Maria Fernanda Laranjeira da Silva

Relação entre a localização celular da enzima arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel na infecção de macrófagos murinos

The relationship between the cellular location of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* arginase and its role during murine macrophage infection

São Paulo

2010

Maria Fernanda Laranjeira da Silva

Relação entre a localização celular da enzima

arginase de Leishmania (Leishmania) amazonensis

e seu papel na infecção de macrófagos murinos

The relationship between the cellular location of Leishmania

(Leishmania) amazonensis arginase and its role during murine

macrophage infection

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Fisiologia Geral. Orientadora: Lucile Maria Floeter-

Winter

São Paulo

2010

da Silva, Maria Fernanda Laranjeira
Relação entre a localização celular da enzima arginase de <i>Leishmania</i> (Leishmania) amazonensis e seu papel na infecção de macrófagos murinos.
Número de páginas: 158
Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.
1. arginase 2. glicossomo 3. infecção
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)

Ao Felipe, por quase uma década ao meu lado, nos momentos difíceis, e me proporcionando tantos momentos felizes, como amigo, namorado, marido, cúmplice. Aos meus pais, pelo dedicação total, pelo apoio incondicional e por tudo que me ensinaram, essa conquista é nossa. À Pérola, por ser maravilhosa e me fazer tão bem.

Agradecimentos

Agradeço especialmente à Profa. Dra. Lucile Maria Floeter Winter, por ter me ensinado tanto como minha orientadora, por sempre compartilhar seu conhecimento, por estar sempre disposta a discutir resultados nem sempre claros, por me ajudar a entender a contribuição do meu trabalho e por muito mais.

Ao Prof. Dr. Stephen Beverley, pela grande oportunidade de trabalhar em seu laboratório em St Louis, proporcionando um período de muito aprendizado, e por compartilhar seu brilhantismo em discussões científicas tão enriquecedoras.

Aos diversos professores do departamento de Fisiologia do IB e do departamento de Parasitologia do ICB, que sempre mantiveram as portas de seus laboratórios abertas, e pelos inúmeros empréstimos. Em particular, ao Prof. Carlos Winter, pela ajuda extra em vários experimentos com proteínas no início deste trabalho.

Aos diversos professores da USP, que contribuiram para minha formação, tanto na graduação como na pós-graduação.

As Profas. Dras. Regina Pekelmann Markus, Nancy Amaral Rebouças e Maria Carolina Quartim Barbosa Elias pelas discussões e críticas no exame de qualificação.

Ao Ricardo, pela ajuda em muitos experimentos, principalmente nas inúmeras infecções e purificações de amastigotas, pelas interessantes discussões científicas, pela colaboração e auxílio geral no laboratório, pela grande amizade que rendeu tantas risadas e momentos de descontração, pela ajuda em manter, ou não, a sanidade mental, por descobrir minhas múltiplas personalidades e aguentá-las, e por mais infinitas coisas.

Ao Marcos, pela revisão da minha tese, pelas inúmeras discussões científicas que tiveram uma contribuição inquestionável na minha formação, pela colaboração diária no laboratório, além dos trabalhos que desenvolvemos juntos, também pela grande amizade que rendeu tantas risadas e momentos de descontração, pelo apoio e tolerância nos momentos difíceis, e por tudo mais.

À Camila, pelos experimentos de atividade de arginase, pela ajuda quando eu estava atolada com tantos experimentos, e pela amizade.

Aos colegas do laboratório Morcego, inclusive aos que já não estão mais no laboratório, principalmente ao Tiago e ao Ariel por me ensinarem tanto, e pela amizade, à Isabel pela ajuda com a arginase e tudo mais, e à Lisvane pela amizade, descontração e colaboração.

Aos funcionários do ICB e do IB, pelo auxílio geral.

Ao Prof. Dr. Marcos Gazarini, e ao Dr. Eduardo Koji Tamura, pelo auxílio na utilização do microscópio confocal.

Ao Prof. Dr. Renato Mortara, pela colaboração fundamental nos experimentos de imunofluorescência confocal.

Ao Prof. Dr. Edson Roberto da Silva, pelo auxílio nos experimentos de purificação de arginase e atividade enzimática, e pelas colaborações.

Ao Prof. Dr. Otávio Thiemann, pela colaboração em seu laboratório no Instituto de Física da USP de São Carlos

À Prof. Dulce Helena Ferreira de Souza, aos colegas do laboratório do Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural da USP de São Carlos, em especial à Maria Amélia Villela Oliva, pelo auxílio nos experimentos de purificação de arginase.

À Luciana Madeira, pelo auxílio geral em St Louis, pelas discussões científicas que foram muito importantes na minha formação científica, pela maravilhosa companhia quando estava tão longe de casa, por momentos de descontração me mostrando uma cidade tão legal, e pela amizade.

À Luciana Penha, pela apoio inquestionável durante o período que estava em St Louis, também pela grande companhia quando estava longe de casa, por disponibilizar sua cozinha para minhas peripécias gastronômicas, e claro pela amizade.

Aos colegas do laboratório do Prof. PhD Stephen Beverley, pela receptividade e coleguismo durante minha estadia em St Louis.

Aos animais utilizados neste trabalho, em especial à Shirley.

Ao meu marido Felipe, por tantas coisas, mas principalmente pelo companheirismo, amizade, amor, apoio, tolerância e muito mais.

Aos meus pais, por toda a dedicação, pelo apoio incondicional, por todo amor e por muito mais.

À minha família, pelo apoio e admiração que me motiva tanto, e claro pelo amor.

À Pérola, por me fazer tão bem.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho e que por alguma falha minha não foram citados.

À Fapesp e à CNPq, pelo financiamento.

Abreviaturas

BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
DAF-FM	4-amina-5-metilamina-2´7´-difluorosceina diacetato
DAPI	4',6-diamidino-2-phenilindol
DFMO	D,L-α-difluorometilornitina
DHFR	di-hidrofolato redutase
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAg	DNA genômico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DOn	densidade ótica no comprimento de onda n
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGFP	GFP melhorada
FK506	Tacrolimus
G6PD	glicose 6 fosfato desidrogenase
GFP	proteína fluorescente verde
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
HPGP	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
IFN-γ	interferon gama
lgG	imunoglobulina do isotipo G
IL-4/10	interleucina tipo 4 ou 10
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactosídeo
IR	região intergência
ITS	inibidor de tripsina extraído de soja
MOPS	3-(N-morfolino)ácido propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NMWL	peso molecular nominal limite
NO	óxido nítrico
ODC	ornitina descarboxilase
ORF	fase aberta de leitura
PBS	tampão fosfato salina

PCR	reação em cadeia da polimerase
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonila
PSS II	fosfatidilserina sintetase II
RT-PCR	reação de transcrição reversa
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
rRNA	RNA ribossômico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Shld1	derivado do composto SLF* com o grupo carboxila substituído
	por um grupo morfoline
SLF*	ligante sintético da proteína FKBP
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade
UTR	região de mRNA não traduzida
UV	ultravioleta
V	volume
V/V	relação volume para volume
W/V	relação massa para volume
YFP	proteína fluorescente amarela

Lista de símbolos de unidades de medida

°C	grau Celsius
F	Faraday
g	grama
g/L	grama por litro
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
L	litro
m	metro
М	molar
min	minuto
pb	par de base
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto
V	Volt
x g	unidade correspondente à aceleração normal da gravidade

Lista de aminoácidos

A	alanina
I	isoleucina
Н	histidina
К	lisina
L	leucina
Q	glutamina
R	arginina
S	serina
V	valina

Índice

1. Introdução	01
1.1. O gênero <i>Leishmania</i> e as leishmanioses	01
1.2. O ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	03
1.3. Diagnóstico e tratamento das leishmanioses	05
1.4. Metabolismo de L-arginina em <i>Leishmania</i>	07
1.5. A invasão do macrófago pela <i>Leishmania</i> e a resp	osta imune
de mamíferos	10
1.6. Glicossomos	12
1.7. Manipulação genética para o estudo de genes em	l
tripanossomatídeos	15
2. Objetivos	18
2.1. Objetivos específicos	18
3. Material e Métodos	19
3.1. Organismos e Células	19
3.2. Cultivo de células	19
3.2.1. Cultivo de <i>Leishmania</i>	19
3.2.2. Cultivo de bactérias	19
3.2.3. Cultivo de macrófagos J774A 1	20
3.2.4. Contagem de células	20
3.3. Ensaios Protéicos	20
3.3.1. Preparação de extrato protéico total de	
<i>E. coli</i> [BL21(DE3)pLysS]	20
3.3.2. Eletroforese de proteínas – SDS-PAGE	21
3.3.3. Quantificação de proteínas	21
3.3.4. Purificação da arginase recombinante de	
L. (L.) amazonensis	21
3.3.5. Preparação de extrato protéico total de	
L. (L.) amazonensis	22
3.3.6. Ensaio de atividade de arginase <i>in vitro</i>	23

3.3.7.	Produção de anticorpos	_24
3.3.8.	Western blot	_24
3.3.9.	Imunolocalização de arginase em promastigotas de	
L. (L.,) amazonensis	_25
3.4. Ensaios	com ácidos nucléicos	_26
3.4.1.	Extração de ácidos nucléicos	_26
	3.4.1.1. Extração de DNA genômico de promastigota	as
	de Leishmania	_26
	3.4.1.2. Mini Extração de DNA de promastigotas	
	de Leishmania	_26
	3.4.1.3. Extração de RNA total de promastigotas	
	de Leishmania	_27
	3.4.1.4. Extração de DNA de plasmídeo de	
	bactérias	_27
3.4.2.	Clivagem de DNA com endonucleases	_28
3.4.3.	Transcrição reversa com oligo dT	_28
3.4.4.	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	_28
	3.4.4.1. Oligonucleotídeos	_28
	3.4.4.2. PCR convencional	_30
	3.4.4.3. Reação em cadeia da polimerase em	
	tempo real	_30
3.4.5.	Eletroforese de DNA	_31
3.4.6.	Eluição	_32
3.4.7.	Clonagem de fragmentos de DNA	_32
	3.4.7.1. Vetores	_32
	3.4.7.2. Ligação de fragmentos de DNA	_33
	3.4.7.3. Preparação de bactérias competentes	
	e transformação	_33
3.4.8.	Determinação da seqüência de nucleotídeos	
de DI	NA	_33
3.5. Transfe	cção de <i>Leishmania</i>	_34
3.6. Infecçõe	es	34

3.6.1. Infecção de camundongos com	
L. (L.) amazonensis	_34
3.6.2. Obtenção de macrófagos murinos de peritôneo	_35
3.6.3. Infecção <i>in vitro</i> de macrófago peritoneal ou	
J774 com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	_35
3.6.4. Purificação de amastigotas de patas de	
camundongos infectados com promastigotas	_35
3.6.5. Infecção de camundongos com amastigotas	
purificados de L. (L.) amazonensis	_36
3.7. Imunolocalização em macrófagos infectados com	
L. (L.) amazonensis	_36
3.8. Microscopia eletrônica	_37
3.9. Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)	
intracelular por microscopia confocal	_37
3.10. Ligantes ddFKBP	_38
3.11. Citometria de Fluxo	_38
4. Resultados	_39
4.1. Caracterização da arginase de <i>L. (L.) amazonensis</i> usando	
soro policional anti-arginase	_39
4.1.1. Expressão e purificação da arginase de	
L. (L.) amazonensis	_39
4.1.2. Produção de soro policlonal anti-arginase de	
<i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos BALB/c e coelho	_41
4.1.3. Estudos banda dupla observada no ensaio de	
"Western blot" com soro anti-arginase e extrato de	
L. (L.) amazonensis	_41
4.1.4. Imunolocalização de arginase em promastigotas de	
L. (L.) amazonensis	_44
4.1.5. Imunolocalização de arginase em amastigotas de	
L. (L.) amazonensis durante a infecção in vitro de	
macrófagos J774	_47
4.2. Construção de mutantes para análise funcional de arginase	_52

4.2.1. Superexpressores de arginase	52
4.2.1.1. Obtenção dos mutantes	52
4.2.1.2. Análise funcional dos mutantes	
superexpressores de arginase – transcrição,	
tradução e atividade enzimática	54
4.2.1.3. Imunolocalização de arginase nos	
mutantes superexpressores	58
4.2.1.4. Secreção de arginase pelos	
parasitas superexpressores	58
4.2.1.5. Análise funcional dos mutantes	
superexpressores – curva de crescimento e	
infectividade	59
4.2.1.6. Produção de NO pelos	
parasitas superexpressores	63
4.2.2. Nocaute funcional regulável de arginase em	
L. (L.) amazonensis	65
4.2.2.1. Obtenção de mutantes com um alelo de	
arginase nocauteado	65
4.2.2.2. Análise dos mutantes com um dos	
alelos de arginase nocauteado – integração	
do cassete de resistência	67
4.2.2.3. Análise funcional dos mutantes com um	
dos alelos de arginase nocauteado – tradução e	
atividade enzimática de arginase	69
4.2.2.4. "Knock-in" do cassete ddFKBP-ARG	
nos parasitas <i>L. (L.) amazonensis</i> com um	
alelo da arginase nocauteado	70
4.2.2.5. Análise de <i>L. (L.) amazonensis</i> nocaute	
funcional regulável de arginase – integração	
cassete de resistência	74
4.2.2.6. Análise funcional de L. (L.) amazonensis	
nocaute funcional regulável de arginase	_77

	4.2.2.7. Teste de funcionalidade da construção	
	ddFKBP-ARG obtida em L. (L.) major nocaute de	
	arginase (ARG-/-)	78
	4.2.2.8. Teste de funcionalidade do domínio	
	de degradação ddFKBP em <i>L. (L.) amazonensis</i>	81
4.2	.3. Nocaute nulo de arginase em L. (L.) amazonensis_	82
	4.2.3.1. Análise funcional dos parasitas	
	L. (L.) amazonensis com os dois alelos de	
	arginase nocauteados	82
5. Discussão <u></u>		88
5.1. Soros	anti-arginase de L. (L.) amazonensis	89
5.2. Super	rexpressão de arginase em <i>L. (L.) amazonensis</i>	93
5.3. Nocai	ute funcional regulável de arginase em	
L. (L.) ama	azonensis utilizando o sistema ddFKBP	99
5.4. Nocai	ute nulo de arginase em L. (L.) amazonensis	101
6. Conclusões		105
Resumo		108
Abstract		110
Bibliografia		112
Anexos		122

Índice de Tabelas

Tabela I – Condições de PCR por par de oligonucleotídeos utilizados	_31
Tabela II – Resultados da quantificação por transcrição reversa	
seguida por PCR em tempo real do número de cópias de mRNA	
de arginase e G6PD	_56
Tabela III – Resultados da quantificação por transcrição reversa	
seguida por PCR em tempo real do número de cópias de mRNA	
de META-1 e G6PD	_61

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da ultra-estrutura das	
formas amastigota (A) e promastigota (B) de uma <i>Leishmania</i>	04
Figura 2 – Esquema da metabolização de L-arginina pelas vias	
enzimáticas de arginase e iNOS	10
Figura 3 – Esquema dos possíveis efeitos regulatórios no	
metabolismo de L-arginina em macrófagos	13
Figura 4 – Fracionamento por SDS-PAGE 10% das frações da	
primeira etapa de purificação de arginase recombinante,	
em coluna de níquel	40
Figura 5 – Fracionamento por SDS-PAGE 10% das frações da	
segunda etapa de purificação de arginase recombinante,	
em coluna de DEAE-Sepharose	40
Figura 6 – "Western blot" com soro policlonal anti-arginase de	
camundongo	41
Figura 7 – "Western blot" com soro policlonal anti-arginase de	
coelho	42
Figura 8 – "Western blot" com uréia	43
Figura 9 – "Western blot" com EDTA e/ou MnSO4	43
Figura 10 – "Western blot" com arginase recombinante de	
L. (L.) amazonensis purificada e dialisada	44
Figura 11 – Imunofluorescência confocal de promastigotas de	
L. (L.) amazonensis imunomarcadas com soro	
anti-arginase de camundongo	45
Figura 12 – Imagens de fluorescência em microscópio confocal de	
promastigotas de L. (L.) amazonensis expressando EGFP sem	
e com sinal de endereçamento para glicossomo SKL	46
Figura 13 – Imagens de microscopia confocal de promastigotas de	
L. (L.) amazonensis expressando EGFP glicossomal submetidas	
a ensaios de imunomarcação com soro policlonal de	
camundongo anti-arginase de L. (L.) amazonensis	47

Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão	
de promastigotas de L. (L.) amazonensis imunomarcadas com	
soro policlonal de coelho anti-arginase	_48
Figura 15 – Imagem de imunofluorescência confocal de macrófagos	
J774 não infectados	_49
Figura 16 – Imagens de imunofluorescência confocal de macrófagos	
J774 infectados ou não com <i>L. (L.) amazonensis</i>	_50
Figura 17 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de	
macrófagos J774 infectados com L. (L.) amazonensis submetidos	
à imunomarcação com soro policlonal de coelho anti-arginase	_51
Figura 18 – Esquema do vetor pXG usado como base na	
construção dos vetores para a superexpressão de arginase	_53
Figura 19 – Alinhamento de trechos do seqüenciamento de DNA	
dos parasitas superexpressores, incluindo as seqüências preditas para	
essas construções e a fase aberta de leitura da arginase com e sem o	
sinal de endereçamento SKL	_53
Figura 20 – PCR em tempo real das culturas superexpressoras de	
arginase com e sem sinal de endereçamento para glicossomo	_55
Figura 21 – "Western blot" superexpressores	_56
Figura 22 – Gráfico comparativo da atividade enzimática de	
arginase dos superexpressores	_57
Figura 23 – Imagens de imunofluorescência confocal dos mutantes	
superexpressores	_58
Figura 24 – Curvas de crescimento dos superexpressores	59
Figura 25 – Evolução da infecção de camundongos BALB/c com os	
parasitas superexpressores	_60
Figura 26 – Evolução da infecção de camundongos BALB/c com os	
parasitas superexpressores, normalizada pela proporção de	
metacíclicos inoculados	_63
Figura 27 – Evolução da infecção de camundongos BALB/c com	
formas amastigotas dos parasitas superexpressores	_64

Figura 28 – Imagens de microscopia confocal de formas promastigotas,	
em fase estacionária, dos parasitas superexpressores submetidos à	
marcação com DAF-FM	_65
Figura 29 – Esquema da estratégia utilizada para obtenção da	
construção 5'AHyg3'A em pUC19	_66
Figura 30 – PCRs para verificar o nocaute de um dos alelos de	
arginase	_68
Figura 31 – Gráfico representando o número de cópias de	
arginase normalizado pelo número de cópias de PSSII	_69
Figura 32 – "Western blot" parasitas heterozigotos, com um alelo	
de arginase nocauteado	_70
Figura 33 – Atividade enzimática de arginase nos parasitas	
heterozigotos, com um alelo da arginase nocauteado	_71
Figura 34 – Esquema do plasmídeo B6323	_72
Figura 35 – Esquema da estratégia utilizada para obtenção da	
construção p5APhleodd3A	_73
Figura 36 - PCRs para verificar integração do cassete contendo o	
segmento ddFKBP-ARG em um dos alelos de arginase	_74
Figura 37 – Digestões para verificar a presença do alelo selvagem do	
gene da arginase nos parasitas ARG-/kiddARG	_76
Figura 38 - PCRs para verificar integração do cassete contendo o	
segmento ddFKBP-ARG em um dos alelos da arginase	_77
Figura 39 – "Western blot" parasitas ARG-/kiddARG	_78
Figura 40 – Esquema do plasmídeo B6182	_79
Figura 41 – PCR para verificar a transfecção do epissomo	
contendo o segmento ddFKBP-ARG nos parasitas L. (L.) major ARG-/	_79
Figura 42 – Curvas de crescimento cultura de L. (L.) major ARG -/-	
transfectada com epissomo contendo o segmento ddFKBP-ARG	_80
Figura 43 – PCR para verificar a transfecção do vetor contendo o	
segmento ddFKBP-YFP nos parasitas L. (L.) amazonensis	_81
Figura 44 – Citometria de fluxo de parasitas transfectados com	
ddFKBP-YFP	_82
Figura 45 – PCRs para verificar nocaute do segundo alelo de arginase_	_84

Figura 46 – "Western blot' parasitas nocautes nulo de arginase	85
Figura 47 – Atividade de arginase dos parasitas nocautes nulos de	
arginase	_86
Figura 48 – Evolução da infecção <i>in vivo</i> dos parasitas nocautes nulos	
de arginase	_86
Figura 49 – Infectividade <i>in vitro</i> dos parasitas nocautes nulo de	
arginase	87

1. Introdução

1.1. O gênero Leishmania e as leishmanioses

Representações de lesões de pele e deformidades faciais encontradas em peças arqueológicas pré-Inca no Equador e no Peru, datadas do começo do século 1 d.C., já evidenciavam a ocorrência das formas cutânea e mucocutânea das leishmanioses no chamado Novo Mundo. Textos do período Inca dos séculos 15 e 16, e depois durante a colonização espanhola, mencionam úlceras de pele apresentadas pelos agricultores sazonais quando retornavam da região dos Andes. Posteriormente, patologias que causavam a desfiguração do nariz e boca ficaram conhecidas como "lepra branca", graças à similaridade com as lesões causadas por micobactéria. No Oriente, médicos indianos aplicaram o termo kala azar, que significa "febre negra", a doença definida posteriormente como leishmaniose visceral (WHO).

Mas, uma das primeiras e mais importantes descrições clínicas de leishmaniose cutânea foi feita somente em 1756, por Alexander Russel, em um paciente turco. Em 1901, Leishman identificou certos organismos, em esfregaços provenientes do baço de pacientes mortos pela febre conhecida como "Dum-dum", inicialmente considerados tripanossomos, mas em 1903 Donovan os descreveu como novos organismos, que posteriormente foram denominados *Leishmania donovani* por Ross (Ross 1903), estabelecendo a conexão entre esses organismos e a doença kala azar, e descrevendo pela primeira vez o gênero *Leishmania* (WHO).

No Brasil, em 1909, Lindenberg, e Carini juntamente com Paranhos, independentemente, demonstraram a presença dos parasitas do gênero *Leishmania* em lesões de paciente brasileiros. Gaspar Vianna deu-lhe o nome de *Leishmania braziliensis* e descobriu a ação curativa do tártaro emético em 1912 (Rey 1992).

Hoje, o gênero *Leishmania*, classificado na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, compreende mais de 30 espécies, das quais por volta de 20 causam doenças à espécie humana, patologias essas genericamente conhecidas como Leishmanioses. Em vista de essas doenças apresentarem manifestações clínicas e epidemiológicas tão diversas em cada área geográfica, dividiu-se a doença em cinco grupos principais (Ashford 2000), causadas por diferentes espécies:

- Leishmaniose cutânea: manifesta-se inicialmente como uma persistente picada de mosquito e, gradualmente, as lesões aumentam, formase então um granuloma no fundo da lesão envolvendo a migração de leucócitos que isolam a área infectada, freqüentemente levando à necrose do tecido. Essa forma da doença usualmente é causada por *Leishmania* (*Leishmania*) tropica, L. (L.) major, L. (L.) amazonensis, L. (Viannia) braziliensis entre outras;

- Leishmaniose mucocutênea: começa com uma lesão no local da picada do mosquito e então aparecem lesões metastáticas nas mucosas do nariz, boca e, eventualmente, faringe e laringe. A propagação dá-se provavelmente por via hematogênica, e as úlceras costumam progredir em extensão e profundidade, levando a perfuração do septo ou palato, e infiltração inflamatória das partes moles contíguas (Rey 1992). Essa forma é geralmente associada a *L. (V.) braziliensis*;

- Leishmaniose cutânea difusa: forma disseminada cutânea, leva ao surgimento de diversas lesões nodulares, espalhadas pelo corpo, e ocorre em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes que haviam sido tratados de calazar (Rey 1992). Geralmente é causada por *L. (L.) mexicana, L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) pifanoi*;

- Leishmaniose visceral ou calazar: geralmente inicia-se por uma lesão no local da picada, porém aqui os parasitas apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear alojando-se no baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides (Rey 1992), assim comprometem o funcionamento desses órgãos, freqüentemente levando ao óbito quando não tratada. Essa forma da doença é causada pela *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) donovani*;

- Leishmaniose pós-calazar: seqüela da leishmaniose calazar, pode aparecer em até dois anos após a cura dessa forma da doença, e se manifesta como feridas na pele.

A Organização Mundial da Saúde estima uma prevalência mundial de 12 milhões de casos de leishmaniose, com mortalidade anual de 60.000 pessoas, sendo que a população de risco é de aproximadamente 350 milhões de pessoas em 88 países do mundo. Além disso, apesar de somente serem declarados oficialmente 600.000 novos casos por ano, estima-se que esse número na realidade alcance 1,5 a 2 milhões de pessoas (WHO).

A leishmaniose representa mundialmente um grande problema de saúde pública, sendo a segunda infecção mais importante causada por protozoários, superada somente pela malária (WHO).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde reportam um aumento no número de novos casos de leishmaniose nos últimos anos. Em 1980, o número de casos registrados de leishmaniose cutânea foi 3.000, já em 1995 esse número chegou a 35.748 casos (Saúde. 2007). Além disso, observa-se uma expansão geográfica da leishmaniose cutânea no Brasil, evidenciada pelo aumento de municípios com casos registrados da doença. Em 1994, foram registrados casos em 1.861 municípios do país, em 4 anos houve uma expansão da doença para 2.055 municípios (Saúde 2000). Essa expansão provavelmente ocorre graças a modificações sócio-ambientais, como o desmatamento, que reduz a disponibilidade de animais para servir de fonte de alimentação para o mosquito transmissor, colocando-lhe o cão e o homem como alternativas mais acessíveis. Além desse, outro fator que favorece a expansão geográfica da doença é o processo migratório, que traz para a periferia das cidades populações humana e canina originárias de áreas rurais, onde a doença é endêmica (Saúde 2002).

