *Xenopus*, sugerindo uma conservação no processo de transcrição (Culotta e cols., 1987) e os fatores de transcrição de *Xenopus* reconheceram o promotor do besouro *Dytiscus* (Sollner-Webb e Tower, 1986).

Uma explicação do possível porquê da maquinaria de RNA pol I poder reconhecer espécies relacionadas, se baseia em ser sua função restrita a transcrição de um único gene, e portanto centralizada em um único promotor.

Apesar dos fatores de transcrição serem compatíveis entre espécies proximalmente relacionadas, o requerimento de fatores

homólogos espécie específicos é bastante rigoroso com o promotor de rDNA entre espécies não relacionadas. Sendo assim, pode-se dizer que houve uma co-evolução dos fatores de iniciação e a seqüência promotora.

4. Regulação da expressão gênica em Tripanosomatídeos

A família Trypanosomatidae apresenta maneiras bastante diferenciadas de regular a expressão gênica. Por exemplo, a transcrição de mRNA é policistrônica, sendo que o processamento de RNA que leva à individualização de cada mRNA é feito por “*trans-splicing*” (para revisão ver Mayer e Floeter-Winter, 2005) acoplado à poliadenilação do mRNA à montante do primeiro. Não há promotor de RNA pol II descrito, sendo que foram determinados alguns sítios de início de transcrição, centrípeta ou centrífuga, nos cromossomos (Myler e cols., 1999).

Interessante a observação de que em *Trypanosoma brucei*, membro dessa família, genes que codificam glicoproteínas variantes de superfície (VGS) e prociclinas (PARP) são naturalmente transcritos por RNA pol I, sendo transpostos para um sítio ativo de transcrição que contém a região promotora (Cross e cols., 1999).

No início dos estudos de regulação de expressão de genes transcritos por RNA pol I, alguns tripanosomatídeos tiveram os promotores descritos, mas, a exemplo do que ocorre com outros

eucariotos, nenhuma seqüência consenso foi encontrada (White e cols., 1986; Grondal e cols., 1990; Zomerdijs e cols., 1991; Rudenko al. 1991; Dietrich e cols., 1993; Martinez-Calvillo e Hernandez, 1994; Tyler-Cross e cols., 1995; Uliana e cols., 1996; Gay e cols., 1996; Yan e cols., 1999; Orlando e cols., 2002).

A caracterização da seqüência promotora de RNA pol I em diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi* mostrou em testes de expressão de CAT após transfecção transiente que o promotor da cepa do tipo 1 era reconhecido apenas por organismos da mesma linhagem. Já o promotor da cepa tipo 2 era bem reconhecido tanto por organismos da cepa tipo 2 quanto da cepa tipo 1 (Tyler-Cross e cols., 1995; Nunes e cols., 1997, Floeter-Winter, e cols., 1997). A partir dessa observação foi sugerida a utilização desse teste como indicador de especiação (Floeter-Winter e cols., 1997).

O promotor de *L. (L.) chagasi* foi descrito por Gay e cols. (1996). Esse promotor apresenta repetições de 64 bases e o seu sítio de início de transcrição encontra-se à 1200 bases à montante da região SSU. Ensaio de transfecção transiente de construções com esse promotor dirigindo um gene repórter mostraram um reconhecimento ainda melhor por parte de organismos heterólogos, mas os autores não discutem um possível significado para o incremento.

O promotor de *L. (L.) amazonensis* foi descrito por Uliana e cols. (1996) e a região compreendida entre os nucleotídeos -42 e +216 se

mostrou suficiente para que a transcrição ocorresse. Segundo o estudo, a região promotora vai até o nucleotídeo –190. Repetições de 60 bases encontram-se à montante da região promotora e sua atividade estimuladora apenas foi evidenciada quando a construção continha um pequeno número de repetições. As construções contendo um maior número de blocos de repetição apresentaram uma baixa atividade do promotor (Uliana e cols., 1996; Stempliuk e Floeter-Winter, 2002). Como hipótese os autores discutem a redução como uma possível competição dos fatores de transcrição que se ligam às repetições para que elas funcionem como estimuladores. Essa competição pode levar a uma menor transcrição quando aquelas seqüências estão muito representadas na construção.