1.2. O ciclo de vida da Leishmania

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas obrigatórios e caracterizam-se por apresentar apenas duas formas de vida durante seu ciclo de vida, a forma amastigota e a forma promastigota, associadas a dois tipos de hospedeiro. No hospedeiro vertebrado encontra-se a forma amastigota (Fig. 1), parasita intracelular obrigatório de macrófagos. Sua morfologia celular é arredondada ou ovóide, variando de tamanho entre 2 e 6 µm em extensão e 1,5 e 3 µm de largura, com um flagelo muito reduzido. Encontram-se nos vacúolos digestivos (ou fagolisossomos) dos macrófagos que

fagocitam os parasitas, onde se multiplicam por divisão binária, rompendo o macrófago e liberando novos amastigotas aptos a infectar outros macrófagos. Ao picar o indivíduo ou animal parasitado, o hospedeiro invertebrado, um inseto hematófago da família Psychodidae, suga junto com o sangue ou com a linfa macrófagos periféricos infectados com amastigotas de *Leishmania*. Uma vez no tubo digestivo do mosquito, essas formas são liberadas e se diferenciam em promastigotas (Fig. 1), formas delgadas com cerca de 1,5 μm de largura e 20 μm de comprimento, com um flagelo típico que emerge da extremidade anterior. Essas formas se multiplicam intensamente por divisão binária e colonizam o tubo digestório do inseto vetor. De acordo com a posição ocupada no inseto do vetor, foram descritos dois subgêneros: *Leishmania (Leishmania)*, para os parasitas que se aderem ao epitélio do intestino anterior, e *Leishmania (Viannia)*, para os parasitas que se aderem



Figura 1 – Representação esquemática da ultra-estrutura das formas amastigota (A) e promastigota (B) de uma *Leishmania*. N: núcleo. RE: retículo endoplasmático. M: mitocôndria. G: complexo de Golgi. K: kinetoplasto. F: flagelo. Figura modificada de (Rey 1992).

ao epitélio do intestino posterior. Quando atingem um grande número, diferenciam-se em formas metacíclicas infectivas, de rápido movimento, corpo pequeno e flagelo alongado que invadem as porções anteriores do estômago 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, os parasitas são fagocitados pelos macrófagos e se diferenciam em amastigotas, completando o ciclo de vida do parasitas e sua propagação (Rey 1992).

Os insetos vetores das leishmanioses são pequenos dípteros, de 2 a 3 mm de comprimento, e pertencem a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Somente 30 das 500 espécies conhecidas dessa subfamília foram identificadas como vetores da doença, sendo que dois gêneros são realmente importantes vetores, *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Rey 1992). São as fêmeas dessas espécies que se infectam com os parasitas, sugando sangue de mamíferos para obter os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos seus ovos, e assim transmitindo a doença (WHO 2010).

É importante ressaltar que o homem participa do ciclo de vida da *Leishmania* como um hospedeiro acidental, os hospedeiros vertebrados naturais desse protozoário são cães, gatos e alguns animais silvestres (roedores, preguiças, tamanduás, marsupiais, raposas, etc), que são considerados reservatórios desses organismos; por isso as leishmanioses são consideradas zoonoses, adquiridas eventualmente quando o homem penetra no ecossistema onde esses organismos circulam (Rey 1992).

1.3. Diagnóstico e tratamento das leishmanioses

Em pacientes procedentes de áreas endêmicas, ou que estiveram em contato com zonas leishmanióticas, tipicamente pode ser feito o diagnóstico clínico, mas esse deve ser confirmado com provas laboratoriais. O exame parasitológico pode ser realizado pela observação microscópica de biópsias, esfregaços de pele ou aspirados de tecidos corados. Outra opção é semear o material obtido de lesões em meios de cultura, o que chega a comprovar 60%

dos casos examinados. Em alguns casos, identifica-se a espécie mediante caracterização eletroforética de isoenzimas por comparação com material de referência (Rey 1992).

Outra possibilidade é o diagnóstico imunológico, feito através da intradermorreação de Montenegro, realizada com o antígeno preparado a partir de culturas. No entanto, a sensibilidade dessa técnica é de apenas 87% com especificidade de 57% (Faber, Oskam et al. 2003), apresentando reatividade cruzada com outras parasitoses, como doença de Chagas (Barrio, Mora et al. 2007).

Alternativas mais sensíveis, porém mais caras que as tradicionais, são os diagnósticos baseados em técnicas imunológicas (imunofluorescência e imunoperoxidase) ou de biologia molecular (hibridação de DNA e PCR) (Rey 1992). Estudos mostram que as técnicas com DNA podem ainda permitir a determinação da espécie de *Leishmania* presente na lesão, sem o risco de reação cruzada (Castilho, Shaw et al. 2003).

Com relação ao tratamento das leishmanioses, o mais recomendado é a utilização de antimoniais pentavalentes, devido à rápida eliminação renal e limitada acumulação desses compostos nos tecidos. Dentre os antimoniais, os mais utilizados são o Glucantime e o Pentostan, que interferem na glicólise e β-oxidação de ácidos graxos (Balana-Fouce, Reguera et al. 1998), e devem ser administrados por via intravenosa, levando a necessidade de internação do paciente. Outra opção é a utilização de pentaminidinas, com poder curativo inferior e maior toxicidade com relação aos antimoniais, e ainda podem-se utilizar alguns antibióticos na falência dos antimoniais e pentamidinas, como Anfotericina B e Rifampicina. No entanto, de maneira geral, a alta toxicidade de todas essas drogas e a resistência desenvolvida por algumas cepas de parasitas a esses produtos, exige a pesquisa sobre novos agentes terapêuticos (Rey 1992).

Um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias é a via de transporte e biossíntese de poliaminas desses parasitas, que parece ser essencial em *Leishmania* (Roberts, Tancer et al. 2004). Diferenças entre as vias metabólicas do parasita e do hospedeiro

6

podem ser consideradas alvos potenciais na interferência do processo proliferativo do parasita (Reguera, Tekwani et al. 2005).

Nesse sentido, foi desenvolvido um inibidor da ornitina descarboxilase (ODC), enzima que catalisa a conversão da ornitina para putrescina e representa o primeiro passo limitante na biossíntese de poliaminas, conhecido como DFMO (D,L- α -difluorometilornitina) (Pegg 1986). Esse inibidor se mostrou altamente eficaz contra a fase cerebral da doença do sono, causada por *Trypanosoma gambienense* (Van Nieuwenhove, Schechter et al. 1985), no entanto, se mostrou ineficaz no tratamento de outras parasitoses, como a doença de Chagas, leishmanioses e malária (Reguera, Tekwani et al. 2005).

1.4. Metabolismo de L-arginina em Leishmania

A L-arginina é um dos aminoácidos mais versáteis metabolicamente, servindo como precursor não só na síntese de proteínas, como também na síntese de óxido nítrico (NO), uréia, ornitina, citrulina, creatinina, agmatina, glutamato, prolina e poliaminas (Wu e Morris 1998).

Esse aminoácido foi primeiramente isolado de sementes de lupulus, em 1886 (Schulze e Steiger 1886), e em seguida foi identificado como um componente protéico em animais (Hedin 1895). Em 1897, Schulze e Winterstein estabeleceram a estrutura da L-arginina por hidrólise alcalina, que levou a liberação de ornitina e uréia, e sua síntese foi descrita em 1910, a partir de benzoilornitina, por Sorensen. Em 1904, Kossel e Dakin identificaram no fígado de animais a enzima que hidrolisa arginina em ornitina e uréia, denominada arginase, mas foi a descoberta do ciclo da uréia, por Krebs e Henseleit em 1932 (Krebs e Henseleit 1932), que levou à elucidação dos papéis proeminentes da arginina em importantes vias metabólicas e fisiológicas (Wu e Morris 1998).

Logo, uma das enzimas envolvidas no catabolismo de L-arginina é a arginase, uma metaloenzima que utiliza esse aminoácido como substrato para produzir L-ornitina e uréia, dependente de Mn²⁺ (Reczkowski e Ash 1992; da Silva, da Silva et al. 2008), e pode funcionar como enzima

7

regulatória modulando a disponibilidade de arginina nas células onde é expressa (Wu e Morris 1998). Um dos produtos dessa via, a L-ornitina, é precursor na síntese de poliaminas, logo essa enzima também parece pode participar na regulação da síntese de poliaminas (Wu e Morris 1998). Corroborando, foi observado que a atividade de arginase geralmente é coinduzida com a de ODC, e que células deficientes em arginase não proliferam em meio de cultura sem soro, se não for adicionado ornitina ou poliaminas a esse (Holtta e Pohjanpelto 1982).

Os mamíferos possuem dois genes de arginase que codificam duas distintas isoenzimas, tipo I e II, similares quanto às propriedades enzimáticas, porém diferentes com relação à localização subcelular, distribuição tecidual, regulação de expressão e reatividade imunológica (Grody, Dizikes et al. 1987; Jenkinson, Grody et al. 1996). A arginase tipo I, citosólica, é altamente expressa no fígado como componente do ciclo da uréia; já a arginase tipo II, mitocondrial, é expressa nos rins, cérebro, intestino delgado, glândulas mamárias e macrófagos (Wu e Morris 1998). Células endoteliais de aorta de rato e macrófagos murinos expressam ambos os tipos de arginase, e provavelmente outros tipos celulares também expressem as duas isoenzimas (Wu e Morris 1998).

Nos protozoários de vida aquática, o excesso de nitrogênio pode ser eliminado diretamente na forma de amônia. No entanto, os organismos da família Trypanosomatidae apresentam uma interessante organização quanto à atividade de enzimas do ciclo da uréia, ou ciclo de Krebs-Heiselet (Krebs e Henseleit 1932). Inclusive, a expressão específica de algumas enzimas desse ciclo pode ser utilizada na identificação de organismos da família (Camargo, Sbravate et al. 1992; Camargo 1999). A arginase é uma das enzimas integrante desse ciclo nos animais ureotélicos cuja atividade se encontra expressa em alguns tripanosomatídeos, entre eles *Leishmania*. Inicialmente seu papel funcional foi associado somente aos processos metabólicos envolvidos na interconversão arginina-ornitina-citrulina (Camargo 1979).

Por outro lado, em 1987, descobertas importantes mostraram que a arginina é também o aminoácido precursor na síntese de nitrito e nitrato em

mamíferos (Hibbs, Taintor et al. 1987), e paralelamente que o óxido nítrico (NO) é o fator de relaxamento derivado do endotélio (Palmer, Ferrige et al. 1987; Ignarro, Buga et al. 1987), descrito desde 1980 (Furchgott e Zawadzki 1980). Em seguida, o NO foi identificado como o intermediário ativo da via arginina-nitrito-nitrato em macrófagos (Hibbs, Taintor et al. 1988) (Marletta, Yoon et al. 1988) e células endoteliais (Palmer, Ashton et al. 1988). Atualmente, sabe-se que diversos tipos celulares utilizam a arginina na síntese de NO, que executa papéis importantes em diversos processos, como vasodilatação, resposta imune, neurotransmissão e adesão de plaquetas e leucócitos (Bredt e Snyder 1994; Moncada e Higgs 1995).

Em mamíferos, foram descritas 3 isoenzimas de óxido nítrico sintase (NOS), codificadas por diferentes genes: NOS neuronal (nNOS, tipo I), NOS induzida (iNOS, tipo II) e NOS endotelial (eNOS, tipo III). A maioria dos animais expressam a nNOS e a eNOS constitutivamente, em baixos níveis e em diversos tecidos, e essas isoenzimas são reguladas pelo complexo Ca²⁺/calmodulina; já a iNOS, normalmente não é expressa na maioria das células, mas é altamente induzida por endotoxinas e citocinas inflamatórias em macrófagos (Wu e Morris 1998), e o principal efeito do NO produzido por essa via é antiproliferativo (Boucher, Moali et al. 1999).

Com isso, a arginase pode ser essencial na regulação da atividade de iNOS de macrófagos modulando a concentração de L-arginina (Fig. 2), conforme observado em estudos mostrando que a indução de arginase II leva à diminuição da produção de NO (Wang, Jenkinson et al. 1995), comprometendo o papel de defesa do macrófago. Corroborando com essa hipótese, ao utilizar um inibidor de arginase, N^{ω}-hydroxyl-L-arginina, se observou uma diminuição na capacidade de *L. (L.) major* em estabelecer a infecção em macrófagos (Iniesta, Gomez-Nieto et al. 2001).

Curiosamente, enquanto o NO tem sido indicado como uma das principais moléculas microbicidas produzida pelos macrófagos contra parasitas como *Leishmania* (Boucher, Moali et al. 1999), demonstrou-se a existência de uma via de síntese de NO em alguns tripanossomatídeos, como *T. cruzi* (Paveto, Pereira et al. 1995) e diversas espécies de *Leishmania* (Basu, Kole et al. 1997; Genestra, de Souza et al. 2003). Estudos em *L. (L.)*

9



Figura 2 – Esquema da metabolização de L-arginina pelas vias enzimáticas de arginase e iNOS.

donovani indicam que a NOS expressa por esses parasitas seria similar a isoforma I dos mamíferos (Basu, Kole et al. 1997). O papel do NO produzido parece ser muito importante biologicamente para o parasita, pois foi descrita uma relação direta entre a quantidade de NO produzido e a quantidade de formas metacíclicas infectivas em culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sugerindo a associação dessa via com a diferenciação e infectividade desses parasitas (Genestra, Souza et al. 2006).

Logo, a disponibilidade de L-arginina deve ser um ponto crítico em diversos organismos, regulando o sistema composto pelas diversas isoformas de arginase e NOS. Inclusive, durante a infecção de macrófagos por *Leishmania* esse sistema teria todas as suas variáveis presentes, a arginase II e a iNOS do macrófago, e a arginase e a NOS do parasita, assim a regulação desse sistema pela ativação ou inibição dessas enzimas e disponibilidade de L-arginina pode ser fundamental para a definição do destino da infecção.

1.5. A invasão do macrófago pela *Leishmania* e a resposta imune de mamíferos

Conforme colocado no capítulo 1.2. (O ciclo de vida da *Leishmania*), no hospedeiro vertebrado esses parasitas de diferenciam em formas amastigotas que habitam os vacúolos digestivos que se fundem aos lisossomos de macrófagos, formando os fagolisossomos (Rey 1992). Os macrófagos são justamente células de defesa dos mamíferos que, junto com os monócitos que os originam, entre outras células, constituem o sistema de fagócitos profissionais do organismo. Assim, os parasitas escapam da resposta humoral residindo dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, e a resposta imunológica contra *Leishmania* é do tipo celular (Rey 1992).

Como células do sistema imune, uma das estratégias dos macrófagos no combate aos invasores é o "burst" oxidativo induzido com a fagocitose desses organismos. Para isso, a NADPH oxidase é ativada levando à transferência de prótons para moléculas de oxigênio, formando diversas moléculas altamente reativas, como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, que interagem então com a membrana do patógeno (Cunningham 2002). Outro mecanismo de defesa dos macrófagos é a acidificação das vesículas pela ativação de próton ATPases, o que leva à desnaturação das proteínas, deixando os parasitas suscetíveis à ação de hidrolases ácidas (Cunningham 2002). A iNOS é outra enzima muito importante de resposta do macrófago, quando ativada, a iNOS produz citrulina e NO a partir da oxidação da L-arginina, sendo que o NO é uma molécula altamente reativa, efetora no combate a microorganismos invasores (Qadoumi, Becker et al. 2002).

Logo, para viver nos macrófagos, os parasitas do gênero *Leishmania* são capazes de se evadir desses mecanismos de defesa, resistindo ao pH ácido e às enzimas dos lisossomos. Nesse sentido, sabe-se que, primeiramente, as formas metacíclicas são resistentes a lise mediada pelo sistema complemento, principalmente pela presença de longas moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície (Sacks, Pimenta et al. 1995). Já dentro dos macrófagos, graças às moléculas de LPG, esses parasitas inibem a fusão entre o fagossomo e o endossomo, e resistem às enzimas lisossomais (Descoteaux e Turco 1999). Além desses mecanismos de escape, sabe-se também que esses parasitas possuem mecanismos para a diminuição da atividade da enzima iNOS, responsável pela produção de NO, que, como já colocado, é o principal efetor do efeito antiproliferativo exercido por macrófagos ativados (Bogdan e Rollinghoff 1999).

Assim, a regulação precisa da produção de NO é crucial para o hospedeiro, e a evolução da infecção depende também do balanço das respostas imune do tipo Th1 e Th2 que direcionam o metabolismo de arginina. A resposta Th1 implica em resposta imune celular, levando à ativação dos macrófagos e à opsonização; já a resposta Th2 direciona a defesa do organismo para resposta imune humoral, que, conforme colocamos previamente, não tem efeito sobre a infecção de macrófagos por Leishmania (Abbas, Lichtman et al. 2007). O balanço dessas respostas regula o metabolismo de L-arginina durante a infecção, como representado na figura 3, direcionando esse aminoácido para ser utilizado na via metabólica da arginase ou da iNOS. A citocina IFN-y, produzida durante a resposta Th1, induz a expressão de iNOS, enquanto isso, as citocinas IL-4 e IL-10, produzidas durante a resposta Th2, induzem a expressão de arginase (Corraliza, Soler et al. 1995). Também, foi verificada a ocorrência de dois estados metabólicos competitivos, onde a indução de uma dessas enzimas leva a inibição da outra (Hrabak, Bajor et al. 1996; Munder, Eichmann et al. 1998) (Fig. 3).

Com o estudo da regulação das respostas Th1/Th2 na leishmaniose, demontrou-se que a suscetibilidade a infecção por *Leishmania* é mediada pela resposta Th2, via expressão de arginase e síntese de poliaminas, que favorece a replicação dos parasitas no macrófago e diminui a quantidade de arginina disponível para síntese de NO (Iniesta, Carcelen et al. 2005). Já a resposta Th1 ativa a iNOS e promove a morte dos parasitas pelos macrófagos, levando a resolução da infecção pelo hospedeiro vertebrado (Alexander e Bryson 2005; Wanasen e Soong 2008).

1.6. Glicossomos

Uma característica das células eucarióticas é a compartimentalização de funções celulares em organelas, que em determinados protozoários podem ser desenvolvidas como estruturas altamente especializadas como resposta a ambientes inóspitos dos seus hospedeiros. Nesse contexto, os tripanossomatídeos desenvolveram os glicossomos, organelas únicas que



Figura 3 – Esquema dos possíveis efeitos regulatórios no metabolismo de L-arginina em macrófagos. As citocinas das respostas imune Th1 e Th2 regulam a indução de óxido nítrico sintase (NOS) e arginase, respectivamente. Os produtos de cada enzima regulam reciprocamente a atividade da outra enzima. Os produtos finais de cada via, óxido nítrico (NO) e ornitina, inibem a enzima da própria via (NOS e arginase, respectivamente). As rotas metabólicas estão representadas por setas contínuas e as rotas regulatórias por setas descontínuas. + e – denotam ativação ou inibição, respectivamente. Modificado de (Hrabak, Bajor et al. 1996).

representam uma das principais diferenças entre parasita e hospedeiro, e por isso são muito estudadas como possíveis alvos de quimioterápicos (Smith e Parsons 1996).

Os glicossomos são organelas globulares com 0,2 a 0,3 μ m, envolvidas por uma bicamada fosfolipídica, sem material genético ou ribossomos (Opperdoes, Baudhuin et al. 1984). Encontra-se entre 10 e 100 glicossomos por célula em todos os organismos da ordem kinetoplastida (Smith e Parsons 1996).

Dentre compõem as enzimas organela, que essa а compartimentalização das sete primeiras enzimas da via glicolítica, e de duas enzimas que metabolizam glicerol nos glicossomos, permite a esses parasitas aumentar significativamente taxa de glicólise а e,

conseqüentemente, a produção de ATP. Com isso, os parasitas conseguem contornar a baixa produção de energia da conversão de glicose em piruvato durante a fase sanguínea do seu ciclo de vida (Smith e Parsons 1996).

Além das funções relacionadas à produção de energia, outras vias bioquímicas estão pelo menos parcialmente associadas aos glicossomos nesses parasitas, como a β -oxidação de ácidos graxos, a biossíntese de pirimidinas, entre outras (Smith e Parsons 1996).

As proteínas glicossomais são sintetizadas em ribossomos livres no citoplasma e então são transferidas para os glicossomos (Hart, Baudhuin et al. 1987), sem a necessidade de nenhuma modificação pós-tradução para a importação (Moyersoen, Choe et al. 2003).

Evolutivamente, estudos moleculares confirmaram que os glicossomos são derivados de uma organela ancestral relacionada aos peroxissomos, e a importação de proteínas com sinal peroxissomal ao glicossomo confirma a conservação do mecanismo de endereçamento de proteínas com um determinado sinal na terminação carboxila (Smith e Parsons 1996). Além disso, o mecanismo de importação de proteínas para o glicossomo, assim como no caso dos peroxissomos, envolve diversas proteínas PEX, fatores protéicos da biogênese de peroxissomos, que se mostraram essenciais para os tripanossomatídeos (Guerra-Giraldez, Quijada et al. 2002; Moyersoen, Choe et al. 2003; Krazy e Michels 2006).

Para identificar os sinais de endereçamento das proteínas glicossomais, diversos estudos realizaram fusões de proteínas repórter a seqüências de proteínas glicossomais que foram então expressas *in vivo* e analisadas quanto à localização celular (Smith e Parsons 1996).

Foi verificado que a maioria das enzimas peroxissomais apresentam o sinal PTS1 na terminação carboxila, que consiste em apenas 3 aminoácidos – SKL – ou uma variante conservativa desses. Algumas enzimas apresentam o sinal PTS2 na terminação amino, sendo que esse consiste em um sinal bipartido com a seqüência consenso [RK]-[LVI]-x5-[HQ]-[LA], e ainda há algumas proteínas que não possuem esses sinais canônicos (Opperdoes e Szikora 2006).

A análise computacional do genoma dos tripanossomatídeos *L. (L.) major, T. brucei* e *T. cruzi*, rastreando a presença dos sinais PTS1 e PTS2, identificou 191 proteínas putativas com o sinal PTS1 e 68 com o sinal PTS2, ou seja, aproximadamente 75% do total das proteínas endereçadas teriam o sinal PTS1 (Opperdoes e Szikora 2006).

Um importante mecanismo adaptativo desses parasitas é a regulação do conteúdo protéico glicossomal expresso durante o ciclo de vida dos kinetoplastídeos. No caso do *T. brucei*, durante a fase sanguínea esses parasitas encontram alta disponibilidade de glicose, e estão altamente adaptados para obter energia pela via glicolítica, e com isso as funções mitocondriais estão suprimidas; já na forma procíclica, dentro do inseto, a via mitocondrial de fosforilação oxidativa se torna a principal via de geração de ATP (Smith e Parsons 1996). Além disso, foi mostrado que a compartimentalização glicossomal da glicólise protege a forma sanguínea desses parasitas contra o acúmulo de intermediários tóxicos que, dada a disponibilidade constante de glicose para essa via autocatalítica, poderiam se acumular levando à morte desses organismos (Haanstra, van Tuijl et al. 2008).

1.7. Manipulação genética para o estudo de genes em tripanossomatídeos

Diversas ferramentas moleculares permitiram o progresso do conhecimento de diferentes aspectos dos tripanossomatídeos, e a eficiência dessas novas ferramentas nesses parasitas tem conduzido a evolução de diferentes estudos da biologia desses organismos. Esses métodos permitem a investigação da função gênica, com a perda ou ganho de funções, e o estudo da localização das proteínas produzidas, com o uso de diversos "tags", como a proteína fluorescente verde (GFP) (Beverley 2003).

Focando nas abordagens utilizadas neste trabalho, uma das ferramentas disponíveis são os vetores que permitem a expressão de proteínas heterólogas. Essas moléculas podem ser epissomos circulares contendo os sinais de regulação de expressão específicos de
tripanossomatídeos (Papageorgiou e Soteriadou 2002; Smirlis, Bisti et al. 2006), ou cromossomos artificiais lineares, que são expressos quando integrados ao genoma desses organismos. Esses vetores podem ser introduzidos de forma transiente, ou estabilizados com o uso de marcas de seleção, positivas (timidina quinase) ou negativas (antibióticos) (Beverley 2003).

Outra alternativa, muito usada em tripanossomatídeos, é a substituição gênica por recombinação homóloga, que deve ser realizada em dois passos para a obtenção de nocautes nulos, dado que esses organismos são diplóides. Para isso, em cada etapa, é introduzida no parasita uma molécula linear de DNA contendo uma marca seletiva flanqueada por regiões complementares às regiões à montante e à jusante do segmento alvo. Com isso é possível substituir a fase aberta de leitura (ORF) de genes e avaliar a função desse gene dado o impacto causado pela sua ausência (Cruz, Coburn et al. 1991).

A obtenção de nocautes nulos é geralmente simples quando o alvo é um gene não essencial, porém a tentativa de nocautear genes essenciais em *Leishmania* leva à geração de parasitas aneuplóides e poliplóides (Cruz, Titus et al. 1993). Essa questão pode ser contornada com o uso de moléculas que suplementem a ausência desse gene, como produtos posteriores da via metabólica afetada (Roberts, Tancer et al. 2004), ou com a expressão heteróloga ectópica do gene alvo ou de uma enzima que faça parte de uma via metabólica alternativa, contornando a ausência do alvo (Balana-Fouce, Garcia-Estrada et al. 2008; Murta, Vickers et al. 2009).

Recentemente, uma nova técnica foi descrita capaz de regular a função gênica em nível protéico, o que é especialmente interessante considerando as particularidades dos tripanossomatídeos com relação à expressão gênica. Banaszynski e colaboradores descreveram um sistema onde os níveis protéicos são controlados pela degradação regulada de um domínio *cis* ligado à proteína de interesse, sendo que esse domínio consiste em uma seqüência modificada da proteína humana FKBP12, que se liga seletivamente a FK506 (análogo da rapamicina) e Shld1. Na presença desses ligantes específicos, o domínio de desestabilização (dd) FKBP é

estável, conferindo estabilidade à proteína fundida a ele; no entanto, na ausência desses ligantes a estrutura do dd é desestabilizada, endereçando a proteína fundida para rotas de degradação (Banaszynski, Chen et al. 2006). Esse novo método já foi aplicado, com sucesso, aos parasitas *Plasmodium falciparum* (Armstrong e Goldberg 2007), *Toxoplasma gondii* (Herm-Gotz, Agop-Nersesian et al. 2007), *L. major* e *L. braziliensis* (Madeira da Silva, Owens et al. 2009).

2. Objetivos

Tendo em vista a contribuição no esclarecimento do papel da arginase de *L. (L.) amazonensis* no mecanismo de subversão desse parasita durante a infecção, elucidando a função da arginase de *L. (L.) amazonensis* no ciclo de vida do parasita, este trabalho tem por objetivos gerais:

- Localizar por imunofluorescência a arginase na forma promastigota de *L. (L.) amazonensis*.
- Verificar se ocorre redirecionamento da arginase durante a infecção pelo parasita.
- Verificar a importância fisiológica da compartimentalização da arginase para o parasita.

2.1. Objetivos específicos

- Expressar e purificar arginase recombinante de L. (L.) amazonensis.
- Produzir soros policionais anti-arginase de *L. (L.) amazonensis* em camundongo e coelho.
- Imunolocalizar a arginase de *L. (L.) amazonensis* na forma promastigota e na forma amastigota, durante a infecção de macrófagos.
- Superexpressar a arginase com e sem o sinal de endereçamento para glicossomo em *L. (L.) amazonensis*.
- Obter parasitas *L. (L.) amazonensis* com um alelo do gene da arginase nocauteado.
- Obter um nocaute funcional de arginase em *L. (L.) amazonensis*, cuja expressão de arginase, endereçada ou não para o glicossomo, ocorra exclusivamente na presença de um ligante específico.
- Obter parasitas *L. (L.) amazonensis* com os dois alelos do gene da arginase nocauteado.
- Avaliar a expressão de arginase e verificar o poder infectivo de todos os mutantes obtidos.

3. Material e Métodos

3.1. Organismos e células

Leishmania (Leishmania) amazonensis (MHOM/BR/1973/M2269). Leishmania (Leishmania) major LV39c5 (LV39cl5; RHO/SU/59/P). Escherichia coli SURE [™] (Stratagene).

Escherichia coli [BL21(DE3)pLysS] (B F $\bar{}$, ompT, hsdS (r_B $\bar{}$, m_B), gal, dcm).

Macrófagos J774A 1.

Coelho Branco da Nova Zelândia (BNZ), cedido pelo Instituto Butantan. Camundongos BALB/c.

3.2. Cultivo de células

3.2.1. Cultivo de Leishmania

Formas promastigotas de *Leishmania* foram mantidas a 25 °C em 10 mL de meio M199 (L-glutamina e sais de Hanks, sem bicarbonato de sódio) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5 ppm de hemina, 100 μ M adenina, 50 U de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina, tampão Hepes-NaOH 40 mM e NaHCO₃ 12 mM, pH 6,85; com repiques a cada sete dias (Kapler, Coburn et al. 1990).

3.2.2. Cultivo de bactérias

As bactérias *E. coli* foram cultivadas a 37 °C, sob agitação (250 rpm) em meio SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 2,5 mL de KCl 1 M em uma volume final de 1 L). Após esterilização e resfriamento, foi adicionado ao meio 10 mL de MgCl₂ 1 M. Para o preparo de meio semi-sólido foi adicionado ágar para uma concentração final de 1,5% W/V. Os antibióticos utilizados foram ampicilina a 100 µg/mL e, para manter a cepa de *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] transformada também se utilizou cloranfenicol a 35 µg/mL, mantendo a pressão seletiva para a manutenção do plasmídeo que expressa a polimerase responsiva à indução.

3.2.3. Cultivo de macrófagos J774A 1

As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂, a 37 $^{\circ}$ C em meio RPMI 1640 (com 25 mM de Hepes e L-glutamina) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,3 g/L de bicarbonato de sódio; as culturas foram repicadas a cada 3 dias.

3.2.4. Contagem de células

A contagem foi feita em contador automático "Coulter® Z^{TM} Series" (Coulter) ou câmara de Neubauer diluindo 20 vezes as células em PBS 1X (tampão fosfato: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) com 1% de formaldeído.

3.3. Ensaios Protéicos

3.3.1. Preparação de extrato protéico total de *E. coli* [BL21(DE3)pLysS]

Para a obtenção do extrato protéico usamos uma cultura de *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] transformada com uma molécula recombinante (pRSET ARG) contendo a fase aberta de leitura que codifica a arginase de *L. (L.) amazonensis* no vetor de expressão pRSET, modificado para eliminação da cauda de Histidina (da Silva 2001; da Silva, da Silva et al. 2008).

Uma colônia de *E. coli*, transformada com a construção contendo o gene de arginase, foi inoculada primeiramente em 3 mL e depois em 50 mL de meio SOB contendo antibióticos, nas concentrações descritas anteriormente. Esses inóculos foram então incubados por aproximadamente 18 horas a 37 °C. No dia seguinte, 40 mL dessa cultura foram transferidos

para 1 L de meio SOB (com antibióticos) para uma densidade ótica a 600 nm de 0,1 final e incubados a 37 °C. Para indução da expressão da arginase recombinante, quando a DO₆₀₀ de 0,6 foi atingida, foi adicionado IPTG e MnSO₄ para concentração final de 1 mM e 10 mM, respectivamente (da Silva, da Silva et al. 2008). Amostras de 1 mL foram coletadas no tempo T₀ (antes da adição de IPTG). Após 3 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão de lise (MOPS: NaOH 100 mM, pH 7,5, PMSF 1 mM, DNase 5 U/mL). O volume de tampão de lise foi de 5% do volume do meio de cultura inicial. As células preparadas foram então lisadas em cinco ciclos de congelamento rápido em N₂ líquido e descongelamento a 42 °C em banho de água, e, finalmente, o extrato foi clarificado por centrifugação a 15000 x g por 15 minutos.

3.3.2. Eletroforese de proteínas – SDS-PAGE

O fracionamento de proteínas foi realizado em SDS-PAGE 10% descontínuo conforme descrito por Laemmli (Laemmli 1970).

3.3.3. Quantificação de proteínas

A determinação da concentração protéica foi realizada utilizando o "Quick Start Bradford Proteon Assay" (Bio-Rad), sendo que a curva padrão foi determinada a cada ensaio utilizando quantidades conhecidas de albumina de soro bovino.

3.3.4. Purificação da arginase recombinante de L. (L.) amazonensis

Para a produção de soro policional anti-arginase, o antígeno foi purificado a partir de extrato clarificado de bactérias *E. coli* [BL21(DE3)pLysS], transformadas com o plasmídeo R12 (pRSET ARG) (da Silva 2001) após indução com IPTG. A purificação consistiu em dois passos:

A. Cromatografia de afinidade a metais imobilizados

Após a clarificação, 50 mL do extrato foi aplicado em uma coluna de 1 mL de Ni-NTA Superflow (Quiagen), previamente equilibrada com tampão A (MOPS-NaOH 100 mM, pH 7,2). A arginase retida na coluna foi ativada com a aplicação de 2 mL de MnSO₄ 50 mM em tampão A (tampão B) e, em seguida, foi feita a eluição das proteínas retidas aplicando na coluna um gradiente manual de 10 mM a 200 mM de Imidazol em tampão A. As frações coletadas de cada eluição foram analisadas em SDS-PAGE 10%.

B. Cromatografia de troca iônica

As frações selecionadas após a análise do primeiro passo da purificação, com uma banda de tamanho próximo a 36 kDa, peso molecular da arginase (da Silva 2001), foram reunidas e submetidas ao segundo passo da purificação. Nesse passo, a amostra foi aplicada a uma coluna de 1,5 mL de DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), equilibrada com tampão C (MOPS-NaOH 20 mM, pH 7,2). Parte da arginase presente na amostra não se liga a coluna e é coletada no "void". Posteriormente, a coluna foi lavada com um gradiente manual de 10 mM a 200 mM de NaCI em tampão C para eluição da arginase retida e, em seguida, com 1 M de NaCI em tampão C para remoção dos contaminantes. O eluato foi coletado em frações de 1 mL que foram analisadas em SDS-PAGE 10% e dosado por Bradford.

3.3.5. Preparação de extrato protéico total de L. (L.) amazonensis

Para a preparação do extrato protéico de *L. (L.) amazonensis*, as células provenientes de 10 mL de cultura em fase logarítmica ou estacionária foram coletadas, por centrifugação, e ressuspensas em um volume final de 300 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 contendo MnSO₄ 1 mM. Ao tampão foram adicionados os seguintes inibidores de: peptidases, benzamidina 2 mM (Jeffcoate e White 1974); metalo protease, fenantrolina 5 mM; tripsina, 5 μ g/ml ITS (Birk 1985); serina e cisteína proteases, coquetel inibidor de proteases Sigma (P8340); serina proteases (tripsina e quimitripsina), PMSF 1 mM (Moss e Fahrney 1978). Em seguida, as células de *L. (L.) amazonensis* foram lisadas em dez ciclos de congelamento rápido

em N₂ líquido e descongelamento a 42 °C em banho de água. Após essa lise, os extratos foram clarificados por centrifugação a 15000 x g por 15 minutos, e então, o conteúdo protéico foi dosado por Bradford para serem utilizados em ensaios de atividade de arginase.

3.3.6. Ensaio de atividade de arginase in vitro

Os ensaios de atividade de arginase foram realizados em dois passos, o primeiro deles envolve a reação catalisada pela arginase, utilizando Larginina como substrato para produção de uréia. Já o segundo passo envolve a detecção de uréia por um método cinético (Uréia ES, Celm).

A. Reação da arginase

No primeiro passo foram utilizados 6 μ g de extrato protéico e 10 ou 100 mM de L-arginina-NaOH 500 mM, pH 9,6 em água para volume final de 100 μ L. Essa reação foi incubada a 37 °C por diversos tempos, nos quais eram retiradas alíquotas de 10 μ L da reação para a segunda etapa de detecção de uréia.

B. Detecção de uréia

Nesse ensaio para quantificação da uréia produzida, foi utilizado o método colorimétrico Uréia ES da Celm. Essa etapa é formada por duas reações acopladas: na primeira ocorre a conversão da uréia em carbonato de amônio pela ação da enzima urease; na segunda, o carbonato de amônio formado reage com nitroprussiato na presença de hipoclorito e salicilato gerando azul de indofenol, um composto que absorve luz com comprimentos de onda em torno de 600 nm.

 $\begin{array}{c} \text{Urease} \\ \text{Uréia} & \longrightarrow (\text{NH}_4)_2 \text{ CO}_3 \end{array}$

 $\label{eq:NH4} \begin{array}{c} \mathsf{NH_4}^{\scriptscriptstyle +} + \mathsf{salicilato} + \mathsf{hipoclorito} & \xrightarrow{\mathsf{Nitroprussiato}} \\ & azul \ de \ indofenol \end{array}$

Portanto, para a detecção adicionamos os 10 μ L retirados da reação da arginase, descrita no item A, a 750 μ L do reativo 1 (urease em tampão fosfato 20 mM, salicilato 60 mM, nitroprussiato de sódio 3,4 mM e EDTA1,4 mM). A

curva padrão é preparada acrescentando-se 10 μL de soluções com diferentes concentrações de uréia. As reações foram incubadas por 10 minutos a 37 °C para a formação de (NH₄)₂ CO₃. Em seguida, foram adicionados 750 μL do reativo 2 (hipoclorito 11 mM e NaOH 0,8 M) e as reações foram incubadas mais 10 minutos a 37 °C. O produto formado foi medido pela leitura a 600 nm, e a quantificação feita por interpolação com a curva padrão.

3.3.7. Produção de anticorpos

Para os ensaios de imunofluorescência foram produzidos soros policionais anti-arginase, tanto em coelho, como em camundongo BALB/c. O antígeno obtido por purificação, conforme descrito anteriormente, foi usado em um esquema de imunização de dois inóculos subcutâneos de 2 mL: o primeiro com 50% (em volume) de adjuvante de Freund completo (Sigma) e 50% (em volume) de arginase, senda que a concentração final de arginase foi 0,5 mg/mL; o segundo inóculo, 30 dias depois, com adjuvante de Freund incompleto (Sigma) e arginase na mesma proporção e concentração. Depois de 15 dias, o animal anestesiado foi sangrado por incisão subaxial (camundongo) ou na artéria principal abaixo do centro da superfície dorsal da orelha (coelho). O sangue coletado foi primeiramente incubado 30 minutos a 37 °C e, em seguida, por 18 horas a 4 °C. O soro foi então separado por centrifugação a 1600 x g, por 15 minutos, a 4 °C.

3.3.8. Western blot

Os extratos protéicos obtidos foram submetidos à separação eletroforética em SDS-PAGE e as proteínas fracionadas foram então transferidas para membranas de nailon/nitrocelulose (Towbin, Staehelin et al. 1979) com voltagem de 10 V por 30 minutos no sistema Trans-Blot[®] Semi-Dry (BIO-RAD).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em PBS 1X contendo 5% de leite em pó (Molico) e 0,1% de Tween 20. Em seguida, a membrana

foi incubada com diferentes diluições do anti-soro em PBS 1X contendo 1% de leite durante 1 hora. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS 1X/Tween 20 0,1% e incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti-IgG de camundongo ou coelho, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:3000 em PBS 1X contendo 1% de leite, durante 1 hora. Após várias lavagens com PBS 1X/Tween 20 0,1%, a peroxidase foi revelada com H₂O₂ e 4-cloro-1-naftol.

Para quantificação da marcação revelada utilizamos o software ImageJ 1.41 (NIH, USA).

3.3.9. Imunolocalização de arginase em promastigotas de L. (L.) amazonensis

Foram feitas preparações citológicas de promastigotas de cultura, lavando-se as células com PBS 1X e aplicando-se a quantidade desejada em lâminas de microscopia. Essas foram então fixadas com Metanol absoluto (Merck) e permeabilizadas com PBS 1X contendo 1% de Triton, por 5 minutos. As lâminas foram então bloqueadas com PBS 1X contendo 1% de BSA durante 1 hora a 37 °C, em câmara úmida. Posteriormente, procedeu-se à incubação com o anticorpo anti-arginase de camundongo diluído conforme indicado nos resultados em PBS 1X, durante 1 hora a 37 °C em câmara úmida. As lâminas foram então lavadas em PBS 1X e incubadas com o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo Alexa 488 ou 568 (Invitrogen) diluído 1:50 e DAPI (Invitrogen) também diluído 1:50, nas mesmas condições da primeira incubação. Depois de serem lavadas, as lâminas foram montadas com Vectashield (Vector) para prolongar a reação de fluorescência.

Essas preparações foram analisadas em microscópio confocal Carl Zeiss Microlmaging, Inc. (modelo LSM510) com software versão 2.5 para Windows NT.

3.4. Ensaios com ácidos nucléicos

3.4.1. Extração de ácidos nucléicos

3.4.1.1. Extração de DNA genômico de promastigotas de *Leishmania* (adaptado) (Uliana, Affonso et al. 1991)

Aproximadamente 5 x 10⁹ promastigotas de fase estacionária eram coletadas por centrifugação a 3000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas uma vez com PBS 1X e ressuspensas em NaCl 150 mM. As células eram então lisadas por gotejamento em 4,5 mL de TES (Tris-HCl 150 mM, pH 7,5, EDTA 50 mM e 1% SDS) previamente aquecido a 65 °C com agitação gentil. O lisado era tratado com pronase (200 mg/mL) a 45 °C por 2 horas. Seguia-se, então, uma extração orgânica pela adição de igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e uma pela adição de igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A fase aguosa, contendo os ácidos nucléicos, foi precipitada com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 7,0) e 2 volumes de etanol absoluto gelado (-20 °C). O precipitado era enrolado em um bastão de vidro seco e ressuspenso em 0,5 mL de água. Realizava-se um tratamento com RNase A (50 µg/mL) por 1 hora a 37 °C. Seguiam-se novas extrações orgânicas, e precipitação. O DNA era então ressuspenso em 0,5 mL de água. Por fim, a concentração e a pureza eram determinadas em espectrofotômetro Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech ou GeneQuant pro (Amersham Biosciences) (DO₂₆₀/DO₂₈₀ próximo de 1,8).

3.4.1.2. Mini Extração de DNA de promastigotas de *Leishmania* (adaptado) (Medina-Acosta e Cross 1993)

Um volume de 1 mL de cultura de promastigotas em fase estacionária de crescimento foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado era ressuspenso em 150 µL de TELT (Tris-HCI 50 mM pH 7,4; EDTA 62,5 mM pH 9,0; LiCl 2,5 M; Triton X-100 4% V/V) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Eram adicionados 150 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a suspensão era incubada por 5 minutos a temperatura ambiente com inversão gentil. Seguia-se uma centrifugação a 12000 x g por 5 minutos, a fase aquosa era colhida e o DNA precipitado pela adição de 300 μ L de etanol e centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante era descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% gelado (-20 °C), seguindo-se uma centrifugação a 12000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante era descartado e o pellet deixado para secar a temperatura ambiente. Após seco, era ressuspenso em 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM pH 9,0).

3.4.1.3. Extração de RNA total de promastigotas de Leishmania

Aproximadamente 10⁹ promastigotas de fase logarítmica de crescimento foram coletadas por centrifugação a 3000 x g por 10 minutos, lavadas com PBS 1X e lisadas com TRIZOL[®] REAGENT (GIBCO-BRL). Os passos subseqüentes eram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, a concentração e pureza foram determinadas em espectrofotômetro GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences) (DO₂₆₀/DO₂₈₀ próximo de 2).

3.4.1.4. Extração de DNA de plasmídeo de bactérias

A extração de plasmídeos de bactérias foi feita seguindo o protocolo descrito por Birnboim e Doly (Birnboim e Doly 1979) modificado. Resumidamente, a partir do inóculo de colônia isolada em SOB/ágar em 3 mL de SOB com 100 mg/L de ampicilina, crescido por 18 horas, coletava-se as células por 1 minuto de centrifugação a 14000 x g. As células então foram ressuspensas em 300 µL de solução 1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 10 mM pH 8,0; RNAse A 100 µg/mL). Em seguida, adicionou-se 300 µL de solução 2 (NaOH 0,2 M e SDS 1%) e misturou-se invertendo o tubo 5 vezes. Finalmente, adicionou-se 300 µL de solução 3 (acetato de potássio 3 M, pH

5,0) e o tubo foi novamente invertido cinco vezes para misturar. Após esse tratamento, os tubos foram centrifugados a 14000 x g por 15 minutos a 4 $^{\circ}$ C e o sobrenadante recuperado foi usado para precipitação do DNA adicionando-se 400 µL de isopropanol. O DNA foi então colhido por centrifugação (14000 x g por 15 minutos a 4 $^{\circ}$ C) e lavado com 600 µL de etanol 70% a 4 $^{\circ}$ C. O precipitado foi seco foi ressuspenso em 50 µL de TE (Tris 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM pH 8,0) ou água.

3.4.2. Clivagem de DNA com endonucleases

Amostras de DNA foram digeridas utilizando-se as enzimas de restrição apropriadas e seguindo as instruções do fabricante (Fermentas Life Sciences).

3.4.3. Transcrição reversa com oligo dT

Para a transcrição reversa, 1 μ g de RNA foi desnaturado a 70 °C por 5 minutos juntamente com 10 μ M de oligonucleotídeo dT (5' (TTT)₆ 3') em um volume final de 12 μ L. Após esse tempo, a reação foi colocada no gelo e, em seguida, foram adicionados 4 μ L de tampão de transcriptase reversa 5x (Tris-HCl pH 8,3 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 1 μ L de inibidor de RNase (fornecida pelo fabricante) e 2 μ L de dNTPs 10 mM. Essa reação foi então incubada a 37 °C por 5 minutos e depois foi adicionado 1 μ L de transcriptase reversa (200 U/ μ L) (Fermentas Life Sciences). Seguiu-se incubações de 60 minutos a 42 °C e 10 minutos a 70 °C. O produto foi armazenado a -20 °C.

3.4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.4.4.1. Oligonucleotídeos

5L-BamHI-ARG – 5' CCG GAT CCT CAT GGA GCA CGT GCA GC 3' 3L-BamHI-ARG – 5' GTG CGC ACG GAT CCG TCT ACA GC 3' 3L-BamHI-ARGSSKL – 5' ACG GAT CCT AGC TCG TAT GCG GAG TGT AA 3'

seqpX5S: 5′ TGT CTC TTG TCG GTG CTC ACC 3′ seqpX3AS: 5′ CGC CCT CCT CTC TCC TTG CTT 3′ ARG5's: 5′ GAA TTC TGC GCC TTT AGT GTT GCG TAG 3′ ARG5'as: 5′ GGT ACC GGG GCA AAT TTT AAT TCT CTG C 3′ ARG3's: 5′ TCT AGA TCG TTG GTG CGT TCC CTT TTC 3′ ARG3'as: 5′ CCT GGA AAA CAA CCC GAA AAC TGC AG 3′ DHFRs2: 5′ GGT ACC GAA TTC GAA AGC TCA CCT CAT TCC 3′ ORFas2: 5′ TCT AGA GCA GCT CAA ATC ACC ACC ACA CAC 3′ M13F: 5′ GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A 3' M13R: 5′ CCT GTG TGA AAT TGT TAT CCG CTC 3' ARG 5UTRs: 5′ TCG GGG TGA TAC GTT GGC CTT CAG TAC GCA

TGC TTG TCT CCC TCC 3'

ARG_3UTRasII: 5' GGA GCG CGA GAG TGA AGG AGA GCA AGA AAC AAC AGT GGT CGT GGT G 3'

pHygS: 5 $^{\prime}$ CCG AGC ACT AGC TAG TGA TGA AAA AGC CTG AAC TCA CCG CGA CGT 3 $^{\prime}$

pHygAS: 5′ TTC GGT CGG CAT CTA CTC TAT TCC TTT GCC CTC GGA CGA GTG CTG 3′

G6PD – LLF: 5' CTT GTT GCC TCC GGC TAC 3'
G6PD – LLR: 5' GGC CAT GTA AGC ATC CTC AT 3'
ARG – S22: 5' GTG TCA TAC GAC GTG GAC ACG 3'
ARG – SC: 5' CGA CAA GAC GAC CGC ACT CGG C 3'
10: 5' TTC ATG AGG TCA TCG CTG CCC 3'
11: 5' TCC AAA TGC ACG CGA ACG TGG 3'
PSSRealS: 5' TCC TGC TGA TGC TGC TGC AG 3'
FOSFM3AS: 5' CGC CCA CAG GAC CAG TCG 3'
ARGs_Spel: 5' CTA GTT TCA TCA TGG AGC ACG TGC AGC 3'
ARGas_Xbal: 5' TCT AGA CTA CAG CTT GGA GCT CGT ATG CG 3'
ARGΔSKLas_Xbal: 5' TCT AGA CTA GCT CGT ATG CGG AGT GTA

SMB2564: 5' CGA GAT CCC ACG TAA GGT GCT CAG TCC TGC TCC TCG GCC ACG AAG 3'

dd3Lsense: 5' CAA ACT GAC TAT ATC TCC AGA TTA TGC CTA 3' SMB 3227: 5' GGA TCC GAG TTA GTC GAG TGC GTA GTC TGG TAC 3'

SMB 3545: 5' GGC CAC CGT CGG CGT CTC GC 3' SMB 3546: 5' TGC GCG GTC CTT CGG GCA CC 3'

3.4.4.2. PCR convencional

A amplificação de fragmentos de DNA foi realizada com o protocolo de Mullis (Mullis, Faloona et al. 1986) adaptado. Resumidamente, utilizamos 10 pmols de cada oligonucleotídeo iniciador em um volume final de 50 μ L, adicionando-se o tampão da enzima (fornecido pelo fabricante), 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂ e 2 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Life Sciences). As reações foram incubadas a 94 °C por 4 minutos, seguindo-se 30 ciclos térmicos: 94 °C por 1 minuto, 1 minuto na temperatura de associação definida pela composição dos oligonucleotídeos utilizados (Tabela I), e 72 °C pelo tempo necessário para gerar o fragmento do tamanho esperado, considerando a velocidade da *Taq* como 1 kb/minuto (Tabela I). Finalmente, realizou-se uma extensão final por 7 minutos a 72 °C. Os produtos foram visualizados por fracionamento em eletroforese em gel de agarose.