Quando construções contendo CAT dirigido pelo promotor de *L. (L.) amazonensis* foram transfectadas em diferentes gêneros de tripanosomatídeos, não houve por parte desses o reconhecimento do promotor (Uliana e cols., 1996). Já em 2002, Stempliuk e Floeter-Winter demonstraram, por ensaios de transfecção transiente, que o promotor de *L. (L.) amazonensis* era reconhecido de forma diferencial pelos organismos do mesmo subgênero de *Leishmania* sendo que algumas espécies o reconheceram com melhor eficiência quando comparadas à espécie homóloga. Porém, esse promotor não era reconhecido quando a construção era transfectada em organismos do outro subgênero: *L. (Viannia)*. No mesmo estudo foram realizados ensaios com construções

contendo as diferentes regiões do promotor, possibilitando a apresentação de um mapa funcional. Esse mapeamento demonstrou que a presença da região à montante do core (upstream region) inibia completamente a expressão do gene repórter. Quando essa região não estava presente na construção, a expressão apresentava um nível basal. Esses dados demonstram que a região central é necessária e suficiente para a transcrição. Essas construções também mostraram que espécies heterólogas apresentam um reconhecimento diferencial da região, sendo a expressão maior que a espécie homóloga. Assim o estudo propõe também que essa região central seja responsável pela espécie-especificidade dos fatores.

Orlando e cols. (2002) comprovaram, em estudos envolvendo *Leishmania* de lagartos, que a espécie-seletividade pode servir de marcador filogenético, propondo que a espécie ancestral reconhece o promotor da espécie derivada, mas essa não é capaz de reconhecer a região da espécie ancestral, devido a uma co-evolução da maquinaria de transcrição.

5. Utilização de construções contendo genes repórteres para medir a eficácia de uma região promotora na expressão gênica.

Genes repórteres tem se tornado ferramentas valiosas no estudo da regulação da expressão gênica. A proposta dos ensaios envolvendo

genes repórteres é medir o potencial regulatório de uma seqüência de DNA desconhecida, isto é, determinar pela expressão de um repórter se uma seqüência é ou não um promotor e pela quantificação do repórter determinar a força e especificidade do promotor. Isto pode ser feito construindo-se uma molécula na qual a seqüência promotora está ligada a um gene repórter e esse é facilmente detectável quando expresso, por exemplo, pela emissão de fluorescência ou luminescência como GFP (proteína verde fluorescente) ou luciferase; ou pelo ensaio enzimático do extrato celular, obtido do material biológico (organismo, órgão, tecido, ou cultura de célula) que foi transformado com a construção, como a β -galactosidase, ou a cloranfenicol acetil transferase (CAT), medindo-se a quantidade do produto formado.

Proteínas como a β -galactosidase de *E.coli* são bastante utilizadas para monitorar a expressão gênica em ensaios de transfecção transiente e transfecção estável, ou para rastrear a localização de fusão de proteínas manipuladas geneticamente (Eckert. e Mühlischlegel, 2008).

Em 1994, Chalfie e cols. estabeleceram as condições para a utilização da proteína verde fluorescente (GFP – Green fluorescent protein) de *Aequorea victoria* como um marcador eficiente em organismos eucariotos. Anteriormente, havia sido descrito que a emissão luminosa é produzida pelo organismo aquático quando cálcio se liga à proteína aequorina. (Shimomura, e cols., 1962). Esse estudo proporcionou aos autores o Prêmio Nobel de Química em 2008.

A proteína GFP purificada possui 238 aminoácidos, absorve luz azul (máximo de 395 nm com um pico menor em 470 nm) e emite luz verde (pico de emissão em 509 nm com uma saliência em 540 nm). Essa fluorescência é bastante estável e virtualmente não foi observado um foto-descoloramento (Chalfie e cols., 1994);(Figura 2).

Figura 2: Espectro de emissão e excitação de GFP gerado em *E.coli* (linha sólida) e GFP purificado de *A.victoria* (linha tracejada) (Gráfico copiado de Chalfie. e cols. 1994).

A GFP pode ser facilmente utilizada como monitor de expressão em diversos compartimentos celulares. Ela também é compatível com outros marcadores de fluorescência e não requer outros co-fatores ou modificações espécie-específicas para fluorescer (Chalfie e cols., 1994).

Recentemente, Eckert e Mühlischlegel, 2008 publicaram uma revisão sobre a expressão gênica de *Candida albicans*, na qual apresentam uma visão geral sobre as técnicas atuais para investigar mecanismos de regulação de promotores nessa espécie. Os autores

também discutem o uso de genes repórteres utilizados no estudo da expressão gênica. Reproduzimos na tabela I a reunião de genes repórteres utilizados, bem como suas aplicações.

Tabela I: Tabela de genes repórteres

Reporter	Application	Main reference
<i>lacZ</i>	<i>In vitro</i> measurement. <i>lacZ</i> expression can be assessed macroscopically	Uhl & Johnson (2001)
<i>LAC4</i>		Leuker et al. (1992)
Luciferase (Firefly)	<i>In vitro</i> measurement of gene expression	Srikantha et al. (1995)
Luciferase (Renilla)		Srikantha et al. (1997)
<i>GFP</i>	<i>In vivo</i> localization of proteins. Quantification of transcript by hybridization and of protein via antibodies	Cormack et al. (1997), Morschhäuser et al. (1998)
<i>URA3</i>	Positive and negative selection possible	Myers et al. (1995)
<i>XOG1</i>	Expression can be assessed macroscopically	González et al. (1997)

Tabela copiada de Eckert. e Mühlischlege, 2008

Os autores sugerem que determinados genes podem ser utilizados dependendo da proposta de estudo. Como exemplo, citam que *lacZ* e luciferase podem ser utilizados para quantificar a expressão do promotor dependente de condições ambientais. E citam também que a fusão da ORF de GFP incapacita a localização e observação *in vitro*, naquele modelo biológico.

No entanto, a localização e expressão diferencial de genes ligados à GFP permitiram um mapeamento preciso do desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* (Coulson, e cols., 1986).

Em tripanosomatídeos, para o estudo dos promotores de RNA polimerase I, diversos autores utilizaram diferentes genes repórteres.

Com o intuito de estudar o promotor de rDNA, Gay e cols., 1996 transfectaram diferentes espécies de *Leishmania* com uma construção contendo a região promotora de *L. (L.) chagasi* e um fragmento sinalizador de adição de “splice leader” originado do gene gp63 à montante do gene da luciferase.

Já em 2001, Martinez-Calvillo e cols. estudaram a expressão gênica do promotor de *L. (L.) major* transfectando uma construção contendo a região promotora de *L. (L.) major* e a fusão do gene de resistência a fleomicina com luciferase, flanqueados pelas regiões 5' e 3' UTR (untranslated region) do gene DHFR-TS (dihidrofolato redutase – timidilato sintetase).

O gene que codifica CAT foi utilizado como repórter em 1989 por Laban e Wirth no estudo de transfecção transiente de *L. (L.) enrietti*. A expressão de CAT apresentou-se dependente da presença de sequência do gene de α -tubulina.

Em 1995, Tyler-Cross e cols. construíram plasmídeos contendo a região promotora de *T. cruzi* e o repórter CAT para verificar a atividade do promotor em culturas de epimastigota. Essas construções se mostraram

funcionais em apenas alguns isolados de *T.cruzi* e eram inativas em outras espécies de tripanosomatídeos, demonstrando que o promotor de rRNA de *T. cruzi* tem reconhecimento espécie-seletivo.

Nosso laboratório também caracterizou a atividade do promotor de *L. (L.) amazonensis* (Uliana e cols., 1996). Para isso foram feitas diversas construções contendo a região promotora dirigindo o gene de CAT. A expressão pode ser detectada inclusive quando a construção utilizada não continha a sequência aceptora de “*trans-splicing*”.