3.4.4.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado em um equipamento ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Para a reação foi utilizado 12,5 μL de SYBERGreen®PCR Master Mix, 0,2 μM de oligonucleotídeos e 10 μL de cDNA molde, obtido como descrito no item anterior RT-PCR, em um volume final de 25 μL. As reações passaram por dois passos antes dos ciclos da reação: o primeiro de 50 °C por 2 minutos, para ativar o fluoróforo, e o segundo de 94 °C por 10 minutos, para o "hot start" da *Taq* polimerase. Em seguida, foram realizados 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos e associação de 61 °C por 30 segundos. Os resultados apresentados representam a média de triplicatas.

Par de Oligonucleotídeos	Temperatura de Associação	Tempo de Extensão
(DNA molde)	(°C)	(segundos)
5L-BamHI-ARG + 3L-BamHI-ARG	60	60
5L-BamHI-ARG +	60	60
3L-BamHI-ARGSSKL		
seqpX5s + seqpX3AS	55	90
ARG5's + ARG5'as	60,5	30
ARG3's + ARG3'as	60,5	30
DHFRs + ORFas2	60	90
M13F + M13R (p5AHyg3A)	55	120
M13F + M13R		
(p5APhleoddARG3A/	60	300
p5APhleoddARG∆SKL3A)		
PhleoKpnI_S + ddSpeIXbal_AS	55	180
ARGs Spel + ARGas Xbal	60	60
ARGs Spel + ARG∆SKLas Xbal	59	60
ARG_5UTRs + pHygAS	70	150
ARG_3UTRasII + pHygS	70	150
pHygS + pHygAS	70	60
ARG_5UTRs + SMB2564	70	60
ARG_5UTRs + ARG_3UTRasII	65	270

Tabela I – Condições de PCR por par de oligonucleotídeos utilizados.

*as reações com os seguintes pares de oligonucleotídeos: dd3Lsense + ARGasXbal, dd3Lsense + SMB3227, ARG_5UTRs + SMB3546 e SMB3545 + ARG_3UTRasII, foram realizadas com a enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) usando as condições de reação descritas no manual, e os ciclos térmicos: 98 °C por 5 minutos, 30 vezes (98 °C por 10 segundos, 72 °C por 2 minutos e 30 segundos) e 72 °C por 10 minutos.

3.4.5. Eletroforese de DNA

Cada amostra de DNA, depois de ressuspensa em um volume de 10X de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%;

Ficoll – tipo 400 15%, Pharmacia), foi aplicada em gel de agarose de 0,8 a 1,5%, conforme a resolução necessária, em 1X TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 7,4) com 2,5 μg/L de brometo de etídeo. O fracionamento das moléculas foi feito com a aplicação de uma diferença de potencial de aproximadamente 7,7 V/cm por tempo suficiente para que o corante azul de bromofenol migrasse 2/3 do comprimento do gel. A visualização dos fragmentos foi então feita por transiluminador, com incidência de luz ultravioleta e registrada em máquina fotográfica digital Kodak.

3.4.6. Eluição

Para a purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose, utilizamos o "kit" de extração de DNA Pure Extreme[™] (Fermentas Life Sciences) seguindo as instruções do fabricante.

3.4.7. Clonagem de fragmentos de DNA

3.4.7.1. Vetores

pUC 19: com 2686 bases, apresenta o gene da β-lactamase, o gene lacZ, origem de replicação ColE1 e os sítios múltiplos de clonagem.

pGEM®-T easy: derivado do vetor Promega pGEM-T easy clivado com *Eco*RV e adicionado uma timina às extremidades 3´, possuindo 3018 bases, o gene da β-lactamase, o gene lacZ, a origem de replicação e os sítios de múltipla clonagem.

pXG (Ha, Schwarz et al. 1996): com 6822 bases, apresenta os genes de resistência a ampicilina e neomicina, seqüências intergênicas de *Leishmania* contendo os sinais de *trans*-splicing e poliadenilação, e sítios múltiplos de clonagem.

pXGHyg (Ha, Schwarz et al. 1996): com 6944 bases, apresenta os genes de resistência a ampicilina e higromicina, seqüências intergênicas de *Leishmania* contendo os sinais de *trans*-splicing e poliadenilação, e sítios múltiplos de clonagem.

B6323 (Madeira da Silva, Owens et al. 2009): com 5180 bases, apresenta os genes de resistência a ampicilina e fleomicina, a seqüência de nucleotídeos que codifica o domínio de degradação ddFKBP, seqüências intergênicas de *Leishmania* contendo os sinais de *trans*-splicing e poliadenilação, e sítios múltiplos de clonagem.

B6182 (Madeira da Silva, Owens et al. 2009): com 8717 bases, apresenta os genes de resistência a ampicilina e fleomicina, a seqüência de nucleotídeos que codifica o domínio de degradação ddFKBP, seqüências intergênicas de *Leishmania* contendo os sinais de *trans*-splicing e poliadenilação, seqüências para integração no locus de SSU do rDNA de *Leishmania* e sítios múltiplos de clonagem.

3.4.7.2. Ligação de fragmentos de DNA

Fragmentos de DNA purificados foram ligados ao vetor com T4 DNA ligase (Fermentas Life Sciences, Promega) de acordo com as recomendações do fabricante utilizando-se uma relação molar de extremidades de fragmento:vetor entre 3:1 e 6:1.

3.4.7.3. Preparação de bactérias competentes e transformação

Células SURE foram preparadas com CaCl₂ e transformadas por choque térmico a 42 °C, conforme descrito por Sambrook (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

3.4.8. Determinação da seqüência de nucleotídeos de DNA

O seqüenciamento de DNA foi realizado a partir do protocolo de Sanger e Coulson (Sanger e Coulson 1975) adaptado. As reações foram realizadas com BigDye[®]Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit da Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram fracionadas no aparelho ABI PRISM® 3100GeneticAnalyzer/HITACHI do serviço de seqüenciamento do IQUSP. As seqüências obtidas foram analisadas no software BioEdit (Hall 1999).

3.5. Transfecção de Leishmania

Utilizamos o método padronizado em nosso laboratório (de Andrade Stempliuk e Floeter-Winter 2002). Resumidamente, formas promastigotas em início de fase estacionária foram lavadas e ressuspendidas em PBS 1X. As células (3 x 10⁸) foram mantidas em gelo com 10 µg de DNA de plasmídeo, linearizado ou não, dependendo do interesse, por 10 a 15 minutos em cubetas de 0,2 cm de distância entre eletrodos, para eletroporação Gene Pulser®/ *E.coli* Pulser[™] (BIORAD). Então, a mistura foi submetida a 960 µF e 400 V em Gene Pulser® (BIORAD). Por fim, as células foram transferidas para 10 mL de M199 para repouso de 48 horas, quando o antibiótico apropriado para cada experimento foi adicionado.

Para a obtenção de clones de parasitas, culturas selecionadas com antibiótico foram semeadas (entre 10⁴ e 10² células por placa de Petri de 9 cm de diâmetro) em M199 com 1,5% de ágar e antibiótico. Colônias isoladas foram então passadas para cultura líquida em M199 com antibiótico.

3.6. Infecções

3.6.1. Infecção de camundongos com L. (L.) amazonensis

Os camundongos foram inoculados com 10⁶ promastigotas (em fase estacionária, e previamente lavadas em PBS 1X) no coxim plantar traseiro esquerdo. O acompanhamento da resposta inflamatória ocasionada pela infecção era feito por medidas da espessura da pata esquerda e direita, realizadas com um paquímetro de espessura (Mitutoyo, modelo PK-0505), subtraindo-se a medida da pata não infectada (direita) da medida da pata infectada (esquerda).

3.6.2. Obtenção de macrófagos murinos de peritôneo

Para extração de macrófagos murinos de peritôneo, sacrificamos os camundongos em câmara de CO₂ e então a cavidade abdominal desses animais foi exposta para injetarmos 2 a 4 mL de PBS 1X no peritôneo. O lavado peritoneal foi aspirado, transferido para um tubo no gelo e centrifugado por 10 minutos a 1500 x g e 4 °C. As células coletadas foram ressuspensas em meio RPMI para a concentração de interesse.

3.6.3. Infecção *in vitro* de macrófago peritoneal ou J774 com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Inicialmente os macrófagos foram contados, conforme descrito anteriomente, para então semearmos 2 x 10⁵ células por câmara de incubação em lâminas do tipo "Chamber Slide" (Lab-Tek Chamber Slide[™], Nunc). Essas lâminas foram incubadas 18 horas a 37 °C em estufas contendo 5% de CO₂. Prosseguimos então com a infecção in vitro com promastigotas de cultura em fase estacionária, na relação de 5 ou 10 promastigotas por macrófago, durante 24 horas a 34 °C. Após as primeiras 4 horas de infecção a cultura foi lavada com PBS 1X para remoção de parasitas não fagocitados, e então a incubação prosseguia, em meio RPMI em estufa de CO₂ a 34 °C. Após as 24 horas, o conteúdo de cada câmara foi lavado duas vezes com PBS 1X. As lâminas foram fixadas com metanol absoluto, e depois de secas foram submetidas a ensaios de imunolocalização, ou coradas utilizando o kit Instant-Prov (NewProv) para contagem de amastigotas por macrófago e porcentagem de macrófagos infectados, sendo que para isso eram contados 100 macrófagos por ponto.

3.6.4. Purificação de amastigotas de patas de camundongos infectados com promastigotas

Animais infectados com promastigotas, conforme descrito no item 3.6.1, foram sacrificados assim que apresentaram lesão na pata infectada e o

tecido lesionado dessa pata foi excisado e macerado com o próprio bisturi em placa de Petri contendo PBS 1X. Essa suspensão foi centrifugada a 2500 x g, ressuspensa em PBS 1X e transferida para um homogenizador tipo "Dounce" onde os macrófagos foram pistilados 5 vezes. Com isso os macrófagos foram rompidos e as formas amastigotas liberadas. Foram feitas mais duas centrifugações dessa suspensão de células em PBS 1X, a primeira para lavar a suspensão pistilada, e a segunda a 45 x g para separar o resto do tecido do hospedeiro das formas amastigotas, que então foram recuperadas do sobrenadante.

Essa suspensão foi lavada mais uma vez em PBS 1X e colhida por centrifugação a 2200 x g, para então ser contada em câmara de Neubauer e ressuspensa no volume de interesse para ser usada em infecções *in vivo*.

3.6.5. Infecção de camundongos com amastigotas purificados de *L. (L.) amazonensis*

Os camundongos foram inoculados no coxim plantar traseiro esquerdo com 2x10⁶ amastigotas, purificados conforme descrito no item anterior. As medidas para acompanhamento da lesão foram realizadas conforme descrito na seção 3.6.1.

3.7. Imunolocalização em macrófagos infectados com *L. (L.)* amazonensis

As preparações citológicas de macrófagos infectados com leishmânias depois de fixadas, como descrito no item 3.6.3, foram bloqueadas e permeabilizadas com PBS 1X contendo 1% de BSA e 0,01% de Triton X-100 durante 1 hora. Procedeu-se à incubação, durante 1 hora a 37 °C em câmara úmida, com o primeiro soro anti-arginase (obtido em coelho, conforme descrito no item 3.3.7), em PBS 1X contendo 1% de BSA e 0,01% de Triton X-100, nas diluições apropriadas indicadas nos resultados. As lâminas foram então lavadas com PBS 1X e incubadas com o segundo anticorpo Alexa 546 anti-IgG de coelho (Invitrogen) diluído 1:50, e DAPI (Invitrogen) também

diluído 1:50 em PBS 1X, nas mesmas condições da primeira incubação. Depois de lavadas novamente, as lâminas foram montadas com Vectashield (Vector) para prolongar a reação de fluorescência.

Essas preparações foram analisadas em microscópio confocal Carl Zeiss Microlmaging, Inc. (modelo LSM510) com software versão 2.5 para Windows NT.

3.8. Microscopia eletrônica

A preparação das amostras e obtenção de imagens de microscopia eletrônica foram realizadas no departamento de Microbiologia Molecular da Washington University School of Medicine (St Louis – USA) - "The Molecular Microbiology Imaging Facility".

3.9. Determinação da concentração de óxido nítrico (NO) intracelular por microscopia confocal

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram coletadas, ressuspensas em M199 com 5 μM do indicador de NO DAF-FM (Molecular Probes, Invitrogen) e incubadas por 60 minutos no escuro. Então, 100 μL dessas células foram plaqueadas em lamínulas de vidro coladas no fundo de placas com 14 mm de diâmetro (MatTek Corporation), e foram utilizadas para medida da concentração intracelular de NO em um período de até 1 hora após o tratamento com o DAF-FM.

Foram selecionados campos representativos e o nível de fluorescência emitido por cada célula foi avaliado através do programa LSM 510 (Zeiss). Também foi avaliado o número de células fluorescentes em relação ao número total de células por campo. Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (100X), sendo utilizado um laser argônio para excitação do fluoróforo no comprimento de onda de 488 nm e um filtro para emissão em 505-530 nm.

3.10. Ligantes ddFKBP

Os ligantes do domínio ddFKBP usados foram Rapamicina e FK506 (LC Laboratories). A concentração de uso e o tempo de tratamento estão indicados no capítulo Resultados.

3.11. Citometria de Fluxo

Nos ensaios de citometria de fluxo utilizamos o citômetro FACSCalibur (BectonDickinson) do departamento de Microbiologia Molecular da Washington University School of Medicine (St Louis – USA), e as quantificações foram realizadas usando o software CellQuest (Becton-Dickinson).

4. Resultados

4.1. Caracterização da arginase de *L. (L.) amazonensis* usando soro policional anti-arginase

4.1.1. Expressão e purificação da arginase de *L. (L.) amazonensis*

Inicialmente, purificamos arginase recombinante de *L. (L.) amazonensis* para ser utilizado como antígeno na obtenção de soros policionais antiarginase de *L. (L.) amazonensis* que foram posteriormente utilizados na imunolocalização da arginase em *Leishmania*.

Para isso, utilizamos uma bactéria já existente no laboratório contendo um plasmídeo para expressão de arginase de *L. (L.) amazonensis* induzida por IPTG, *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] pRSET ARG. Essa construção expressa a proteína recombinante sem cauda de histidina, porem a própria estrutura da arginase permite que ela se ligue à coluna de níquel pelos diversos resíduos de histidina expostos (da Silva 2001; da Silva, Castilho et al. 2002; da Silva, da Silva et al. 2008).

Na figura 4, apresentamos a primeira etapa de purificação em coluna de níquel, utilizando como amostra inicial 50 mL de extrato protéico total clarificado de *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] pRSET ARG induzida (canaleta 4, Fig. 4) ou não (canaleta 2, Fig. 4) com IPTG para expressão da arginase recombinante.

As frações representadas nas canaletas 5 e 6 da figura 4 correspondem ao conteúdo que passou direto pela coluna e ao eluato da ativação com MnSO₄ 50 mM. Em seguida, as frações correspondentes à eluição com 50 a 100 mM de Imidazol (canaletas 8 a 14, Fig. 4) foram reunidas e aplicadas na coluna de DEAE-Sepharose para a segunda etapa da purificação (Fig. 5).

Podemos observar na figura 5 que a maior parte da arginase recombinante não se liga à coluna nessa etapa do processo de purificação. Nesse momento os contaminantes se ligam à coluna, e somente a partir da canaleta 14 (Fig. 5) observamos a eluição desses contaminantes, após a aplicação da solução de 100 mM de NaCl. Assim, a arginase recombinante com maior grau de pureza é coletada no inicio do processo, no "void" (fração que não se liga a coluna), representado nas canaletas 2, 3 e 4 da figura 5.



Figura 4 – Fracionamento por SDS-PAGE 10% das frações da primeira etapa de purificação de arginase recombinante, em coluna de níquel. De 1 a 4, extrato protéico de *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] pRSET ARG não induzido, insolúvel (1) e solúvel clarificado (2), e induzido para expressão de arginase com IPTG, insolúvel (3) e solúvel clarificado (4). 5, "void" (fração que não se ligou à coluna quando a amostra foi aplicada). 6, eluato da etapa de ativação, com aplicação de sulfato de manganês à coluna. 7 a 18, frações eluídas com 10 mM (7), 50 mM (8 a 11), 100 mM (12 a 14) e 200 mM (15 a 17) de Imidazol. 18, lavagem com água após a purificação. Os géis foram corados com Comassie Blue. P: PageRuler[™] Protein Ladder (SM0661) – Fermentas Life Sciences.



Figura 5 – Fracionamento por SDS-PAGE 10% das frações da segunda etapa de purificação de arginase recombinante, em coluna de DEAE-Sepharose. De 1 a 4, void. De 5 a 17, frações eluídas com 10 mM (5 e 6), 50 mM (7 a 9), 100 mM (10 a 13), 200 mM (14 e 15) e 1 M (16) de NaCl. Os géis foram corados com Comassie Blue. P: PageRuler[™] Protein Ladder (SM0661) – Fermentas Life Sciences.

4.1.2. Produção de soro policional anti-arginase de *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c e coelho

Após a purificação da arginase recombinante, essa foi utilizada como antígeno na produção de soros policionais. Para isso, selecionamos as frações representadas nas canaletas 2, 3 e 4 da figura 5, que apresentavam maior grau de pureza, e esse "pool" serviu como antígeno para imunização de camundongos e coelhos, como descrito em Material e Métodos. As primeiras amostras de soro pós-imunização foram submetidas a ensaios de "Western blot" com extrato protéico de *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] pRSET ARG induzida ou não com IPTG e extrato protéico de *L. (L.) amazonensis.* Os resultados desses experimentos estão apresentados nas figuras 6 e 7, onde podemos observar o reconhecimento de uma banda específica com peso molecular entre 31 e 45 kDa, conforme esperado dado o peso molecular da arginase, 36 kDa (da Silva 2001).



Figura 6 – "Western blot" com soro policional anti-arginase de camundongo. Extrato total de *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] pRSET ARG induzida (1) ou não (2) com IPTG para expressão da arginase recombinante, e extrato total de *L. (L.) amazonensis* (3), fracionados por SDS-PAGE 10% e transferidos para membrana. Essas membranas foram incubadas com o soro anti-arginase diluído 1:100 e reveladas com 4-cloro-1-naftol.

4.1.3. Estudos banda dupla observada no ensaio de "Western blot" com soro anti-arginase e extrato de *L. (L.) amazonensis*

Pode-se observar na canaleta 3 da figura 6 a presença de duas bandas com pesos moleculares similares. Quando obtivemos esse resultado,



Figura 7 – "Western blot" com soro policional anti-arginase de coelho. Extrato total de *L. (L.) amazonensis* fracionado por SDS-PAGE 10% e transferido para membrana. Essas membranas foram incubadas com soro pré-imunização (1) e anti-arginase (2) diluído 1:1000 e reveladas com 4-cloro-1-naftol.

levantamos a hipótese que essa banda dupla poderia ser atribuída à marcação de duas formas de arginase: ligada e não ligada a metal, uma vez que cada subunidade da enzima se liga a dois átomos de manganês em sua forma ativa. Esse tipo de comportamento foi observado previamente, por exemplo, com relação à troponina C de galinha por Reinach (Reinach e Karlsson 1988).

Usamos três estratégias para testar essa hipótese. Na figura 8 apresentamos a primeira estratégia adotada, que foi a desnaturação total do extrato de *Leishmania* adicionando 4 M de uréia ao tampão de amostra e ao gel de fracionamento. O racional que levou a essa estratégia foi que a existência das duas bandas poderia ser devida à presença de uma fração de arginase não completamente desnaturada no extrato que poderia estar retendo o metal em algum tipo de estrutura secundária e, portanto, com outro padrão de migração com relação à arginase completamente desnaturada. No entanto, essa estratégia não foi bem sucedida e as duas bandas continuaram presentes, a diferença de distância observada entre elas é simplesmente devida à diferença de migração entre os dois géis, pois o gel com uréia, mais denso, apresentou uma migração menor; isso é confirmado observando a migração do padrão de peso molecular (Fig. 8).

A segunda estratégia utilizada está apresentada na figura 9, e aqui a proposta seria tentar remover os dois átomos de manganês, ou saturar toda arginase do extrato com manganês, assim deslocando o equilíbrio para a



Figura 8 – "Western blot" com uréia. Extrato total de *L. (L.) amazonensis* em tampão de amostra com (A) ou sem (B) 4 M de uréia, fracionado por SDS-PAGE 10% com (A) ou sem (B) 4 M de uréia e transferido para membrana. As membranas foram incubadas com anti-arginase de camundongo diluído 1:100 e reveladas com 4-cloro-1-naftol.



Figura 9 – "Western blot" com EDTA e/ou MnSO₄. Extrato total de *L. (L.) amazonensis* fracionado por SDS-PAGE 10% e transferido para membrana. O extrato foi ressuspenso em coquetel de inibidores de proteases com 1 mM de MnSO₄ e 5 mM de EDTA (1), 50 mM de EDTA (2), 1 mM de MnSO₄ ou 50 mM de EDTA (3) e em coquetel de inibidores sem MnSO₄ e EDTA (4). As membranas foram incubadas com anti-arginase de camundongo diluído 1:100, e reveladas com 4-cloro-1-naftol.

presença de uma única banda sem ou com o metal. Para isso, foi adicionado ao extrato 50 mM de EDTA e/ou 1 mM de MnSO₄, alternativa já adotada com sucesso em estudos semelhantes (Simao e Gomes 2001). Novamente, essa estratégia não foi bem sucedida, pois não mudou o padrão de marcação de duas bandas observado anteriormente.

A última estratégia, apresentada na figura 10, foi elaborada a partir do observado anteriormente com relação à agmatinase (Salas, Rodriguez et al. 2002), enzima cuja seqüência de aminoácidos apresenta alta similaridade à de arginase e que também se liga a dois átomos de manganês como cofatores. No trabalho, Salas e colaboradores reduzem a atividade da agmatinase pela metade removendo parte do cofator, para isso dialisam uma

solução de agmatinase recombinante contra 10 mM de EDTA em 5 mM de Tris/HCI (pH 7,5) durante 4 horas a 4 °C. Portanto, dialisamos arginase recombinante contra 50 mM de EDTA em 5 mM de Tris/HCI (pH 7,5) durante 12 horas a 4 °C, usando condições ainda mais fortes para tentar retirar os dois átomos de manganês que poderiam estar levando ao perfil de marcação de duas bandas. No entanto, mesmo essa alternativa não mudou o padrão de marcação na faixa de peso molecular da arginase com relação à mesma arginase recombinante não dialisada, como pode ser observado na figura 10.



Figura 10 – "Western blot" com arginase recombinante de *L. (L.) amazonensis* purificada e dialisada. Arginase de *L. (L.) amazonensis* recombinante purificada (1) e arginase de *L. (L.) amazonensis* recombinante purificada e dialisada conforme descrito em Material e Métodos (2), fracionada por SDS-PAGE 10% e transferida para membrana. As membranas foram incubadas com anti-arginase de camundongo diluído 1:100, e reveladas com 4-cloro-1-naftol.

4.1.4. Imunolocalização de arginase em promastigotas de *L. (L.)* amazonensis

Após a obtenção do soro de camundongo e coelho com alta especificidade com relação à arginase de *L. (L.) amazonensis*, começamos os experimentos de imunolocalização, inicialmente em formas promastigotas.

A figura 11 mostra a marcação obtida em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após a reação de imunolocalização com soro anti-arginase de camundongo, e revela uma distribuição não homogênea da arginase pelo citoplasma nessa forma do parasita indicando que a enzima está localizada em algum compartimento celular.

Logo após a obtenção desse resultado, Roberts e colaboradores, em um estudo mostrando que o papel da arginase de *L. (L.) mexicana* está



Figura 11 – Imunofluorescência confocal de promastigotas *de L. (L.) amazonensis* imunomarcadas com soro anti-arginase de camundongo. As preparações foram incubadas com soro primário anti-arginase diluído 1:25.

relacionado ao metabolismo de poliaminas desse organismo, fizeram a localização da enzima no glicossomo (Roberts, Tancer et al. 2004). Esses autores utilizaram um mutante que expressa arginase fundida à GFP que colocalizava com hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPGP) de *L. (L.) donovani,* um marcador de glicossomo bem estabelecido (Shih, Hwang et al. 1998). Com isso, para confirmar se a arginase também está localizada no glicossomo em *L. (L.) amazonensis* adotamos uma estratégia diferente, construímos mutantes desse parasita expressando EGFP com o sinal de endereçamento para glicossomo SKL (Fung e Clayton 1991) para então verificar se a marcação observada usando o soro anti-arginase colocalizava com a emissão de fluorescência dessa proteína endereçada para glicossomo, sem modificar a sequência da arginase. Para isso transfectamos formas promastigotas com um plasmídeo pXG contendo a ORF de EGFP com o sinal SKL na terminação carboxi, ou sem esse sinal

como controle, e na figura 12 estão imagens dos mutantes obtidos após a transfecção, seleção e clonagem com essas construções.



Figura 12 – Imagens de fluorescência em microscópio confocal de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* expressando EGFP sem (A) e com (B) o sinal de endereçamento para glicossomo SKL. Barra: 10 µm.

Após confirmar que o endereçamento da EGFP, na construção utilizada para a transfecção, estava ocorrendo como esperado, prosseguimos com os experimentos de imunolocalização para verificar a colocalização da arginase com a EGFP glicossomal. As imagens obtidas estão na figura 13 e mostram a colocalização da proteína verde glicossomal com a marcação de arginase, confirmando a compartimentalização da arginase de *L. (L.) amazonensis* no glicossomo na forma promastigota desses parasitas.

Além das imagens de microscopia confocal, obtivemos imagens de microscopia eletrônica de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o soro anti-arginase, em colaboração com o Prof. Stephen Beverley da Washington University School of Medicine (St Louis – USA). Essas imagens estão apresentadas na figura 14, e reafirmam a compartimentalização da arginase muito bem delimitada em um compartimento dessas células. Não foi utilizado outro marcador de glicossomo, mas a compartimentalização definida, associada às observações de microscopia confocal permitem dizer que o compartimento observado na microscopia eletrônica deve representar

o glicossomo da célula. Também pode ser verificado que a enzima não está associada à membrana do compartimento.



Figura 13 – Imagens de microscopia confocal de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* expressando EGFP glicossomal submetidas a ensaios de imunomarcação com soro policional de camundongo anti-arginase de *L. (L.) amazonensis*. A – contraste de fase. B – EGFP glicossomal (verde) e DAPI (azul). C – arginase (vermelho) e DAPI (azul). D – colocalização de EGFP glicossomal (verde), arginase (vermelho) e DAPI (azul). Barra: 5 µm.

4.1.5. Imunolocalização de arginase em amastigotas de *L. (L.)* amazonensis durante a infecção in vitro de macrófagos J774

Seguimos com os experimentos de imunofluorescência em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* para verificar a localização da arginase na forma amastigota do parasita.

Ao realizarmos o experimento controle para avaliar o soro pré-imune de coelho, detectamos "cross-talk" nas imagens em que o material foi



Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* imunomarcadas com soro policional de coelho anti-arginase. O soro antiarginase foi utilizado na diluição 1:3000. N: núcleo. K: kinetoplasto. M: mitocôndria. As setas vermelhas apontam os glicossomos das células. Barra: 200 nm.

revelado com marcação de DAPI e Alexa 546, simultaneamente. Ou seja, o uso do laser de excitação ultravioleta (UV) além de excitar o marcador de ácidos nucléicos DAPI, como esperávamos, também excitou o anticorpo secundário Alexa 546, gerando marcação na faixa de emissão desse marcador (Fig. 15A). Na figura 15B, no entanto, quando utilizamos apenas o laser HeNe1, que excita o Alexa 546, vimos que o soro pré-imune não reconheceu nenhum material da célula hospedeira, como esperado. Dessa forma, verificamos que não poderíamos obter imagens simultâneas com marcação de DAPI e Alexa 546.

Continuamos então com os experimentos para imunolocalizar a arginase do parasita durante a infecção e, conforme podemos observar na figura 16, a marcação com o soro imune anti-arginase de coelho apresentou distribuição restrita aos parasitas ou vacúolos parasitóforos dos macrófagos



Figura 15 – Imagem de imunofluorescência confocal de macrófagos J774 não infectados. A primeira incubação foi realizada com soro pré-imune de coelho, e na segunda incubação usamos DAPI (azul, 1º quadrante) e Alexa 546 anti-IgG de coelho (Iaranja, 2º quadrante). Em cada imagem (A e B) mostramos no 3º quadrante o contraste de fase e no 4º quadrante a sobreposição dos outros quadrantes. A: laser de excitação UV ligado. B: laser de excitação UV desligado.

infectados. Na parte C da figura 16, destacamos uma célula infectada que apresenta esse padrão de marcação bastante claro e definido, coincidente com a localização dos parasitas revelada na parte B da figura 16 com a marcação de DAPI. Além disso, podemos observar que esse padrão de marcação observado nas células infectadas (A e C) não é o mesmo daquele observado nas células não infectadas (D). Quando usamos soro pré-imune (F), essa marcação não foi observada. Assim, a marcação mais intensa e compartimentalizada deve corresponder à arginase do parasita e não à arginase do macrófago, cuja expressão poderia ser induzida durante a infecção.

Além das imagens de microscopia confocal, novamente obtivemos imagens de microscopia eletrônica de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, durante a infecção de macrófagos J774, em colaboração com o Prof. Stephen Beverley da Washington University School of Medicine (St Louis – USA). Essas imagens estão apresentadas na figura 17, e indicam a manutenção da compartimentalização da arginase no glicossomo das

amastigotas com um fraco "background" no citoplasma dos macrófagos. Essa fraca marcação parece aleatória, pois é detectada no citoplasma, na mitocôndria e até no núcleo da célula hospedeira, indicando uma marcação



Figura 16 – Imagens de imunofluorescência confocal de macrófagos J774 infectados (A, B, C, E e F) ou não (D) com *L. (L.) amazonensis.* A primeira incubação foi com soro antiarginase (A a D) ou pré-imune (E e F) de coelho, e na segunda incubação usamos DAPI (azul, 1º quadrante) e Alexa 546 anti-IgG de coelho (Iaranja, 2º quadrante). B e E: laser de excitação UV ligado. A, C, D e F: laser de excitação UV desligado. As áreas destacadas em B apontam a área representada em C com maior aumento. Em cada imagem (A e B) mostramos no 3º quadrante o contraste de fase e no 4º quadrante a sobreposição dos outros quadrantes.

inespecífica. A membrana do fagolisossomos geralmente é bem próxima ao parasita, mas de qualquer forma não foi observada marcação associada ao fagolisossomo. Se a proteína é secretada para o fagolisossomo e subseqüentemente passa à célula hospedeira, os níveis podem ser muito baixos para detectarmos por imunomarcação em microscopia eletrônica com cortes histológicos de 50 nm.



Figura 17 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos J774 infectados com *L. (L.) amazonensis* submetidos à imunomarcação com soro policional de coelho anti-arginase. As preparações foram incubadas com soro primário anti-arginase diluído 1:3000. N: núcleo amastigota. NM: núcleo macrófago. ER: retículo endoplasmático. M: mitocôndria. K: kinetoplasto. As setas amarelas apontam glicossomos marcados com ouro coloidal, e as setas vermelhas apontam "background" no citoplasma do macrófago. Barra: 200 nm.
4.2. Construção de mutantes para análise funcional de arginase

4.2.1. Superexpressores de arginase

4.2.1.1. Obtenção dos mutantes

Dificuldades enfrentadas na obtenção e manutenção de mutantes com o gene de arginase nocauteado nos levaram a iniciar nossa abordagem para avaliar o papel funcional da arginase com a construção de mutantes superexpressores dessa enzima. Acrescentamos nas construções a possibilidade de adicionar ou não o sinal de endereçamento para glicossomo, o que permitiria a avaliação da importância da compatimentalização dessa proteína para executar sua função biológica durante o ciclo de vida de *Leishmania*. Para isso, usamos o vetor de expressão pXG, específico para tripanossomatídeos, cedido pelo Prof. Stephen Beverley (Ha, Schwarz et al. 1996) (Fig. 18), e então clonamos no sítio de clonagem *Bam*HI desse plasmídeo a ORF da arginase, com e sem o sinal de endereçamento para o glicossomo (SKL). Os fragmentos contendo a ORF de arginase foram obtidos por PCR utilizando os oligonucleotídeos 5L-*Bam*HI-ARG, 3L-*Bam*HI-ARG e 3L-*Bam*HI-ARGSSKL, que incluíam ou não a seqüência de endereçamento para o glicossomo.

Após a transformação de *E. coli* com essas construções, foram feitas preparações de plasmídeo em larga escala, conforme descrito em Material e Métodos. O DNA purificado foi utilizado em experimentos de transfecção em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e os mutantes foram selecionados e clonados. Das culturas dos clones selecionados extraímos DNA que foi usado como molde em reações de PCR com os oligonucleotídeos seqpX5s e seqpX3AS (Fig. 18). Cada produto dessas reações foi então seqüenciado confirmando que os plasmídeos continham a seqüência de nucleotídeos correta, e mais importante, que a seqüência de nucleotídeos responsável pelo endereçamento ao glicossomo não estava presente nos parasitas superexpressores de arginase sem sinal de endereçamento para glicossomo, e estava presente naquelas em que o endereçamento era mantido (Fig. 19).



Figura 18 – Esquema do vetor pXG usado como base na construção dos vetores para a superexpressão de arginase. O sitio de clonagem é flanqueado pelas regiões 5'DST e 6.2-1 que são seqüências de regiões intergênicas de *Leishmania* contendo sinais para *trans*-splicing e poliadenilação. Também aparecem em destaque por setas indicando o sentido de transcrição, as seqüências dos genes que conferem resistência a ampicilina e a neomicina. As setas em azul representam os oligonucleotídeos seqpX5s e seqpX3AS que flanqueiam o sítio de clonagem.



Figura 19 – Alinhamento de trechos do seqüenciamento de DNA dos parasitas superexpressores, incluindo as seqüências preditas para essas construções e a fase aberta de leitura da arginase com e sem o sinal de endereçamento SKL (ORF ARG e ORF ARGsSKL). Seqüências referentes aos parasitas superexpressores de arginase com sinal SKL (pXGARG) e sem esse sinal (pXGARGsemSKL). A, destaca região amplificada com oligonucleotídeo seqpX5S. B, destaca região amplificada com oligonucleotídeo seqpX3AS.

4.2.1.2. Análise funcional dos mutantes superexpressores de arginase – transcrição, tradução e atividade enzimática

Após a confirmação de que os mutantes selecionados carregavam os epissomos corretos, iniciamos sua caracterização funcional. A fim de confirmar a superexpressão, foi feita a quantificação por transcrição reversa seguida de PCR em tempo real do transcrito de arginase, com os oligonucleotídeos ARG-SC e ARG-22, e do transcrito de G6PD, com os oligonucleotídeos G6PD-LLF e G6PD-LLR (Fig. 20).

Para cada amostra, o número de cópias da molécula alvo foi calculado por comparação com a curva obtida a partir de um molde constituído pelo respectivo produto de PCR clonado. As reações com o número de moléculas conhecido passaram pelas mesmas condições de PCR permitindo o estabelecimento das curvas padrão. Ilustramos na figura 20 as curvas utilizadas (Fig. 20, A) para a construção da curva padrão de arginase (Fig. 20, B) e as curvas experimentais (Fig. 20, C) obtidas para o mesmo gene que nos permitiram calcular o número de cópias de mRNA de arginase. O mesmo procedimento foi realizado com relação ao gene G6PD, que apresenta expressão constante durante as fases do ciclo de vida da *L. (L.) amazonensis* (Castilho, Shaw et al. 2003) e assim pode ser utilizado como normalizador.

Assim, o número de cópias de mRNA de arginase e de G6PD calculado para cada amostra está apresentado na tabela II. Podemos observar nessa tabela, considerando o número de cópias normalizado, que a expressão de mRNA de arginase na cultura superexpressora de arginase com sinal de endereçamento aumentou quase 15 vezes com relação a cultura controle (pXG – parasitas transfectados com o vetor sem inserto). Já a cultura superexpressora de arginase sem sinal de endereçamento SKL apresentou um aumento menor, de quase 9 vezes.

54



Figura 20 – PCR em tempo real das culturas superexpressoras de arginase com e sem sinal de endereçamento para glicossomo. A, Curvas de PCR em tempo real de 10, 10³, 10⁵ e 1⁰⁷ moléculas do produto do PCR clonado do DNA de *L. (L.) amazonensis* com os oligonucleotídeos ARG-SC e ARG-22. B, Curva padrão obtida utilizando as curvas da parte A da figura. C, Curvas de PCR em tempo real para quantificação do nível de transcrito do mRNA de arginase com os oligonucleotídeos ARG-SC, ARG-22 utilizando cDNA das culturas superexpressoras de arginase.

Tabela II – Resultados da quantificação por transcrição reversa seguida por PCR em tempo real do número de cópias de mRNA de arginase e G6PD. Quantificação feita a partir de 100 ng de RNA total extraído das culturas de *L. (L.) amazonensis* controle (pXG), superexpressoras de arginase com SKL (pXG_ARG) e sem SKL (pXG_ARGΔSKL).

	ARG	G6PD	ARG/G6PD
рХG	1113029,96	1071,26	1038,99
pXG_ARG	27560566,30	1821,82	15128,08
pXG_ARG∆SKL	12306808,68	1324,76	9289,82

Após avaliar a transcrição de arginase, iniciamos a análise da expressão protéica desses parasitas realizando ensaios de "Western blot" com os extratos protéicos de *L. (L.) amazonensis* selvagem e de cada mutante: controle (pXG), superexpressor de arginase (pXG_ARG) e superexpressor de arginase sem sinal de endereçamento para glicossomo (pXG_ARGΔSKL) (Fig. 21).



Figura 21 – "Western blot" superexpressores. Nesse experimento utilizamos 2,6 µg de extrato proteíco total de: *L. (L.) amazonensis* selvagem (1 e 2), *L. (L.) amazonensis* transfectado com pXG (3), *L (L.) amazonensis* superexpressor de arginase com (4) e sem (5) sinal de endereçamento para glicossomo. As membranas foram incubadas primeiramente com soro pré-imune de coelho (1) e soro anti-arginase de coelho diluídos 1:1000 em PBS (2 a 5). Em seguida, as membranas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, e reveladas com 4-cloro-1-naftol.

Analisando esses resultados, verificamos que o extrato de parasitas superexpressores de arginase com SKL (canaleta 4, Fig. 21) apresenta um aumento de 3,36 vezes da marcação relativa a arginase com relação ao controle não superexpressor (canaleta 3, Fig. 21). Já os parasitas superexpressores de arginase sem SKL não apresentam esse aumento, inclusive apresentando uma discreta diminuição de 0,63 vezes na intensidade da marcação com relação ao controle pXG.

Em seguida realizamos os ensaios de atividade enzimática de arginase pela produção de uréia com os mesmos extratos usados no experimento de "Western blot". Os resultados desse experimento estão apresentados na figura 22 e revelam que o extrato protéico da amostra pXG_ARG apresenta quase o dobro da atividade enzimática observada com o controle. Enquanto isso, o extrato relativo à amostra pXG_ARGASKL não apresenta aumento da atividade enzimática com relação ao controle, inclusive apresentando uma discreta diminuição da atividade em relação ao controle, coerente com observado no ensaio de "Western blot" (Fig. 21).



Figura 22 – Gráfico comparativo da atividade enzimática de arginase dos superexpressores. Atividade de arginase (nmol de uréia/min) de 6 μg dos extratos proteícos das culturas: pXG_ARG, *L. (L.) amazonensis* superexpressor de arginase com o sinal de endereçamento para glicossomo; pXG_ARGΔSKL, *L. (L.) amazonensis* superexpressor de arginase sem o sinal de endereçamento para glicossomo; pXG, *L. (L.) amazonensis* controle transfectado com pXG. Experimento representativo realizado em triplicata.

4.2.1.3. Imunolocalização de arginase nos mutantes superexpressores

Para verificar se o endereçamento desenhado para os mutantes realmente refletia a localização sub-celular da enzima superexpressa, de imunofluorescência realizamos ensaios com essas células superexpressoras. Os resultados apresentados na figura 23 indicam que o marcação não variou entre os padrão de mutantes pXG ARG, superexpressor de arginase com SKL, pXG ARGASKL, superexpressor de arginase sem SKL, e o controle pXG. Em todos os ensaios observamos marcação compartimentalizada equivalente à localização da arginase nativa.



Figura 23 – Imagens de imunofluorescência confocal dos mutantes superexpressores. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas com pXG, pXG_ARG e pXG_ARGΔSKL. As lâminas foram submetidas a ensaios de imunofluorescência conforme descrito em Material e Métodos. A primeira incubação foi com soro anti-arginase e na segunda incubação usamos Alexa 488 anti-IgG de camundongo (verde) e DAPI (azul). Barra: 10 μm.

4.2.1.4. Secreção de arginase pelos parasitas superexpressores

Observando principalmente os resultados do ensaio de "Western blot" dos extratos dos superexpressores (Fig. 21), e a diferença entre o conteúdo protéico e a atividade enzimática, de ambos mutantes, postulamos que a arginase poderia estar sendo secretada pelo parasita.

Para testar essa hipótese, realizamos ensaios de "Western blot" e atividade enzimática de arginase usando 5 mL do meio de cultura em que

esses mutantes haviam atingido a fase estacionária de crescimento. O meio foi filtrado com filtro de seringa de 0,22 µM e concentrado com o sistema de ultrafiltração AmiconUltra 4 com poro de 10.000 NMWL (Millipore). Porém, nenhum dos ensaios indicou a presença da enzima no meio de cultura indicando que não deve haver secreção da arginase pelo parasita (resultados não apresentados).

4.2.1.5. Análise funcional dos mutantes superexpressores – curva de crescimento e infectividade

Seguindo nossos objetivos, iniciamos os experimentos para avaliar o impacto da superexpressão de arginase no crescimento celular desses mutantes (Fig. 24). Curiosamente, esse experimento mostrou que a cultura de parasitas superexpressoras de arginase com sinal de endereçamento (pXG_ARG) atinge a fase estacionária com uma concentração celular menor. Na mesma figura nota-se que a falta do sinal não implica em mudança de comportamento de crescimento do mutante, seguindo o que ocorre com a cultura controle.



Figura 24 – Curvas de crescimento dos superexpressores. Culturas de 10 mL do controle, *L.* (*L.*) amazonensis transfectado com pXG (pXG), e superexpressores de arginase com (pXG_ARG) e sem sinal de endereçamento para glicossomo SKL (pXG_ARGΔSKL). Cada ponto representa 3 contagens independentes.

Seguimos então com os experimentos para avaliar a infectividade desses mutantes. Para isso realizamos infecções *in vivo* usando promastigotas provenientes da fase estacionária de crescimento, conforme descrito no capítulo Material e Métodos. Na figura 25, apresentamos os resultados de dois experimentos independentes de infecção *in vivo* em



Figura 25 – Evolução da infecção de camundongos BALB/c com os parasitas superexpressores. Camundongos BALB/c foram infectados com 10⁶ promastigotas, de fase estacionária, de *L. (L.) amazonensis* controle (pXG), e superexpressores de arginase com (pXG_ARG) e sem sinal de endereçamento para glicossomo (pXG_ARGΔSKL). Os eixos das ordenadas (E-D) representam os valores das diferenças de diâmetro (mm) da pata infectada para a pata controle traseira, e os eixos das abscissas representam o tempo de infecção, em dias. Cada ponto consiste em um grupo de três ou quatro machos. A e B são relativos a dois experimentos independentes.

camundongos BALB/c. Esses resultados mostraram que os promastigotas da cultura pXG_ARG∆SKL provocaram um desenvolvimento da resposta inflamatória maior do que a observada com os da cultura pXG_ARG que apresentou o mesmo padrão de desenvolvimento da lesão que a cultura controle (pXG).

Para melhor entender a relação entre a arginase e a infectividade, resolvemos avaliar a quantidade de parasitas infectivos na cultura em fase estacionária que foi usada nas infecções, de modo a normalizar o número de parasitas infectivos de cada experimento, supondo que a alteração de expressão da arginase pudesse alterar a metaciclogênese, uma vez que a enzima está relacionada à multiplicação do parasita, e a diferenciação implica em parada de divisão celular (Shapiro, Naessens et al. 1984). Para isso realizamos experimentos para verificar a quantidade de metacíclicos presentes nessas culturas. Esses experimentos consistem de um ensaio de PCR em tempo real com os oligonucleotídeos 10 e 11, para Meta-1, e G6PD-LLF e G6PD-LLR, para G6PD, que permitem o cálculo do número de cópias de mRNA desses, como descrito na seção 4.2.1.2. Os oligonucleotídeos 10 e 11 amplificam um segmento da região transcrita do gene de META-1, gene expresso na forma metacíclica (Nourbakhsh, Uliana et al. 1996), permitindo a comparação da quantidade de metacíclicos das diferentes culturas quando normalizado por G6PD. Os resultados desse experimento estão na Tabela III.

Tabela III – Resultados da quantificação por transcrição reversa seguida por PCR em tempo real do número de cópias de mRNA de META-1 e G6PD. Quantificação em 100 ng de RNA total extraído das culturas de *L. (L.) amazonensis* controle (pXG), superexpressores de arginase com o sinal SKL (pXG_ARG) e sem o sinal SKL (pXG_ARGΔSKL).

	META-1	G6PD	META-1/G6PD
рХG	11724,38	795,56	14,74
pXG_ARG	30301,67	620,87	48,81
pXG_ARG∆SKL	201614,37	3281,02	61,45

De acordo com os resultados da tabela III, a cultura pXG_ARG∆SKL apresenta maior número de formas metacíclicas do que as culturas controle (pXG) e pXG_ARG, sendo que essa última teria mais formas metacíclicas que o controle, mas menos que a primeira, superexpressora de arginase sem sinal de endereçamento.

Com esses dados fizemos a normalização do resultado da infecção apresentado na figura 25 pela quantidade de parasitas metacíclicos, uma vez que o número de células usado para o inóculo inicial na infecção do camundongo não considera a porcentagem de formas infectivas metacíclicas. Para isso, assumimos que existe uma relação linear entre a expressão de mRNA de META-1 na cultura de promastigotas e o tamanho da lesão formada na pata dos camundongos; essa premissa pode não ser verdadeira e está sendo verificada no laboratório, mas permite simular a infecção supondo o mesmo número de formas infectantes e assim comparar o comportamento das diferentes culturas normalizando essa variável.

Dessa forma, na figura 26, apresentamos o gráfico com a evolução da lesão causada pela infecção dos diferentes parasitas, normalizando os dados da infecção apresentada na parte A da figura 25 com relação à quantidade de metacíclicos de acordo com o experimento de PCR em tempo real de META-1 (Tabela III).

A análise da figura 26 indica que as culturas superexpressoras de arginase (com ou sem sinal de endereçamento) seriam menos infectivas que a cultura de parasitas controle, transfectada com pXG, ou seja, a superexpressão de arginase estaria provocando uma diminuição na capacidade infectiva dessas células mutantes.

Então, para contornar a questão da infectividade desses mutantes, sem a dúvida quanto à relação linear entre a expressão de META-1 e o tamanho da lesão, infectamos camundongos diretamente com amastigotas purificados. Assim avaliamos o poder infectivo desses diferentes mutantes independentemente da metaciclogênese. Os resultados dessas infecções com amastigotas purificados estão apresentados na figura 27, indicando que de fato os parasitas superexpressores apresentam uma infectividade menor do que o controle (pXG), conforme previamente observado na figura 26.

62



Figura 26 – Evolução da infecção de camundongos BALB/c com os parasitas superexpressores, normalizada pela proporção de metacíclicos inoculados. Camundongos BALB/c foram infectados com 10⁶ promastigotas, de fase estacionária, de *L. (L.) amazonensis* controle (pXG), e superexpressores de arginase com (pXG_ARG) e sem sinal de endereçamento para glicossomo (pXG_ARGΔSKL). O eixo das ordenadas (E-D) representa os valores das diferenças de espessura (mm) da pata infectada para a pata controle traseira, e o eixo das abscissas representa o tempo de infecção em dias. Cada ponto consiste em um grupo de três ou quatro machos, e as medidas estão normalizadas com relação ao número de metacíclicos presentes nas culturas utilizadas para a infecção.

4.2.1.6. Produção de NO pelos parasitas superexpressores

Outra abordagem proposta para entender melhor a questão da infectividade dos diferentes superexpressores, foi comparar a produção de NO por esses parasitas, lembrando que há uma correlação entre a produção de NO pela cNOS de *Leishmania* e a presença de formas metacíclicas em isolados do parasita (Genestra, de Souza et al. 2003).

Nesse sentido, fizemos marcações com DAF-FM em promastigotas de fase estacionária (maior concentração de metacíclicos) dos três mutantes em questão, lembrando que o composto DAF-FM fluoresce na presença de NO. As observações desses parasitas por microscopia confocal (Fig. 28) revelaram que a produção de NO não ocorre de forma gradual, mas sim como um padrão de resposta "tudo ou nada", ou seja, as células estão ou



Figura 27 – Evolução da infecção de camundongos BALB/c com formas amastigotas dos parasitas superexpressores. Os camundongos BALB/c foram infectados com 2*10⁶ amastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas com pXG sem inserto (pXG), e superexpressores de arginase com (pXG_ARG) e sem (pXG_ARGΔSKL) sinal de endereçamento para glicossomo. PBS: controle em que inoculamos somente tampão fosfato (PBS), o mesmo volume usado para o inóculo de amastigotas. Negativo: controle em que inoculamos um extrato de pata de camundongo não infectada preparado de acordo com o método de purificação de amastigotas de patas infectadas. O eixo das ordenadas (mm) representa os valores das diferenças de diâmetro em mm da pata infectada para a pata controle traseira, e o eixo das abscissas representa o tempo de infecção em dias. Cada ponto consiste em um grupo de pelo menos três camundongos machos.

não estão produzindo NO. Assim, a avaliação da fluorescência de cada célula não é significativa para o nosso objetivo, pois não existe uma diferença entre as células quanto à intensidade de fluorescência emitida.

Portanto, entendemos que o dado mais informativo para os nossos objetivos seria determinar o número de células fluorescentes em relação ao total de células avaliadas. Os resultados dessa quantificação indicam que as culturas de parasitas superexpressores estão produzindo menos NO que o controle transfectado com pXG, no entanto, esses resultados não foram conclusivos pois apresentavam uma variação muito grande, o que gerava uma barra de erros maior do que o intervalo de dados (resultados não apresentados). Essa variação é explicada pela necessidade de realizar essa marcação com as células vivas, o que implica em movimentação ativa costante, dificultando a contagem.