Em 1996, Ha e colaboradores exploraram a eficiência da expressão de GFP nas formas promastigotas de *Leishmania* e também a aplicação potencial em FACS (Fluorescence-activated cell sorter) e localização protéica. Os autores sugerem algumas aplicações como monitorar o número de formas amastigotas de *Leishmania* expressando GFP durante a infecção em macrófagos ou em animais. A análise em FACS poderia ser útil no enriquecimento de células expressando GFP em “pools” de parasitas transfectados, sob condições em que apenas algumas expressem a marca, devido expressão diferenciada ou localização celular.

Interessados em desenvolver metodologias mais sensíveis e efetivas no estudo do genoma de *Leishmania*, Boucher e cols. (2002), desenharam construções expressando GFP para selecionar eventos gênicos em FACS. O grupo avaliou o potencial de utilização de GFP na expressão gênica com a presença ou ausência de um promotor forte de

RNA pol I como ferramenta para selecionar eventos gênicos de *Leishmania* em FACS. As células resistentes ao antibiótico neomicina foram selecionadas submetidas à análise em FACS.

De forma a melhorar a eficiência de transfecções transientes em *Leishmania*, Robinson e Beverley (2003) executaram diversos experimentos. DNA de um plasmídeo contendo o promotor de *L. (L.) donovani* dirigindo o gene GFP (pXG-P_{LmrRNA}-GFP+) foi utilizado em transfecção de *L. (L.) major* em diversas condições experimentais de eletroporação. Os autores relatam ter conseguido obter fluorescência de GFP detectável, tanto em microscopia de fluorescência como em FACS, após 7h de transfecção, sendo a melhor condição descrita pelos autores como sendo 1200-1400V e 25 µF, em cubetas de 4 mm. Eles também testaram diferentes tampões, que, porém funcionaram de forma equivalente.

Conclusões

✓ A caracterização da região IGS/ETS do gene de rDNA região ETS de *Leishmania (Viannia) braziliensis* possibilitou mapear o sítio de início de transcrição e assim definir a provável região promotora de RNA pol I desse organismo.

✓ O sítio +1 se localiza aproximadamente em posição semelhante em relação ao início da seqüência da região SSU daqueles mapeados para outras espécies de *Leishmania*.

✓ A região ETS é bastante similar tanto em tamanho como em composição de seqüência às espécies do subgênero *L. (Leishmania)*.

✓ A região IGS, no entanto tem composição de seqüência muito variável, entre as espécies analisadas, demonstrando sua neutralidade evolutiva.

✓ Em *L. (V.) braziliensis*, encontram-se blocos de repetição aproximadamente à mesma distância do sítio +1, daqueles observados em outras espécies, com tamanho similar, mas com composição de seqüência distinta. Não foi possível determinar o número de blocos presentes em cada cístron.

✓ A estrutura geral da região, obtida por essa comparação, indica que a funcionalidade do promotor está mais relacionada a uma organização estrutural, independente de composição de seqüência.

✓ A ligação de fatores nucleares à região correspondente ao core do promotor de *L. (V.) braziliensis* apresentou um reconhecimento diferencial entre as espécies estudadas. Os complexos protéicos associados apresentaram maior afinidade com a espécie heteróloga *L. (V.) guyanensis*,

✓ O gene de GFP não se mostrou adequado para utilização como repórter em ensaios de transfecção transiente, apesar de ser detectado quando a construção possui uma marca de seleção. Assim, não foi possível medir o reconhecimento homólogo ou cruzado da região promotora de *L.(V.) braziliensis*.

Referências Bibliográficas

(<http://www.who.int/emc/disease/leish/index.html>) acessado 17 de setembro de 2006.

Boucher, N., F. McNicoll, et al. (2002). "RNA polymerase I-mediated transcription of a reporter gene integrated into different loci of *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **119**(1): 153-8.

Boucher, N., Y. Wu, et al. (2002). "A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element." J Biol Chem **277**(22): 19511-20.

Brandão-Filho SP, Brito ME et al.(2003). Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. **97**(3):291-6.