Figura 28 – Imagens de microscopia confocal de formas promastigotas, em fase estacionária, dos parasitas superexpressores submetidos à marcação com DAF-FM. Células da cultura pXG (A), pXG_ARG (B) e pXG_ARGΔSKL(C), tratadas com DAF-FM, conforme descrito no capítulo Material e Métodos. O quadrante superior das imagens mostra a fluorescência emitida pelo marcador e o inferior a sobreposição da fluorescência com o contraste de fase. As setas estão destacando as células com fluorescência.

4.2.2. Nocaute funcional regulável de arginase em L. (L.) amazonensis

4.2.2.1. Obtenção de mutantes com um alelo de arginase nocauteado

Para nocautear um alelo do gene da arginase por recombinação homóloga, construímos um cassete em pUC19 que consiste da região 5' e 3'UTR da arginase flanqueando a marca de seleção, proveniente essa do vetor pXGHyg. Na figura 29 temos o esquema para obtenção dessa molécula.

Inicialmente, amplificamos as regiões 5' e 3' UTR da arginase (5'UTR ARG e 3'UTR ARG, respectivamente) com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição que possibilitariam a clonagem em pUC19: ARG5's, ARG5'as, ARG3's e ARG3'as. Em seguida, amplificamos a partir de pXGHyg, o gene que confere resistência à higromicina mais a região a 5⁻ da ORF desse gene, contendo os elementos de regulação da expressão de DHFR. Para isso utilizamos os oligonucleotídeos DHFRs2 e ORFas2 que geram um fragmento com os sítios para clonagem entre a região 5⁻ e 3⁻UTR ARG, previamente clonados em pUC19 (Fig. 29).

Todos os fragmentos amplificados foram clonados em pGEM T easy e eluídos após digestão com as seguintes enzimas de restrição: *Eco*RI e *Kpn*I (5´UTR ARG), *Xba*I e *Pst*I (3´UTR ARG), *Kpn*I e *Xba*I (5´DHFR_ORF Higro). Então, digerimos o vetor pUC19 com *Eco*RI e *Kpn*I para ligarmos o fragmento previamente obtido 5´UTR ARG. O produto dessa ligação foi novamente digerido, agora com *Xba*I e *Pst*I, para clonarmos o fragmento 3´UTR ARG. Em seguida, esse vetor, com os fragmentos 5´ e 3´UTR ARG, foi digerido com *Kpn*I e *Xba*I para finalmente clonarmos o cassete de resistência a



Figura 29 – Esquema da estratégia utilizada para obtenção da construção 5'AHyg3'A em pUC19. As setas em preto representam os oligonucleotideos utilizados para amplificar as regiões delimitadas por esses a partir de DNAg de *L. (L.) amazonensis* e DNA de pXGHyg, esses oligonucleotídeos são: ARG5's (1), ARG5'as (2), ARG3's (3), ARG3'as (4), DHFRs2 (5) e ORFHygas2 (6). Os produtos dessas amplificações foram ligados em pUC19 gerando a construção final.

higromicina, 5´DHFR_ORF Higro, e assim obtermos a construção final, conforme esquematizado na figura 29.

Após confirmar por seqüenciamento que a construção estava correta, o plasmídeo foi linearizado e utilizado em reações de PCR com os oligonucleotídeos M13F e M13R, que flanqueiam o cassete 5'AHyg3'A inserido no plasmídeo. Esse produto linear amplificado foi então utilizado em experimentos de transfecção em promastigotas de *L. (L.) amazonensis,* conforme descrito em Material e Métodos. Os parasitas transfectados foram selecionados, clonados e utilizados para extração de DNA, que serviu de molde em reações de PCR que nos permitiram verificar se a integração havia ocorrido como previsto.

4.2.2.2. Análise dos mutantes com um dos alelos de arginase nocauteado – integração do cassete de resistência

Na figura 30, apresentamos o esquema das reações de PCR realizadas para verificar a integração do cassete de resistência a higromicina no locus da arginase, e a eletroforese dos produtos obtidos nessas reações. Conforme esquematizado na parte A da figura, se a integração ocorresse conforme o esperado, deveríamos observar bandas de aproximadamente 2100 pb, quando utilizamos os pares de oligonucleotídeos ARG_5UTRs + pHygAS ou ARG_3UTRasII + pHygAS, e bandas de aproximadamente 1000 pb com os oligonucleotídeos pHygS + pHygAS. Portanto, de acordo com a eletroforese mostrada na parte B da figura, podemos afirmar que a integração ocorreu nos clones a e b, no locus alvo, gerando um fragmento de PCR do tamanho esperado. Vale ressaltar que no controle no qual utilizamos como molde DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* selvagem não há nenhum produto amplificado, conforme podemos confirmar observando as canaletas 7 e 8 na parte B da figura 30.

Após a confirmação por PCR de que o nocaute de um dos alelos da arginase havia ocorrido conforme previsto, realizamos um ensaio de PCR em tempo real usando DNA genômico extraído desses parasitas para verificar o número de cópias do gene de arginase nesses mutantes. Para isso, utilizamos os seguintes pares de oligonucleotídeos: ARG-SC e ARG-22 para amplificar arginase, e PSSRealS e FOSFM3AS para amplificar PSSII, gene que codifica fosfatidilserina sintetese II que utiliza fosfatidiletanolamina e serina para produzir fosfatilserina e etanolamina (Kuge e Nishijima 1997).

O número de cópias da molécula alvo de cada amostra foi calculado por comparação com a curva obtida a partir de um número de moléculas conhecido, da mesma maneira descrita na seção 4.2.1.2. Na figura 31 apresentamos, para cada mutante, o número de cópias de arginase calculado, normalizado por PSSII, pois sabemos que esse está presente em uma cópia no genoma haplóide de *Leishmania* (Ivens, Peacock et al. 2005).



Figura 30 – PCRs para verificar o nocaute de um dos alelos de arginase. A, Esquema com os oligonucleotídeos utilizados ARG_5UTRs (A), ARG_3UTRasII (B), pHygS (C) e pHygAS (D), e tamanhos aproximados dos produtos esperados no caso da integração correta do cassete de resistência a higromicina no locus da arginase. B, Imagem da eletroforese dos produtos de PCR utilizando como DNA molde DNAg de dois clones obtidos após transfecção com a construção para o nocaute, clone a (1/2/3) e clone b (4/5/6), e DNAg de *L. (L.) amazonensis* (7/8). Os pares de oligonucleotídeos utilizados nessas reações foram: A+D (1/4/7), C+B (2/5) e C+D (3/6/8). P: GeneRuler[™] DNA Ladder Mix, Fermentas.

Assim, podemos observar na figura 31 que o clone p5AHyg3A b apresenta aproximadamente metade do número de cópias de arginase do parasita selvagem, conforme esperávamos para o mutante heterozigoto, com um dos alelos da arginase nocauteado. Já o mutante a, não apresenta uma diferença significativa do número de cópias de arginase com relação ao controle selvagem.



Figura 31 – Gráfico representando o número de cópias de arginase normalizado pelo número de cópias de PSSII. Número de cópias calculado conforme descrito na seção 3.2.1.2 por PCR em tempo real utilizando como molde 50 ng de DNAg de *L. (L.) amazonensis* selvagem (La WT), e de dois clones transfectados com a construção para nocaute de arginase (p5AHyg3A a e b), e os pares de oligonucleotídeos usados foram: ARG-SC + ARG-22, e PSSRealS + FOSFM3AS.

4.2.2.3. Análise funcional dos mutantes com um dos alelos de arginase nocauteado – tradução e atividade enzimática de arginase

Iniciamos então os experimentos para avaliar a expressão protéica desses parasitas realizando ensaios de "Western blot" com os extratos protéicos de *L. (L.) amazonensis* selvagem e de cada um dos mutantes heterozigotos: p5AHyg3A a e b. Os resultados desse experimento estão

apresentados na figura 32 e revelam que o clone b (canaleta 3) apresenta a marcação 0,58 vezes menor do que a do controle (canaleta 1), enquanto o clone a não apresenta uma diferença significativa com relação ao controle, de acordo com o observado no experimento de PCR em tempo real para o cálculo do número de cópias de arginase (Fig. 31).



Figura 32 – "Western blot" parasitas heterozigotos, com um alelo de arginase nocauteado. Nesse ensaio utilizamos 8 µg de extrato proteíco total de: *L. (L.) amazonensis* selvagem (1), heterozigoto p5AHyg3A a (2) e b (3). As membranas foram incubadas primeiramente com soro anti-arginase de coelho diluídos 1:100 em PBS. Em seguida, as membranas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, e reveladas com 4-cloro-1-naftol.

Em seguida, realizamos os ensaios de atividade enzimática de arginase (produção de uréia) com o extrato protéico do clone p5AHyg3A b, que nos ensaios anteriores gerou resultados indicando o nocaute de um alelo da arginase, e o controle selvagem. Os resultados desse experimento estão apresentados na figura 33 e, de acordo com o observado anteriormente no ensaio de PCR em tempo real (Fig. 31) e "Western blot" (Fig. 32), o clone b apresentou atividade enzimática de arginase menor que o controle, 1, 61 e 2,18 nmol de uréia/min, respectivamente, confirmando que de fato há menos proteína ativa, o que corrobora com a obtenção do nocaute heterozigoto.

4.2.2.4. "Knock-in" do cassete ddFKBP-ARG nos parasitas *L. (L.) amazonensis* com um alelo da arginase nocauteado

Após confirmar a obtenção de parasitas com um alelo de arginase nocauteado Δ*arg*::*HYG*/*ARG* (p5AHyg3A b), esses foram transfectados com



Figura 33 – Atividade enzimática de arginase nos parasitas heterozigotos, com um alelo da arginase nocauteado. Gráfico da produção de uréia por minuto de 6 µg de extrato proteíco de *L. (L.) amazonensis* selvagem (La WT) e nocaute heterozigoto (p5AHyg3A b). O erro representa os desvios padrão de triplicatas de um experimento representativo. As equações representam a regressão linear da linha de tendência das amostras selvagem (azul) e heterozigoto (verde).

uma segunda construção para gerar parasitas que funcionariam como um nocaute funcional regulável de arginase. A idéia era gerar um "knock-in" no outro alelo do gene da arginase, substituindo a ORF desse gene por um cassete contendo o segmento ddFKBP-ARG. Esse segmento quando transcrito e traduzido geraria a arginase fundida a um domínio (ddFKBP) que, na ausência de ligantes específicos (Shld-1, FK506 ou Rapamicina), levariam a degradação da proteína, enquanto a presença dos ligantes conferiria estabilidade a proteína fundida (Banaszynski, 2006; Madeira, 2009).

Inicialmente, para obter essa construção contendo o domínio ddFKBP seguido pela seqüência referente à arginase, utilizamos como base o plasmídeo B6323 (Fig. 34), cedido pelo Prof. Stephen Beverley (Madeira da Silva, Owens et al. 2009), e um intermediário da construção do nocaute heterozigoto contendo a região 5´ e 3´ UTR da arginase em pUC19 (p5A3A) obtido anteriormente, conforme descrito na seção 4.2.2.1. Para isso, conforme esquematizado na figura 35, amplificamos o segmento do plasmídeo B6323 contendo o gene que confere resistência à fleomicina, a



Figura 34 – Esquema do plasmídeo B6323. A figura destaca o gene que confere resistência à fleomicina, Phleo R; região intergênica DST, DST IR; o domínio de degradação ddFKBP. As setas verdes representam os oligonucleotídeos PhleoKpnl_S e ddSpelXbal_AS.

região intergênica DST e o domínio ddFKBP, utilizando os oligonucleotídeos Phleo*Kpnl_*S e dd*SpelXbal_*AS (Fig. 34). Essa reação gerou um fragmento com os sítios de restrição *Kpn*l e *Xba*l para clonagem em p5A3A, mas inicialmente clonamos esse fragmento em pGEM T easy e então eluímos o fragmento após digestão com *Kpn*l e *Xba*l para cloná-lo no p5A3A previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando o cassete 5APhleodd3A em pUC19 (Figura 35).

O passo seguinte foi a amplificação da ORF de arginase com os sítios de clonagem *Spe*l a 5' e *Xba*l a 3', com os oligonucleotídeos ARGs Spel, ARGas *Xba*l e ARGΔSKLas *Xba*l, sendo que esse último foi usado para a obtenção da ORF sem o sinal de endereçamento para o glicossomo, novamente na tentativa de verificar a importância da compatimentalização dessa proteína durante o ciclo de vida de *Leishmania*. Portanto, a ORF da arginase, amplificada com esses pares oligonucleotídeos, foi clonada em pGEM T easy e eluida após a digestão com *Spe*l e *Xba*l, e então os fragmentos purificados foram clonados em p5APhleodd3A digerido previamente com as mesmas enzimas, gerando o cassete final p5APhleoddARG3A e p5APhleoddARGΔSKL3A.



Figura 35 – Esquema da estratégia utilizada para obtenção da construção p5APhleodd3A. As setas em preto representam os oligonucleotídeos utilizados para amplificar a regiões delimitadas por esses a partir do plasmídeo B6323, esses oligonucleotídeos são: Phleo*Kpn*I S (1) e dd*SpelXba*I AS (2). O produto dessa amplificação foi ligado em p5A3A, obtido previamente, gerando o vetor p5APhleodd3A com o sítio de clonagem *Spe*I na extremidade 3' do domínio ddFKBP, antes do sítio de restrição *Xba*I utilizado na ligação em p5A3A.

Após confirmar por següenciamento que a construção estava correta, a construção final foi linearizada e utilizada em reações de PCR com os oligonucleotídeos M13F е M13R, flanqueiam que 0 cassete 5APhleoddARG3A e 5APhleoddARGASKL3A inserido no plasmídeo. Esse produto linear amplificado foi então utilizado em ensaio de transfecção com promastigotas de L. (L.) amazonensis nocaute de um alelo do gene da arginase previamente obtidos (seção 4.2.2.1). Os parasitas transfectados foram selecionados e clonados, na presenca de 50 µM de putrescina, produto da via metabólica da arginase para suplementar o produto essencial na ausência da enzima, o que pode ser letal para o parasita (Roberts, Tancer et al. 2004). Essas células foram então utilizadas em ensaios de extração de DNA que serviu como molde em reações de PCR que nos permitiram verificar se o "knock-in" havia ocorrido como previsto, conforme descrito no item seguinte.

4.2.2.5. Análise de *L. (L.) amazonensis* nocaute funcional regulável de arginase – integração do cassete de resistência

Na figura 36, apresentamos o esquema das reações de PCR realizadas para verificar a integração da construção contendo o segmento ddFKBP-ARG, е а eletroforese dos produtos obtidos. Conforme esquematizado na parte A dessa figura, se a integração ocorresse conforme o esperado, observaríamos bandas de aproximadamente 1100 pb utilizando os oligonucleotídeos ARG 5UTRs e SMB2564, e duas bandas de aproximadamente 4570 e 2800 pb com os oligonucleotídeos ARG 5UTRs e ARG 3UTRasII, relativas ao alelo com o "knock-in" e o nocauteado, respectivamente. Dessa forma, de acordo com a primeira eletroforese mostrada na parte B da figura 36 (1+3), podemos afirmar que a integração do segmento contendo o gene de resistência à fleomicina ocorreu nos quatro



Figura 36 - PCRs para verificar integração do cassete contendo o segmento ddFKBP-ARG em um dos alelos de arginase. A) Esquema com os oligonucleotídeos utilizados ARG_5UTRs (1), ARG_3UTRasII (2) e SMB2564 (3), e tamanhos aproximados dos produtos esperados no caso da integração correta do cassete PhleoddARG no locus da arginase. B) Eletroforeses dos produtos de PCR utilizando como DNA molde DNAg de quatro clones obtidos com a transfecção da construção para o "knock-in" (canaletas 3 a 6), DNAg de *L. (L.) amazonensis* selvagem (canaleta 1), ou água (canaleta 2). Os pares de oligonucleotídeos utilizados nessas reações foram 1 e 3 (1+3), 1 e 2 (1+2). P: GeneRulerTM DNA Ladder Mix, Fermentas.

clones, no locus esperado gerando o fragmento de tamanho esperado. No entanto, quando tentamos amplificar o locus de integração inteiro (oligos 1+2, parte B, Fig. 36) esperávamos duas bandas (4570 pb e 2800 pb), e só conseguimos uma entre 2500 e 3000 pb, que pode ser relativa tanto ao alelo nocauteado (2800 pb) como ao selvagem (2700 pb), caso a recombinação não tenha ocorrido como o esperado, e a banda esperada de 4570 pb pode não ter sido amplificada simplesmente por ser muito maior, e a reação ter favorecido a amplificação dos produtos menores.

Para esclarecer se a banda amplificada utilizando os oligonucleotídeos ARG_5UTRs (1) e ARG_3UTRasII (2) (Fig. 36) era relativa ao alelo nocauteado ou selvagem, realizamos algumas digestões desses produtos com enzimas de restrição que permitiriam fazer essa distinção (Fig. 37). Na parte A da figura 37 mostramos os sítios das enzimas de restrição utilizadas, no alelo selvagem e nocauteado, e na parte B está a eletroforese dos produtos dessas digestões.

Podemos observar na parte A da figura 37 que a enzima *Xho*I só cliva o produto amplificado a partir do alelo selvagem, gerando fragmentos de 1580 e 1105 pb, e *Bam*HI só cliva o produto amplificado a partir do alelo nocauteado, gerando fragmentos de 2007 e 790 pb. Logo, analisando a eletroforese da parte B dessa mesma figura, concluímos que os clones 1, 3 e 4 dos parasitas não possuem o alelo selvagem pois não ocorreu digestão com *Xho*I, e possuem o alelo nocauteado, pois a digestão com *Bam*HI desse amplicon desses clones gerou fragmentos de aproximadamente 800 e 2000 pb.

O passo seguinte então foi confirmar a integração da extremidade da construção contendo o segmento ddFKBP-ARG. Para isso realizamos mais duas reações de PCR mostradas na figura 38. Na parte A dessa figura podemos observar o esquema do alelo com a integração esperada, os oligonucleotídeos utilizados e os tamanhos esperados para o produto da amplificação com esses. Dessa forma, se a integração ocorresse conforme o esperado, observaríamos bandas de aproximadamente 1145 pb utilizando os pares de oligonucleotídeos dd3Lsense e ARGas*Xba*l, e bandas de aproximadamente 1845 pb com os oligonucleotídeos dd3Lsense e

75

ARG_3UTRasII. Logo, de acordo com a eletroforese mostrada na parte B da figura, confirmamos que a integração do segmento contendo o domínio ddFKBP ocorreu corretamente, no lócus esperado e gerando amplicons do tamanho esperado, nos três clones submetidos a esse experimento (1/3/4).



Figura 37 – Digestões para verificar a presença do alelo selvagem do gene da arginase nos parasitas ARG-/kiddARG. A) Esquema destacando os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Xho*I nos produtos amplificados pelos oligonucleotídeos 1+2 na figura 36, considerando como o alelo de arginase selvagem (WT) e o alelo nocauteado (KNT). As setas ao lado dos nomes das enzimas mostram os tamanhos esperados em pb dos produtos da digestão desses amplicons utilizando a respectiva enzima. B) Eletroforese da digestão com *Bam*HI e *Xho*I dos amplicons dos clones ARG-/kiddARG 1 a 5, do heterozigoto ARG+/- e do selvagem.

Além de todos esses ensaios para confirmar a integração do cassete ddFKBP-ARG, também seqüenciamos todos os produtos de PCR obtidos e o resultado desses seqüenciamentos reafirmaram que a construção tinha sido integrada corretamente, de acordo com a seqüência de nucleotídeos prevista.



Figura 38 - PCRs para verificar integração do cassete contendo o segmento ddFKBP-ARG em um dos alelos de arginase. A) Esquema com os oligonucleotídeos utilizados dd3Lsense (1), ARGasXbal (2) e ARG_3UTRasII (3), e tamanhos aproximados dos produtos esperados no caso da integração correta do cassete ddARG +/- SKL no locus da arginase. B) Imagem da eletroforese dos produtos de PCR utilizando como DNA molde DNAg de 3 clones (1/3/4) dos parasitas ARG-/kiddARG, DNAg de *L. (L.) amazonensis* selvagem (WT), ou somente água (H₂O). Os pares de oligonucleotídeos utilizados nessas reações foram 1 e 3 (1+3), 1 e 2 (1+2), representados na parte A da figura.

4.2.2.6. Análise funcional de *L. (L.) amazonensis* nocaute funcional regulável de arginase

Iniciamos então os experimentos para avaliar a expressão protéica desses parasitas realizando ensaios de "Western blot" com os extratos protéicos das culturas de *L. (L.) amazonensis* selvagem e de cada um dos mutantes 1, 3 e 4, tratadas por 24 horas com 1 µM do ligante FK506 que estabilizaria a molécula ddARG. Os resultados desse experimento estão apresentados na figura 39 e revelam que os mutantes ARG-/kiddARG não expressam arginase, pois podemos observar que o controle, com extrato de *L. (L.) amazonensis* selvagem (WT), apresenta uma marcação do tamanho esperado para arginase (36 kDa); esperávamos bandas de aproximadamente

48 kDa nas canaletas com os extratos dos clones 1 e 3 tratados com FK506, relativa a fusão ddFKBP-ARG, e não observamos marcação alguma.



Figura 39 – "Western blot" parasitas ARG-/kiddARG. Utilizamos extrato proteíco total de: *L.* (*L.*) amazonensis selvagem (WT), clones 1 e 3 dos parasitas ARG-/kiddARG tratados (+F) ou não por 24 horas com 1 µM de FK506. As membranas foram incubadas primeiramente com soro anti-arginase de coelho diluídos 1:100 em PBS. Em seguida, as membranas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, e reveladas com 4-cloro-1-naftol. As setas destacam os tamanhos esperados para a arginase (36 kDa, azul) e para a fusão ddFKBP-ARG (48 kDa, vermelho).

4.2.2.7. Teste de funcionalidade da construção ddFKBP-ARG obtida em *L. (L.) major* nocaute de arginase (ARG-/-)

Dado o resultado obtido no ensaio de "Western blot" com os mutantes ARG-/kiddARG (Fig. 39), resolvemos testar a funcionalidade da fusão ddFKBP-ARG. Para isso, a idéia seria suplementar a atividade de arginase em parasitas *L. (L.) major* nocaute nulo de arginase (Reguera, Balana-Fouce et al. 2009), cedidos pelo Prof. Stephen Beverley.

Portanto, construímos um epissomo contendo o segmento ddFKBP-ARG usando como base o vetor B6182 (Fig. 40). O primeiro passo foi amplificar a ORF da arginase com os oligonucleotídeos ARGs_*Spe*l e ARGas_*Xba*l que permitiram clonar o produto desse PCR no sítio de clonagem do plasmídeo B6182 em fase com o domínio ddFKBP. Esse plasmídeo foi então seqüenciado confirmando que a construção estava correta e a ORF de arginase em fase com o domínio de degradação ddFKBP.

Preparamos DNA desse plamídeo em larga escala para utilizar em ensaios de transfecção nos parasitas *L. (L.) major* ARG ^{-/-}. Após a seleção e



Figura 40 – Esquema do plasmídeo B6182. A figura destaca o gene de resistência à fleomicina, Phleo R; região intergênica DST, DST IR; domínio ddFKBP, dd; e regiões para integração no locus SSU do RNAr, *L. (L.) major* SSU.

clonagem desses mutantes, novamente na presença de 50 µM de putrescina, extraímos DNA para testar se o segmento ddFKBP-ARG estava de fato presente nesses parasitas. Para isso realizamos um PCR utilizando os oligonucleotídeos dd3Lsense e ARGasXbal (Fig. 41). Conforme podemos



Figura 41 – PCR para verificar a transfecção do epissomo contendo o segmento ddFKBP-ARG nos parasitas *L. (L.) major* ARG-/-. Eletroforese dos produtos de PCR utilizando os oligonucleotídeos dd3Lsense e ARGas*Xba*l, e como molde DNA dos clones *L. (L.) major* ARG-/- + ddARG 1 a 12, da construção transfectada B6182_ddARG (+), e de *L. (L.) major* selvagem (WT). A seta em vermelho indica o tamanho esperado para o produto amplificado do segmento ddFKBP-ARG (1100 pb).

observar nessa figura, vários clones continham o segmento ddFKBP-ARG de aproximadamente 1100 pb, e então esses foram usados no experimento seguinte.

Iniciamos então as curvas de crescimento, na presença e ausência de 1 μ M FK506 e/ou 50 μ M de putrescina, para verificar a capacidade da fusão ddFKBP-ARG em suplementar a ausência da arginase nativa. As curvas obtidas com a cultura de um dos clones *L. (L.) major* ARG-/- + ddFKBP-ARG estão representadas na figura 42, todos os outros clones apresentaram o mesmo padrão de crescimento.

Podemos verificar na figura 42 que a fusão ddFKBP-ARG não foi capaz de suplementar a falta da arginase nativa, pois a cultura na presença do ligante FK506 que estabilizaria o domínio de degradação não cresceu na ausência de putrescina, assim como o mutante nulo na ausência de putrescina.



Figura 42 – Curvas de crescimento cultura de *L. (L.) major* ARG -/- transfectada com epissomo contendo o segmento ddFKBP-ARG. Culturas de 10 mL do clone 2 dos mutantes *L. (L.) major* ARG-/- + ddARG, tratadas ou não com 50 μ M de putrescina (P), com 1 μ M de FK506 (F) e ambos (P/F). O eixo das ordenadas representa o número de células/mL.

4.2.2.8. Teste de funcionalidade do domínio de degradação ddFKBP em *L. (L.) amazonensis*

Dado que não conseguimos selecionar clones de *L. (L.) amazonensis* com a fusão ddFKBP-ARG funcional, decidimos testar se o domínio de degradação ddFKBP seria funcional nessa espécie. Para isso transfectamos em *L. (L.) amazonenis* uma construção cedida pelo Prof. Stephen Beverley que expressa a proteína "Yellow fluorescent protein" (YFP) fundida ao domínio ddFKBP, que se mostrou funcional previamente em *L. (L.) major* (Madeira da Silva, Owens et al. 2009).

Extraímos DNA dos clones selecionados para testar por PCR a presença do segmento ddFKBP-YFP nos mutantes obtidos. Na figura 43 está a eletroforese dos produtos gerados por essas reações utilizando os oligonucleotídeos dd3Lsense e SMB3227, confirmando a obtenção de quatro clones com a seqüência relativa à fusão ddFKBP-YFP com o tamanho esperado de 820 pb.



Figura 43 – PCR para verificar a transfecção do vetor contendo o segmento ddFKBP-YFP nos parasitas *L. (L.) amazonensis*. Eletroforese dos produtos de PCR, com os oligonucleotídeos dd3Lsense e SMB3227, utilizando como molde DNA de quatro clones (1 a 4) de *L. (L.) amazonensis* ddFKBP-YFP e DNA de *L. (L.) amazonensis* selvagem (-).

Seguimos então com os ensaios para verificar se o domínio ddFKBP é funcional em *L. (L.) amazonensis.* Para isso, tratamos a cultura do clone 1 com 1 μ M FK506 ou Rapamicina por 24 horas, e retiramos então uma alíquota dessas culturas para serem analisadas por citometria de fluxo, onde avaliamos a fluorescência dessas populações. Na figura 44 apresentamos o gráfico com o resultado desse experimento onde se observa que a presença de qualquer um dos dois ligantes do domínio ddFKBP, utilizados para inibir a degradação, FK506 ou Rapamicina, induziu a fluorescência dos parasitas, revelando que o sistema ddFKBP é funcional em *L. (L.) amazonensis*.



Figura 44 – Citometria de fluxo de parasitas transfectados com ddFKBP-YFP. Gráfico representativo da distribuição dos níveis de fluorescência medida por citometria de fluxo de diferentes populações de células do clone 1 de *L. (L.) amazonensis* ddFKBP-YFP, tratadas ou não (preto) com 1 µM de FK506 (verde), Rapamicina (azul).

4.2.3. Nocaute nulo de arginase em L. (L.) amazonensis

Observando os resultados obtidos com os parasitas *L. (L.) amazonensis* ARG-/kiddARG, principalmente os ensaios de "Western blot" da figura 39, onde observamos que haviam mutantes que não expressavam arginase alguma, resolvemos retomar os experimentos para obtenção de parasitas de *L. (L.) amazonensis* com os dois alelos de arginase nocauteados. Nesse sentido, utilizamos como base a construção previamente obtida para nocautear o primeiro alelo com o gene de resistência a higromicina (Fig. 29) e então trocamos essa marca de seleção pela marca de resistência a puromicina. Para isso, amplificamos o gene de resistência a puromicina, mais a região a 5´ desse de regulação da expressão de DHFR, utilizando os oligonucleotídeos DHFRsense e ORFas2, que adicionam sítios para clonagem entre a região 5' e 3'UTR da arginase, previamente clonados em pUC19 (seção 3.2.2.1). O fragmento amplificado foi clonado em pGEM-T easy e eluído após digestão com as enzimas de restrição *Kpn*I e *Xba*I. Então, digerimos o vetor p5A3A com as mesmas enzimas para ligarmos esse fragmento e assim obtermos a construção final.

Após confirmar por seqüenciamento que a construção estava correta, o DNA do plasmídeo foi preparado em larga escala e digerido com enzimas de restrição que liberavam o cassete linear para recombinação, contendo a marca de resistência à puromicina flanqueada pelas regiões 5´ e 3´UTR da arginase. Esse produto linear foi então utilizado em ensaios de transfecção em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, conforme descrito no capítulo Material e Métodos. Os parasitas transfectados foram selecionados na presença de 30 µg/mL de higromicina e puromicina, e ainda 50 µM de putrescina, novamente para suplementar a falta de arginase. Esses parasitas foram clonados e então extraímos DNA desses para servir como molde em reações de PCR que nos permitiram verificar se a integração havia ocorrido como previsto.

Na figura 45 apresentamos o esquema dessas reações de PCR realizadas e a eletroforese dos produtos obtidos. Conforme esquematizado na parte A dessa figura, se a integração ocorresse conforme o esperado, observaríamos uma banda de aproximadamente 1680 pb utilizando o par de oligonucleotídeos ARG 5UTRs e SMB3546, е uma banda com oligonucleotídeos aproximadamente 1180 pb com OS SMB3545 е ARG 3UTRasII. Portanto, de acordo com a eletroforese mostrada na parte B da figura 45, podemos afirmar que a integração ocorreu nos clones 1 e 3, no locus alvo, gerando o fragmento com tamanho esperado.



Figura 45 – PCRs para verificar nocaute do segundo alelo de arginase. A) Esquema com os oligonucleotídeos utilizados ARG_5UTRs (A), ARG_3UTRasII (B), SMB3546 (C) e SMB3545 (D), e tamanhos aproximados dos produtos esperados no caso da integração correta do cassete de resistência a puromicina (PAC) no locus da arginase. B) Imagem da eletroforese dos produtos de PCR utilizando como molde DNAg de três clones transfectados com a construção para o segundo nocaute (1/2/3), DNAg de *L. (L.) amazonensis* (WT), e água (-).

4.2.3.1. Análise funcional dos parasitas *L. (L.) amazonensis* com os dois alelos de arginase nocauteados

Iniciamos então os experimentos para avaliar a expressão protéica desses parasitas realizando ensaios de "Western blot" com os extratos protéicos de *L. (L.) amazonensis* selvagem e de dois mutantes. Os resultados desse experimento estão apresentados na figura 46 onde podemos observar a marcação relativa à arginase, com aproximadamente 36 kDa, na canaleta com o extrato de *L. (L.) amazonensis* selvagem (WT), enquanto nas canaletas 1 e 2, com os extratos dos dois mutantes selecionados para o

nocaute nulo, não observamos marcação alguma. Como controle, utilizamos um soro anti-histona cedido pelo Prof. Stephen Beverley, que gera a marcação de uma banda com aproximadamente 15 kDa, observada igualmente para todos os extratos, confirmando a ausência de arginase nos clones 1 e 2, ou seja, o nocaute nulo desse gene nesses mutantes.



Figura 46 – "Western blot" parasitas nocautes nulo de arginase. Ensaio realizado com extrato proteíco total de: *L. (L.) amazonensis* selvagem (WT), e clones 1 e 2 de *L. (L.) amazonensis* nocaute ARG-/- (1/2). As membranas foram incubadas primeiramente com soro anti-arginase e anti-histona de coelho, diluídos 1:100 e 1:500 em PBS, respectivamente. Em seguida, as membranas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, e reveladas com 4-cloro-1-naftol. A seta vermelha aponta a marcação relativa à histona e a seta azul à arginase. P: "Precision Plus Protein Dual Color" (Bio-Rad).

Em seguida realizamos os ensaios de atividade enzimática de arginase (produção de uréia) com esses mesmos extratos usados no experimento de "Western blot". Os resultados desse experimento estão apresentados na figura 47 e revelam que, enquanto o controle utilizando extrato proteíco de parasita selvagem (La WT) apresenta atividade de arginase de 2,47 nmol/min, os clones 1 e 2 apresentam atividade de arginase tendendo a zero, reafirmando o sucesso na obtenção de parasitas de *L. (L.) amazonensis* com os dois alelos do gene de arginase nocauteados.

Então, para avaliar a infectividade desses mutantes, realizamos infecções *in vivo* utilizando promastigotas desses parasitas, provenientes da fase estacionária de crescimento, conforme descrito no capítulo Material e Métodos. Na figura 48, apresentamos os resultados desse experimento



Figura 47 – Atividade de arginase dos parasitas nocautes nulo de arginase. Gráfico da produção de uréia (nmol) por minuto utilizando 6 µg dos extratos proteícos total de: *L. (L.) amazonensis* selvagem (La WT), e clones 1 e 2 de *L. (L.) amazonensis* nocaute ARG-/- (La KO 1 e 2). Cada amostra foi submetida a três ensaios independentes. A equação representa a regressão linear da linha de tendência da amostra La WT.



Figura 48 – Evolução da infecção *in vivo* dos parasitas nocautes nulos de arginase. Camundongos BALB/c foram infectados com 10⁶ promastigotas, de fase estacionária, de *L.* (*L.*) *amazonensis* controle (La WT), e clones 1 e 2 de *L.* (*L.*) *amazonensis* nocaute ARG-/-(La KO 1 e 2). Os eixos das ordenadas (E-D) representam os valores das diferenças de diâmetro (mm) da pata infectada para a pata controle traseira, e os eixos das abscissas representam o tempo de infecção, em dias. Cada ponto consiste em um grupo de quatro machos.

mostrando que os parasitas com o gene de arginase nocauteado tem a infectividade diminuída, sendo que um dos clones desses mutantes não apresentou infectividade alguma.

Experimentos preliminares de infecção *in vitro* também indicam uma redução da infectividade desses parasitas nocautes de arginase, tanto quanto a porcentagem de células infectadas como quanto ao número de amastigotas por célula infectada (Fig. 49).



Fig. 49 – Infectividade *in vitro* dos parasitas nocautes nulo de arginase. As barras apresentam a porcentagem de macrófagos peritoniais murinos infectados, em pelo menos 100 células, após 24 (azul) e 48 (vermelho) horas de infecção *in vitro* com parasitas *L. (L.) amazonensis* selvagem (La WT) e dois clones de parasitas nocautes nulo de arginase (La KO1 e 2). As barras de erro representam o desvio padrão de diferentes câmaras de infecção *in vitro*. Os números acima das barras de erro são a média do número de amastigotas por macrófago infectado, em pelo menos 100 células infectadas.
5. Discussão

Esclarecer o papel fisiológico de uma determinada enzima, e determinar como ela exerce esse papel, é fundamental em sua indicação como possível alvo quimioterápico. Neste trabalho tentamos elucidar o papel da arginase de *L. (L.) amazonensis*, durante o ciclo de vida desse parasita, e como ela exerce sua função, assim verificando se essa enzima seria um bom alvo quimioterápico no desenvolvimento de drogas leishmanicidas.

Conforme colocado na introdução, a arginase de *L. (L.) amazonensis*, além de seu papel na replicação desses organismos participando na via de síntese de poliaminas, pode ter uma segunda função durante a infecção de hospedeiros vertebrados. Essa função seria modular a quantidade de L-arginina disponível nas células infectadas, pois consumindo esse aminoácido a arginase deslocaria o equilíbrio arginase/NOS diminuindo a produção da molécula antiproliferativa NO, e aumentando a disponibilidade de poliaminas, que favorece a replicação do parasita.

No contexto das respostas imunes Th1 e Th2, o papel da arginase de *Leishmania* na infecção poderia ser simplesmente participar do balanço das respostas Th1 e Th2 no macrófago do hospedeiro, induzindo a arginase do macrófago e assim modulando a resposta imune do macrófago em direção à resposta Th2. Com isso, a infecção induziria a expressão de arginase I do macrófago e a disponibilidade de poliaminas para replicação e diferenciação dos parasitas, enquanto, paralelamente inibiria a via Th1 de expressão da iNOS e combate a infecção, como colocado por Vincendeau e colaboradores (Vincendeau, Gobert et al. 2003).

Logo, para elucidar como a arginase de *Leishmania* poderia executar sua função durante o ciclo de vida desse organismo, inicialmente produzimos soros anti-arginase que nos permitiram verificar que a enzima é compartimentalizada nos glicossomos dos parasitas, tanto na forma promastigota como na forma amastigota. Além disso, construímos parasitas mutantes, com a expressão de arginase modificada, quanto à quantidade e localização, o que nos permitiu avaliar o impacto da ausência ou da modificação de expressão e/ou endereçamento dessa enzima em L. (L.) amazonensis.

5.1. Soros anti-arginase de L. (L.) amazonensis

Para imunolocalizar a arginase de *L. (L.) amazonensis* na forma promastigota desse parasita, inicialmente produzimos soro policional antiarginase em camundongos, a partir da proteína recombinante purificada.

Ensaios de "Western blot" com esse soro revelaram a marcação de duas bandas com pesos moleculares similares (canaleta 3, Fig. 6). Uma vez que cada subunidade de arginase se liga a dois átomos de manganês em sua forma ativa (Scolnick, Kanyo et al. 1997), a observação desse resultado nos levou à hipótese da marcação de duas formas de arginase, ligada e não ligada a metal, conforme observado com relação a outras proteínas dependentes da ligação a metais (Reinach e Karlsson 1988).

Essa hipótese foi testada utilizando três estratégias, desnaturação total do extrato protéico com uréia (Fig. 8) e as outras duas, elaboradas a partir de trabalhos prévios na literatura (Simao e Gomes 2001; Salas, Rodriguez et al. 2002), consistiam na tentativa de saturação ou remoção dos dois átomos de manganês, que deslocaria o equilíbrio para presença de uma única conformação da enzima, com ou sem o metal (Fig. 9 e 10).

Nenhuma dessas estratégias solucionou a presença de duas bandas, e continuamos observando a marcação desse "doublet" com o soro antiarginase de camundongo. Esses resultados podem indicar que, assim como observado com relação à agmatinase, enzima homóloga à arginase, um dos átomos de manganês teria uma ligação muito forte à arginase (Salas, Rodriguez et al. 2002).

De fato, foi observado que a ativação da arginase estaria associada à ligação forte de um átomo de manganês, cuja ação catalítica seria estimulada pela adição de outro manganês, que se ligaria à proteína mais fracamente, gerando a forma completamente ativada da enzima (Carvajal, Salas et al. 1999). Além disso, a remoção dos dois átomos de manganês pode não ser possível, pois, de acordo com Scolnick e colaboradores, a

ocupação dos dois núcleos de ligação de manganês é necessária não só para a ativação dessa enzima como também para a termoestabilidade dessa (Scolnick, Kanyo et al. 1997).

Refletindo sobre a importância dos dois átomos de manganês para a arginase, elaboramos que o manganês pode ter um papel regulatório na função da enzima, ou seja, a presença de um ou dois átomos de manganês pode ser um sinal de regulação da atividade enzimática da arginase.

Seguindo com a localização da arginase em *Leishmania*, inicialmente, analisando a seqüência de nucleotídeos previamente determinada (da Silva, Castilho et al. 2002), encontramos o motivo PST1 na terminação carboxila, descrito como responsável pelo endereçamento de proteínas para o glicossomo de tripanossomatideos (Smith e Parsons 1996). Para verificar essa observação *in silico*, construímos parasitas expressores de EGFP endereçada para o glicossomo com o sinal SKL (Fig. 12), e esses parasitas foram então submetidos a ensaios de imunofluorescência com o soro antiarginase de camundongo (Fig. 13). Assim conseguimos colocalizar a marcação relativa à arginase com a emissão de fluorescência da proteína verde glicossomal, mostrando que a arginase está localizada no glicossomo na forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* (Fig. 13) (da Silva, da Silva et al. 2008).

Alem disso, obtivemos imagens de microscopia eletrônica em colaboração com o Prof. Stephen Beverley da Washington University School of Medicine (St Louis – USA), utilizando o mesmo soro anti-arginase em ensaios com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. As imagens obtidas corroboram a compartimentalização da arginase muito bem delimitada e homogeneamente distribuída em um compartimento dessas células, ou seja, não associada à membrana desse compartimento (Fig. 14). Não foi utilizado outro marcador de glicossomo, mas a compartimentalização definida, associada às observações de microscopia confocal permitem dizer que o compartimento observado na microscopia eletrônica deve representar o glicossomo da célula.

A localização celular da arginase nesses parasitas é muito importante no desenvolvimento de quimioterápicos que tenham ela como alvo, o que

leva a necessidade de saber para onde endereçar esse possível quimioterápico específico. Além disso, a inibição da importação da enzima para o glicossomo pode fornecer uma estratégia ainda mais específica de terapia anti-tripanossomatídeos. A importação de proteínas para o glicossomo e para o peroxissomo parece ter distinções bastante claras, e essas diferenças podem ser exploradas no desenho de análogos peptídicos específicos para o sinal de endereçamento para glicossomos e não para os peroxissomos de mamíferos (Smith e Parsons 1996).

Roberts e colaboradores (Roberts, Tancer et al. 2004) em um estudo mostrando que o papel da arginase de *L. (L.) mexicana* está relacionado ao metabolismo de poliaminas desse organismo, também mostraram que essa enzima está localizada no glicossomo. No entanto, esse trabalho utilizou uma proteína de fusão, que pode ter o endereçamento alterado. Além disso, esse trabalho, não verificou a localização da enzima na forma amastigota desse parasita, como feito neste estudo.

Voltando à questão do endereçamento de um quimioterápico que tenha como alvo a arginase de *Leishmania*, a localização da enzima na forma amastigota seria uma informação imprescindível, pois é essa a forma do parasita encontrada nas células infectadas dos mamíferos hospedeiros e, portanto o alvo a ser atingido.

Inicialmente, consideramos que se a arginase do parasita compete com a iNOS do macrófago pela L-arginina disponível, assim poderia ser interessante evolutivamente essa proteína ser exportada durante a infecção, facilitando seu acesso a esse substrato e assim seqüestrando o mesmo da célula hospedeira. Caso a arginase permaneça compartimentalizada, se torna importante estudar os transportadores de L-arginina tanto do fagolisossomo, como da membrana citoplasmática de *Leishmania* e do glicossomo, onde finalmente a arginina seria utilizada como substrato da arginase.

Então, para localizar a arginase de *Leishmania* durante a infecção de macrófagos, produzimos outro soro policional anti-arginase em coelho, pois o soro de camundongos previamente obtido, quando utilizado nesses experimentos, levou à marcação inespecífica de toda a preparação. Isso

pode ser explicado pela presença de receptores de IgG nessas células, devido a algum estímulo anterior, dado que os macrófagos utilizados são de origem murina, esses receptores seriam do mesmo tipo do soro e seriam revelados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo.

Dessa forma, uma vez obtido o soro policional anti-arginase de coelho, realizamos ensaios de imunomarcação em macrófagos J774 infectados com *L. (L.) amazonensis*. As imagens dessas preparações obtidas com microscopia confocal (Fig. 16) e eletrônica (Fig. 17), mostram que a arginase do parasita permanece compartimentalizada na forma amastigota, ou seja, não é exportada para o fagolisossomo ou para o macrófago hospedeiro.

Esses resultados indicam que o desenvolvimento de um quimioterápico direcionado especificamente para a arginase do parasita teria que considerar o direcionamento do fármaco para o glicossomo dos amastigotas intracelulares. Dada a dificuldade que isso pode significar, ou seja, a necessidade de atravessar a membrana plasmática do macrófago, a membrana do fagolisossomo, a membrana do parasita e a membrana do glicossomo, talvez a abordagem mais interessante, considerando esse alvo, seria o desenvolvimento de estratégias que impeçam a importação da arginase para o glicossomo, principalmente se essa localização for essencial para execução da função dessa proteína, ou mesmo para a homeostase do sistema. Nesse sentido, em T. brucei, a depleção de PEX2, gene essencial na importação de diversas proteínas para organelas de leveduras e mamíferos, levou ao acúmulo das enzimas glicossomais no citoplasma da célula causando a morte desses organismos (Guerra-Giraldez, Quijada et al. 2002).

Além disso, a localização da arginase pode ser importante também para a homeostase celular e fisiologia normal desses organismos, como foi observado com relação às enzimas Glicose-6-Fosfato Isomerase (PGI) e Glicerol Kinase (GK), que quando não propriamente endereçadas para o glicossomo de *T. brucei* levaram ao acúmulo de Glicose-6-Fostato e Glicerol-3-Fosfato, causando morte e imobilidade celular, respectivamente (Haanstra, van Tuijl et al. 2008).

A compartimentalização glicossomal de determinadas vias metabólicas parece ser fundamental para os tripanossomatídeos. Nesse sentido, Haanstra e colaboradores (Haanstra, van Tuijl et al. 2008) mostraram que a compartimentalização da via glicolítica é uma alternativa à regulação enzimática alostérica que previne o acúmulo de intermediários tóxicos e explosão metabólica dessa via autocatalítica.

5.2. Superexpressão de arginase em L. (L.) amazonensis

Previamente, outros pesquisadores no laboratório tiveram dificuldades em obter mutantes com a expressão de arginase diminuída ou anulada pela obtenção de nocautes. Mesmo a suplementação com putrescina, produto da via metabólica da arginase, que havia permitido a seleção de nocautes de arginase em *L. (L.) mexicana* (Roberts, Tancer et al. 2004) e *L. (L.) major* (Reguera, Balana-Fouce et al. 2009), não levou à seleção de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* nocaute nulo de arginase nocauteado. Com isso, inferimos que talvez a espécie utilizada, *L. (L.) amazonensis*, não tivesse os transportadores necessários para a incorporação de putrescina, o que inviabilizaria a suplementação fundamental para obtenção do nocaute desse gene essencial (Roberts, Tancer et al. 2004).

Por isso, resolvemos iniciar nossas estratégias para modificação da expressão de arginase com a superexpressão desse gene. Para isso transfectamos e selecionamos promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para superexpressão epissomal de arginase, com e sem o sinal de endereçamento para glicossomo, o que também permitiria avaliar a importância da compartimentalização da arginase no parasita.

Primeiramente, com relação aos superexpressores de arginase com sinal de endereçamento para o glicossomo (SKL), os ensaios para avaliar esses mutantes indicaram um aumento de aproximadamente 15 vezes na quantidade de transcrito de arginase (Tabela II). Já o ensaio de "Western blot" com extrato protéico desses mutantes revelou um aumento de 3,36 vezes na marcação relativa à arginase (Fig. 21) e o ensaio de atividade enzimática de arginase com esse mesmo extrato protéico mostrou que esses

mutantes apresentavam quase o dobro da atividade enzimática com relação ao controle selvagem (Fig. 22).

Dessa forma, percebemos que a superexpressão de arginase com SKL estava ocorrendo em nível de transcrição e tradução de proteína ativa, porém em proporções diferentes, dado que observamos um aumento de 15 vezes na quantidade de transcrito, 3 vezes na quantidade de proteína, e 2 vezes na atividade enzimática. Essas diferenças podem estar evidenciando a existência de passos intermediários de regulação, pós-transcricionais e traducionais, importantes na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos dada a característica transcrição policistrônica (Smith e Parsons 1996).

Seguimos então analisando esses mutantes superexpressores de arginase com sinal de endereçamento quanto ao padrão crescimento e infectividade. Inicialmente, os ensaios para determinação da curva de crescimento desses mutantes revelaram que essa cultura atingia a fase estacionária com uma concentração celular menor que a cultura controle (Fig. 24). Esse resultado foi bastante surpreendente, pois esperávamos que a curva de crescimento desses mutantes coincidisse com o controle, ou que atingisse a fase estacionária com um maior número de células, uma vez que uma maior atividade da arginase poderia fornecer mais poliaminas para a replicação celular. Paralelamente, também esperávamos ter um número de parasitas metacíclicos maior que o controle, pois é na fase estacionária do crescimento in vitro de Leishmania que ocorre a diferenciação das formas promastigotas procíclicas para metacícilicas (da Silva e Sacks 1987). No entanto, o resultado obtido indica que a cultura desses superexpressores entra em fase estacionária, e assim inicia a metaciclogênese, com um número menor de células o que poderia indicar um número menor de metacíclicos. Uma possível explicação para esse comportamento diferencial seria um metabolismo mais ativo que esgotaria o meio antes e assim sinalizaria para o inicio da metaciclogênese (Franke, McGreevy et al. 1985) (Louassini, Foulquie et al. 1999), mas isso deve ser testado, por exemplo, aumentando a fregüência das trocas de meio durante o crescimento.

Seguindo com os experimentos de infecção *in vivo*, utilizando promastigotas superexpressores, observamos que esses superexpressores eram tão infectivos quanto o controle (Fig. 25), conforme pode ser previsto quando analisamos a curva de crescimento desses parasitas, no entanto, contrários às nossas expectativas iniciais. De acordo com nossa hipótese inicial, a atividade da arginase de *Leishmania* deslocaria arginina inibindo a atividade de iNOS, e assim um parasita superexpressando essa enzima, no estado nativo (com sinal de endereçamento para glicossomo – SKL), deveria levar a uma infecção maior que a cultura selvagem, uma vez que o hospedeiro produziria menos NO.

Portanto, a partir desse resultado de infecção *in vivo* começamos a levantar novas hipóteses que poderiam explicar esses resultados, e uma dessas hipóteses foi quanto à quantidade de parasitas infectivos que foram inoculados nas patas dos animais, e se ela seria equitativa de modo a permitir a comparação conforme apresentada na figura 25. Então, para tentar entender melhor esse resultado, resolvemos verificar a quantidade de metacíclicos dessas culturas. Para isso realizamos um ensaio de PCR em tempo real que permitiu a comparação da quantidade de metacíclicos das diferentes culturas quando normalizado por G6PD, e revelou que a cultura de superexpressores com sinal SKL tinha uma maior proporção de formas metacíclicas do que as células controle (Tabela III). Utilizamos então os resultados dessa quantificação de metacíclicos para normalizar as infecções *in vivo* com as formas promastigotas dos superexpressores, e com isso observamos que na verdade esses mutantes eram menos infectivos que o controle (Fig. 26).