Briones, M. R., K. Nelson, et al. (1992). "*Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene." Mol Biochem Parasitol **53**(1-2): 121-7.

Camargo, E. P. (1964). "Growth and Differentiation in *Trypanosoma* *Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **12**: 93-100.

Camargo, L.M.A. e Barcinski, M.A. (2003). "Leishmanioses, feridas bravas e kalazar". Ciência e Cultura, **1**:34-7.

Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-5.

Clos, J., D. Buttgereit, et al. (1986). "A purified transcription factor (TIF-IB) binds to essential sequences of the mouse rDNA promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(3): 604-8.

Coulson A, Sulston J, et al. (1986). Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 **83**(20):7821-7825.

Cross, M., R. Kieft, et al. (1999). "The modified base J is the target for a novel DNA-binding protein in kinetoplastid protozoans." Embo J **18**(22): 6573-81.

Culotta, V. C., J. K. Wilkinson, et al. (1987). "Mouse and frog violate the paradigm of species-specific transcription of ribosomal RNA genes." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7498-502.

Dietrich, P., M. B. Soares, et al. (1993). "The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences." Gene **125**(1): 103-7.

Eckert, S. E. and F. A. Muhlschlegel (2008). "Promoter regulation in *Candida albicans* and related species." FEMS Yeast Res.:1-14

Floeter-Winter, L. M., R. P. Souto, et al. (1997). "*Trypanosoma cruzi*: can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker for speciation?" Exp Parasitol **86**(3): 232-4.

Floeter-Winter, L.M.; Uliana, S.R.B. (1993). Molecular biology applied to parasitology: The ribosomal cistron as a tool in taxonomic and phylogenetic studies and as a model for gene expression analysis. Ciênc. Cult., 45(3):210-5

Gay, L. S., M. E. Wilson, et al. (1996). "The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*." Mol Biochem Parasitol **77**(2): 193-200.

Grondal, E. J., R. Evers, et al. (1990). "Identification and sequence analysis of the ribosomal DNA promoter region of *Crithidia fasciculata*." Nucleic Acids Res **18**(6): 1333-8.

Grummt, I. (1999). "Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **62**: 109-54.

Ha, D. S., J. K. Schwarz, et al. (1996). "Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **77**(1): 57-64.

Heix, J. and I. Grummt (1995). "Species specificity of transcription by RNA polymerase I." Curr Opin Genet Dev **5**(5): 652-6.

Jacob, S. T. (1995). "Regulation of ribosomal gene transcription." Biochem J **306** (Pt 3): 617-26.

Jacob, S. T. and A. K. Ghosh (1999). "Control of RNA polymerase I-directed transcription: recent trends." J Cell Biochem Suppl **32-33**: 41-50.

Jantzen, H. M., A. Admon, et al. (1990). "Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins." Nature **344**(6269): 830-6.

Laban, A. and D. F. Wirth (1989). "Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9119-23.

Lainson, R; Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: W. Peters; Killick-Kendrick, R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press Inc.;.v.1, p1-120

Lainson R e Shaw JJ. (1988) .New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. Microbiology and Microbial Infections 9^a ed Ed. Feg Cox. London.

Lainson R. (1997). "Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil". Revista Paraense de Medicina 1997; **11**(1): 29-40.

Learned, R. M., S. Cordes, et al. (1985). "Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I." Mol Cell Biol **5**(6): 1358-69.

LeBowitz, J. H. Coburn, C. M. Beverley, S. M.(1991). Simultaneous transient expression assays of the trypanosomatid parasite Leishmania using beta-galactosidase and beta-glucuronidase as reporter enzymes. Gene. **103**(1): 119-23

Lee, M.G; Atkinson, B.L.; Giannini, S.H. and Van Der Ploeg, L.H.T. (1988). "Structure and expression of the hsp family of Leishmania major". Nucleic Acids Res. 16: 9567 – 9585.

Marilley, M. and P. Pasero (1996). "Common DNA structural features exhibited by eukaryotic ribosomal gene promoters." Nucleic Acids Res **24**(12): 2204-11.

Marilley, M., C. A. Radebaugh, et al. (2002). "DNA structural variation affects complex formation and promoter melting in ribosomal RNA transcription." Mol Genet Genomics **267**(6): 781-91.

Martinez-Calvillo, S. and R. Hernandez (1994). "Trypanosoma cruzi ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter." Gene **142**(2): 243-7.

Martinez-Calvillo, S., S. M. Sunkin, et al. (2001). "Genomic organization and functional characterization of the Leishmania major Friedlin ribosomal RNA gene locus." Mol Biochem Parasitol **116**(2): 147-57.

Marzochi MCA. (1992). "Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares)". JBM ; 63 (5/6): 81-105.

Mayer, M. G. and L. M. Floeter-Winter (2005). "Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(5): 501-13.

Ministério da Saúde do Brasil. (1994) Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília.

Ministério da Saúde do Brasil. (2000) Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília.

Myler, P. J., L. Audleman, et al. (1999). "Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2902-6.

Nunes, L. R., M. R. de Carvalho, et al. (1997). "Trypanosoma cruzi strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters." Mol Biochem Parasitol **86**(2): 211-24.

Orlando, T. C., M. A. Rubio, et al. (2002). "Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting Leishmania: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting Leishmania in the subgenus Leishmania (Leishmania)." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(5): 695-701.

Orlando, T. C., M. G. Mayer, et al. (2007). "RNA polymerase I promoter and splice acceptor site recognition affect gene expression in non-pathogenic Leishmania species." Mem Inst Oswaldo Cruz **102**(7): 891-4.

Paraguassu-Chaves CA. (2001). Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental). Rondônia: Edufro.

Paule, M. R. and R. J. White (2000). "Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III." Nucleic Acids Res **28**(6): 1283-98.

Pessoa SM. (1982). Parasitologia Médica. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Pikaard, C. S. (1994). "Ribosomal gene promoter domains can function as artificial enhancers of RNA polymerase I transcription, supporting a promoter origin for natural enhancers in *Xenopus*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 464-8.

Rey, L. (2001). Parasitologia.pp: 227 – 237. Editora Guanabara Koogan. 3ª edição. Rio de Janeiro

Robinson, K. A. and S. M. Beverley (2003). "Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **128**(2): 217-28.

Rudenko, G., H. M. Chung, et al. (1991). "RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*." Embo J **10**(11): 3387-97.

Russell, J. and J. C. Zomerdijs (2005). "RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works." Trends Biochem Sci **30**(2): 87-96.

Santos RV, Coimbra JRCEA. (1994). Saúde e Povos Indígenas. Ed. FIOCRUZ. Rio de Janeiro.

Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." J Cell Comp Physiol **59**: 223-39

Silveira FT, Lainson R, et al. (1997). Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Editora CEJUP. Belém:

Sollner-Webb, B. and J. Tower (1986). "Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes." Annu Rev Biochem **55**: 801-30.

Stempliuk, V. e L. M. Floeter-Winter (2002). "Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in Leishmania." Int J Parasitol **32**(4): 437-47.

Tolezano, J. E., S. R. Uliana, et al. (2007). "The first records of Leishmania (Leishmania) amazonensis in dogs (Canis familiaris) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil." Vet Parasitol **149**(3-4): 280-4

Tyler-Cross, R. E., S. L. Short, et al. (1995). "Transient expression mediated by the Trypanosoma cruzi rRNA promoter." Mol Biochem Parasitol **72**(1-2): 23-31.

Uliana, S. R., W. Fischer, et al. (1996). "Structural and functional characterization of the Leishmania amazonensis ribosomal RNA promoter." Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 245-55.

White, T. C., G. Rudenko, et al. (1986). "Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs." Nucleic Acids Res **14**(23): 9471-89.

Yan, S., M. J. Lodes, et al. (1999). "Characterization of the Leishmania donovani ribosomal RNA promoter." Mol Biochem Parasitol **103**(2): 197-210.

Zomerdijs, J. C., R. Kieft, et al. (1991). "Alpha-amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene expression site and for the ribosomal RNA genes." Nucleic Acids Res **19**(19): 5153-8.