Essa estratégia para avaliar a quantidade de metacíclicos assume uma relação linear entre a expressão de mRNA de META-1, a quantidade de metacíclicos em cultura e o tamanho da lesão, mas como essa premissa pode não ser verdadeira, para contornar definitivamente uma possível influencia da superexpressão de arginase na metaciclogênese, e finalmente esclarecer essa questão da infectividade dos superexpressores, independentemente da proporção de metacíclicos nas culturas de promastigotas desses mutantes, realizamos infecções *in vivo* utilizando

amastigotas purificados, que consistem unicamente em formas infectantes. O resultado dessa infecção então nos confirmou que de fato esses superexpressores são menos infectivos que o controle (Fig. 27).

Refletindo sobre esses resultados, levantamos a hipótese de que o papel da arginase de *Leishmania* na infecção poderia ser simplesmente participar do balanço das respostas Th1 e Th2 do macrófago do hospedeiro, e essa participação poderia obedecer a uma função gaussiana, sendo que o ótimo já ocorreria no parasita selvagem, e qualquer desvio prejudicaria esse balanço.

Gaur e colaboradores (Gaur, Roberts et al. 2007) mostraram que ocorre um aumento significativo na atividade total de arginase durante a infecção de macrófagos de BALB/c por *L. (L.) mexicana*, sendo que uma pequena fração desse aumento seria devido à arginase do parasita, portanto estaria ocorrendo uma indução da arginase da própria célula hospedeira. Dessa forma, a atividade local de arginase, influenciando a disponibilidade de L-arginina no vacúolo parasitóforo, poderia ser significativamente influenciada pela enzima do parasita que induziria a expressão de arginase do hospedeiro.

Depois dos experimentos de infecção, realizamos ensaios de imunofluorescência para confirmar a localização da arginase produzida a partir do epissomo superexpressor. Esses ensaios revelaram que a intensidade de marcação relativa à arginase não era aumentada nos superexpressores, inclusive aparentando certa diminuição nos superexpressores com relação ao controle (Fig. 23).

Em paralelo, conforme colocado previamente, obtivemos também parasitas superexpressores de arginase sem o sinal de endereçamento para glicossomo SKL. Os ensaios iniciais para avaliar esses mutantes revelaram um aumento de 9 vezes na quantidade de transcrito de arginase (Tabela II). Já o ensaio de "Western blot" utilizando extrato protéico desses mutantes revelou uma discreta diminuição de 0,63 vezes na intensidade da marcação de arginase com relação ao controle (Fig. 21), o que foi confirmado no ensaio de atividade enzimática de arginase (Fig. 22). Esses resultados indicam que a transcrição da arginase aumentou nesses mutantes, no

entanto, esse aumento não foi similar ao que ocorreu com o mRNA de arginase com sinal. Não temos como afirmar se a meia vida do mensageiro é menor ou se está sendo menos transcrito, ou ainda se há um número diferente de epissomos que pode refletir no número de transcritos. Alem disso, o aumento não é refletido em nível, ou seja, a tradução pode não ocorrer corretamente ou a proteína gerada pode não ser estável e ser degradada rapidamente.

Após esses ensaios, realizamos curvas de crescimento das culturas desses superexpressores de arginase sem SKL que revelaram o mesmo padrão de crescimento que a cultura controle (Fig. 24). Já os experimentos seguintes de infecção in *vivo* utilizando promastigotas desses superexpressores, indicaram que esses mutantes seriam mais infectivos que o controle (Fig. 25). Da mesma forma feita com relação aos superexpressores de arginase com SKL, verificamos também a quantidade de metacíclicos dessas culturas de superexpressores de arginase sem o sinal de enderecamento. Esse experimento revelou que de fato a cultura de superexpressores sem sinal SKL tinha mais formas metacíclicas que o controle (Tabela III). Novamente, utilizamos esses resultados para normalizar as infecções in vivo com as formas promastigotas desses superexpressores e com isso observamos esses superexpressores também eram menos infectivos que o controle (Fig. 26). Considerando os possíveis problemas nas premissas assumidas para a quantificação de metacíclicos, conforme discutido anteriormente, realizamos infecções in vivo utilizando amastigotas purificados desses superexpressores que confirmaram esse resultado (Fig. 27).

Com esses resultados começamos a levantar novas hipóteses que poderiam explicar o observado. Uma hipótese bastante interessante seria que a arginase sem sinal de endereçamento para glicossomo poderia estar sendo exportada pela *Leishmania* para fora da célula, pois retirando a sinalização de endereçamento a proteína traduzida poderia entrar em uma via alternativa de tráfego celular. Com isso, não conseguiríamos detectar maior quantidade e atividade protéica no extrato de células de superexpressores sem SKL, corroborando com os resultados dos ensaios de

Western blot (Fig. 21) e atividade enzimática de arginase (Fig. 22). Paralelamente, a arginase exportada ficaria mais acessível ao substrato para competir com a iNOS dentro do vacúolo parasitóforo no macrófago, e assim poderia levar a uma maior infecção. No entanto, essa hipótese foi testada utilizando o sobrenadante concentrado dessa cultura em ensaios de "Western blot" e atividade enzimática que não indicaram que a arginase seria exportada levando à rejeição dessa hipótese.

Quando realizamos os ensaios de imunofluorescência para verificar a localização da arginase nesses mutantes, observamos que essa continuava compartimentalizada nos parasitas superexpressores de arginase não endereçada para o glicossomo (Fig. 23). Analisando esse resultado inferimos que o motivo SKL no terminal carboxila da arginase pode não ser o único sinal de endereçamento dessa proteína para o glicossomo, podendo haver sinais internos de endereçamento, como observado com relação à Fosfoglucomutase de *T. cruzi* (Penha, Sant'Anna et al. 2009). Outra possibilidade que levantamos seria que a proteína sem sinal de endereçamento poderia deslocar a nativa para rotas de degradação impedindo a formação do trímero de arginase nesses mutantes, que é a estrutura ativa dessa enzima em *L. (L.) amazonensis* (da Silva, Castilho et al. 2002), ou ainda levando a formação de um trímero não funcional.

Finalmente, percebemos que não conseguiríamos avaliar a importância da compartimentalização da arginase utilizando células superexpressando a enzima modificada, sem o sinal de endereçamento SKL, na presença da enzima nativa. Além disso, a expressão epissomal pode não ser uma boa alternativa, pois pode variar muito dependendo da pressão seletiva aplicada, ou seja, o número de cópias do epissomo contendo o gene de interesse pode variar, gerando a variação do efeito observado pela expressão desse gene.

De qualquer forma, os resultados indicam que, em última análise, o endereçamento da arginase para o glicossomo deve ter um significado biológico. Podemos pensar que como o não endereçamento leva a uma menor infecção, o fato de existir a compartimentalização no glicossomo poderia ser uma vantagem evolutiva modulando a infecção, mantendo a

participação da arginase no equilíbrio das respostas Th1 e Th2, como discutido previamente.

5.3. Nocaute funcional regulável de arginase em *L. (L.) amazonensis* utilizando o sistema ddFKBP

A segunda estratégia que utilizamos para tentar entender o papel da arginase do parasita na infecção e esclarecer a importância da localização glicossomal dessa enzima, foi elaborada em colaboração com o Prof. Stephen Beverley, da Washington University School of Medicine (St. Louis MO USA).

Em sua visita ao Brasil, conversamos com o Prof. Beverley sobre as dificuldades que estávamos encontrando no laboratório para obter parasitas com o gene de arginase nocauteado, conforme discutimos no item anterior. Ele então nos relatou sobre um projeto em andamento em seu laboratório que permitiria a regulação da expressão de genes de interesse utilizando o sistema ddFKBP, descrito na introdução. Essa estratégia poderia ser promissora no estudo de genes essenciais cuja suplementação para obtenção de nocautes não fosse conhecida. Em seu laboratório, esse sistema estava sendo adaptado para utilização em *Leishmania*, se mostrando altamente eficaz na regulação da expressão de um importante fator de virulência em *L. (L.) major*, inclusive analisando a toxidade e eficácia dos possíveis ligantes do domínio de regulação para esses parasitas (Madeira da Silva, Owens et al. 2009).

Com isso, estabelecemos uma colaboração com o Prof. Beverley e, em estágio em seu laboratório na Washington University of St. Louis, obtive parasitas expressando a arginase fundida a esse domínio de desestabilização ddFKPB. A fusão ddFKBP-ARG promoveria a degradação da proteína fundida na ausência de ligantes específicos que estabilizam a fusão (Shld1, Rapamicina ou FK506) de maneira dose-dependente (Madeira da Silva, Owens et al. 2009). Para isso, ainda no Brasil, obtivemos parasitas com um alelo do gene da arginase nocauteado. Esses nocautes simples que foram então utilizados em uma segunda etapa de transfecção para realizar o "knock in", no próprio locus de arginase, no alelo não nocauteado, do segmento ddFKBP-ARG (ddARG), e assim obtermos parasitas nocaute funcional de arginase.

Paralelamente, poderíamos também utilizar essa estratégia para avaliar a questão do endereçamento de arginase para o glicossomo, realizando o "knock in" do cassete com a ORF de arginase sem o sinal de endereçamento para glicossomo (SKL), ou seja, com o segmento ddFKBP-ARGΔSKL. Para isso, obtivemos então parasitas que expressariam unicamente arginase citoplasmática fundida ao domínio de desestabilização, e, assim, poderíamos avaliar o efeito do redirecionamento da arginase para o citoplasma da célula, sem a interferência da arginase nativa.

Já no laboratório do Prof. Beverley, realizamos diversas reações de PCR e seqüenciamento que confirmaram as integrações esperadas na obtenção desses mutantes nocaute funcional regulável de arginase (Fig. 36 e 38). Em seguida, realizamos o ensaio de "Western blot" (Fig. 39) que indicou que os mutantes não estavam regulando a expressão de arginase como esperado, na verdade, esses parasitas nem estavam produzindo arginase, como seria esperado na presença do ligante, que manteria a molécula resultante da fusão ddARG estável. Isso poderia ocorrer caso a construção ddFKBP-ARG não fosse funcional ou se o sistema ddFKBP não funcionasse em *L. (L.) amazonensis*, como havia sido mostrado para *L. (L.) major* (Madeira da Silva, Owens et al. 2009).

Portanto, decidimos verificar se o sistema ddFKBP é funcional na espécie *L. (L.) amazonensis*, e para isso transfectamos esses parasitas com uma construção, já verificada como funcional, que expressa a proteína fluorescente YFP fundida ao domínio ddFKBP (Madeira da Silva, Owens et al. 2009). Esses parasitas foram então avaliados quanto à fluorescência emitida na presença de dois ligantes que estabilizam a fusão (FK506 e Rapamicina), mostrando que ocorria regulação da fluorescência dependente da presença do ligante (Fig. 44), e assim revelando que o sistema é funcional em *L. (L.) amazonensis*.

Dado que o sistema ddFKBP é funcional em *L. (L.) amazonensis*, iniciamos os experimentos para verificar se a construção obtida seria

funcional. Para isso, transfectamos a construção ddFKBP-ARG obtida em parasitas *L. (L.) major* com os dois alelos de arginase nocauteados (Reguera, Balana-Fouce et al. 2009) e com isso verificar se, na presença do ligante estabilizador da fusão ddARG, essa fusão suplementaria a ausência de arginase nativa no parasita. Os resultados obtidos com as curvas de crescimento desses mutantes (Fig. 42) mostraram que a fusão ddFKBP-ARG não foi capaz de suplementar a ausência da proteína nativa, pois na do suplemento metabólico da via da arginase, putrecina, as culturas não cresceram (Fig. 42), revelando que a construção obtida não era funcional.

Uma das possibilidades que levantamos para a não funcionalidade da construção ddFKBP-ARG é que, na presença do peptídeo de ddFKBP, a estrutura da enzima poderia ser alterada e o trímero ativo da enzima não seria formado. Para resolver isso, uma proposta é tentar inserir diferentes espaçadores entre o domínio ddFKBP e a ORF da arginase. Além disso, há um conjunto de experiências relatadas ao Prof. Beverley por outros grupos, que tentaram utilizar o sistema ddFKBP, indicando que esse sistema não funcionaria para qualquer proteína, inclusive a maioria dos problemas são observados com proteínas não citoplasmáticas, ou seja, de membrana ou endereçada para alguma organela, que seria o caso da arginase de *Leishmania*.

5.4. Nocaute nulo de arginase em L. (L.) amazonensis

Após observarmos que os parasitas com um alelo da arginase nocauteado e o segundo com a integração do segmento ddFKBP-ARG não produziam arginase, percebemos que seria possível a obtenção de parasitas não expressores dessa enzima, na presença de putrescina. Com isso, decidimos retomar os experimentos para a obtenção do nocaute nulo de arginase em *L. (L.) amazonensis*.

Logo, dado os problemas enfrentados previamente no laboratório, discutidos no item anterior, fizemos uma nova construção que foi transfectada para o nocaute do segundo alelo. Com isso, conseguimos selecionar parasitas resistentes às drogas utilizadas como marcas de resistência para a substituição da ORF da arginase dos dois alelos, na presença de putrescina, produto da via da arginase que suplementa a ausência dessa proteína nativa, da mesma forma que Reguera e colaboradores utilizaram para obter o nocaute nulo de arginase em *L. (L.) major* (Reguera, Balana-Fouce et al. 2009). Reflentindo sobre o sucesso alcançando com essa nova construção, supomos que o problema prévio foi a tentativa de substituir uma região central da ORF de arginase, o que poderia gerar uma proteína de fusão com o sinal de endereçamento para o glicossomo, e assim a higromicina fosfotransferase não seria funcional e não conferiria resistência a esse antibiótico.

Reações de PCR com o DNA dos mutantes selecionados confirmaram o nocaute dos dois alelos (Fig. 45), e então os ensaios de "Western blot", utilizando extrato protéico dos mesmos mutantes, corroboraram a ausência de arginase nesses (Fig. 46), reafirmando a obtenção de *L. (L.) amazonensis* com os dois alelos de arginase nocauteados.

Esses mutantes apresentaram poder infectivo comprometido, sendo que o clone 1 levou ao desenvolvimento de uma lesão com aproximadamente metade do tamanho da gerada pelos parasitas selvagem, já o clone 2 não gerou lesão alguma. Essas observações diferem do observado por Reguera e colaboradores com parasitas *L. (L.) major* nocaute de arginase, cuja a infectividade não foi afetada na ausência de expressão de arginase (Reguera, Balana-Fouce et al. 2009), evidenciando as diferenças fisiológicas entre as diferentes espécies de *Leishmania*.

Agora, com os mutantes nulos para arginase, podemos retomar as tentativas para verificar a importância da compartimentalização dessa enzima para o parasita. Para isso pretendemos suplementar esses parasitas integrando no lócus de SSU rRNA a seqüência de arginase sem sinal de endereçamento para glicossomo, estratégia essa que contorna os problemas com a variação de número de cópias da transfecção epissomal, discutidos anteriormente, e assim permitiria avaliar a importância da compartimentalização dessa enzima no ciclo de vida desses parasitas.

Além disso, iremos avaliar a produção de NO desses parasitas nocauteados, lembrando a correlação entre a produção de NO pela cNOS de *Leishmania* e a presença de formas metacíclicas em isolados do parasita e logo infectividade (Genestra, de Souza et al. 2003; Genestra, Souza et al. 2006). Paralelamente, é interessante notar que a NOS desses organismos parece estar relacionada a um sistema de sinalização dependente de cálcio (Basu, Kole et al. 1997). Estudos, baseados nos efeitos de inibidores e cofatores, mostram que a NOS do parasita seria similar a NOS tipo I (neuronal) e tipo III (endotelial) de mamíferos, que também são reguladas por sinais de Ca²⁺ (Paveto, Pereira et al. 1995; Basu, Kole et al. 1997). Assim, a expressão de cNOS em *Leishmania* pode evidenciar uma regulação cruzada dessa com a iNOS dos macrófagos, responsável pela produção de NO, molécula de combate a patógenos (Genestra, de Souza et al. 2003).

Alternativamente, observando imunofluorescências de as promastigotas de Leishmania incubadas com o marcador de NO, DAF-FM, que resultaram em uma marcação do tipo tudo-ou-nada (Fig. 28), elaboramos que talvez o NO produzido pela Leishmania seja um sinalizador para a diferenciação de formas promastigotas procíclicas em formas metacíclicas infectivas. Assim, a produção de NO por algumas células da cultura de procíclicos promastigotas já seria suficiente para a diferenciação de uma determinada população de parasitas em metacíclicos, mas de qualquer forma, quanto mais células produtoras de NO, mais NO haveria na cultura e mais células se diferenciariam em metacíclicos, o que corroboraria com os resultados observados por Genestra e colaboradores (Genestra, de Souza et al. 2003; Genestra, Souza et al. 2006).

Logo, a avaliação dos nocautes obtidos quanto à produção de NO pode nos ajudar a verificar a infectividade desses, e talvez elucidar a relação entre a expressão de arginase e à produção de NO nesses parasitas. Com isso, a arginase de *Leishmania* poderia ser importante como um dos parâmetros de uma regulação cruzada complexa com a arginase e NOS do macrófago, e a própria cNOS do parasita, que, conjuntamente, modulariam a

quantidade de L-arginina disponível no sistema como um todo e o destino da infecção do hospedeiro por esse parasita.

Assim, concluímos que o papel biológico da arginase de *Leishmania* parece ser muito mais complexo do que o inicialmente postulado, participando na regulação de outras vias metabólicas do próprio parasita e da célula hospedeira. De qualquer forma, este trabalho permitiu conclusões importantes para o conhecimento da fisiologia do parasita e sua relação com o macrófago.

6. Conclusões

- Pelo menos um dos dois átomos de Mn²⁺, presente em cada monômero da arginase, está fortemente associado a essa, mas o fracionamento em SDS-PAGE sempre produz um "doublet" de bandas.
- A arginase de *L. (L.) amazonensis* apresenta localização compartimentalizada no glicossomo tanto na forma promastigota como amastigota.
- Em mutantes de *L. (L.) amazonensis* superexpressores de arginase, com o sinal de endereçamento para o glicossomo (SKL), observamos aumento na quantidade de mRNA transcrito de arginase, aumento na massa protéica e atividade enzimática relativa à arginase, mas diminuição na concentração celular atingida na fase estacionária de crescimento, e diminuição da infectividade, quando comparados aos parasitas selvagens.
- Em mutantes de L. (L.) amazonensis superexpressores de arginase sem sinal de endereçamento para glicossomo (SKL), observamos aumento na quantidade de mRNA transcrito de arginase, manutenção ou diminuição na massa protéica e atividade enzimática relativa à arginase, manutenção ou diminuição na concentração celular atingida na fase estacionária de crescimento, e diminuição da infectividade, quando comparados aos parasitas selvagens.
- Obtivemos mutantes de L. (L.) amazonensis com um alelo do gene da arginase nocauteado por recombinação homóloga. Esses foram utilizados em uma segunda etapa de transfecção com construções para obtenção de mutantes nulos funcionais, com o domínio de degradação ddFKBP, ou nocaute dos dois alelos. Para isso foi

necessário complementar a cultura com putrescina, o que indica que a arginase desempenha papel essencial no parasita.

- Os parasitas heterozigotos, com um alelo da arginase nocauteado, apresentaram diminuição na massa protéica e atividade enzimática relativa à arginase, quando comparados com os parasitas selvagens.
- Os mutantes de *L. (L.) amazonensis* ARG-/kiddARG, com um alelo do gene da arginase nocauteado e o segundo alelo substituído por um cassete contendo o segmento ddFKP-ARG, não foram funcionais, ou seja, a presença de ligantes para estabilização do domínio ddFKBP não estabilizou a fusão. Em ensaios de "Western blot" com extrato protéico desses mutantes, não foi possível detectar marcação relativa à arginase.
- A construção obtida contendo a fusão ddFKBP-ARG não é funcional, pois não é capaz de regular a expressão de arginase nos mutantes de *L. (L.) amazonensis* ARG-/kiddARG, e também não foi capaz de suplementar a ausência de arginase nativa em *L. (L.) major* com o gene de arginase nocauteado.
- O sistema ddFKBP é funcional em *L. (L.) amazonensis*.
- Mutantes de L. (L.) amazonensis com os dois alelos do gene da arginase nocauteado por recombinação homóloga mostraram em seu fenótipo ausência de arginase detectável em "Western blot", e ausência de atividade enzimática relativa à arginase, quanto à produção de uréia.
- A arginase de L (L.) amazonensis pode desempenhar um papel regulador de resposta imune Th1/Th2, modulando a disponibilidade de arginina e/ ou modulando as atividades da arginase do macrófago e NOS, tanto do parasita como do macrófago, ao mesmo tempo em que

promove ou diminue o crescimento do parasita, produzido mais ou menos poliaminas.

Resumo

da Silva, MFL. Relação entre a localização celular da enzima arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel na infecção de macrófagos murinos [tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2010.

Nos hospedeiros mamíferos, os parasitas do gênero *Leishmania* vivem nos macrófagos se evadindo de mecanismos microbicidas dessas células, tais como a produção de óxido nítrico (NO). A produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos requer L-arginina como substrato, o mesmo aminoácido utilizado pela arginase para produzir ornitina e uréia. Logo, a arginase pode atuar na sobrevivência de *Leishmania* no hospedeiro competindo com a iNOS, reduzindo a produção de NO, além de seu papel na via de poliaminas, essencial para a replicação dessas células. Com isso, o objetivo desse estudo é elucidar o papel da arginase de *L. (L.) amazonensis* durante o ciclo de vida do parasita, particularmente, sua função no estabelecimento e na manutenção da infecção da célula hospedeira, e como esse papel seria exercido.

Nesse sentido, obtivemos soros policionais anti-arginase, a partir da arginase recombinante de *L. (L.) amazonensis* purificada, e esses soros foram utilizados na imunomarcação da enzima em preparações com formas promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Assim, determinamos a compartimentalização da arginase nos glicossomos tanto na forma promastigota do parasita como na forma amastigota, durante a infecção.

Além disso, obtivemos diversos mutantes com a expressão de arginase modificada quanto à quantidade e localização que nos permitiram avaliar a importância da compartimentalização dessa enzima nos glicossomos. Entre esses mutantes temos: superexpressores de arginase, com e sem sinal de endereçamento para glicossomo; parasitas com um alelo de arginase nocauteado e o outro substituído pelo cassete contendo o segmento ddFKBP-ARG, que teriam a expressão de arginase regulada pelo

domínio ddFKB sendo nocautes funcionais de arginase; e finalmente, também obtivemos parasitas nocaute nulo de arginase.

A análise desses mutantes permitiu conclusões importantes para o conhecimento da fisiologia do parasita e sua relação com o macrófago, revelando que o papel da arginase de *Leishmania* parece ser muito mais complexo do que o inicialmente postulado, participando na regulação de outras vias metabólicas do próprio parasita e da célula hospedeira. Paralelamente, também determinamos que o sistema ddFKBP é funcional em *L. (L.) amazonensis*, e assim pode ser utilizado no estudo funcional de outras proteínas importantes para esses parasitas.

Abstract

da Silva, MFL. The relationship between the cellular location of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its role during the macrophage infection [thesis]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2010.

In the mammal host, *Leishmania* parasites live inside macrophages escaping from their microbicidal mechanisms, such as the nitric oxide (NO) production. The macrophage NO production by inducible nitric oxide synthase (iNOS) requires L-arginine as substrate, the same amino acid required by arginase to generate ornithine and urea. So, arginase may play a dual role in *Leishmania* survival reducing the NO by competing with iNOS, and participating in the polyamines pathway, which is essential for the cells replication. Considering this, the aim of this study is to elucidate the role of *L*. *(L.) amazonensis* arginase during the parasite life cycle, mainly its function for the establishment and maintenance of the host cell infection, besides to elucidate the way that this enzyme plays its role.

With this in mind, we obtained polyclonal anti-arginase sera using purified recombinant *L.* (*L.*) amazonensis arginase, these sera were used in immunolabelling assays of *L.* (*L.*) amazonensis promastigotes and macrophages infected with *L.* (*L.*) amazonensis amastigotes. These experiments determined that arginase is compartmentalized in the glycosomes of both promastigotes and amastigotes, during infection.

Besides, we obtained several mutants with altered arginase expression, modified in terms of quantity and location, which permitted us to evaluate the importance of glycosome arginase compartmentalization. Among these mutants are: overexpressors of arginase, with and without glycosomal addressing signal; parasites with one arginase allele knocked out and the other one replaced by a sequence containing the ddFKBP-ARG fusion that would allow us to regulate arginase expression, working like a functional arginase knockout; and finally, we also obtained arginase null knockouts parasites. The mutants analyses lead us to important conclusions for the knowledge of the parasite physiology and its relationship with the host macrophage, revealing that the *Leishmania* arginase role appears to be more complex than previously thought, playing an important role in the regulation of other metabolic pathways, of the own parasite and of the host cell. In the other hand, we also determined that the ddFKBP system is functional in *L*. (*L.*) *amazonensis*, and then can be used for functional studies of other important parasite's proteins.

Bibliografia

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (2007). <u>Cellular and molecular</u> <u>immunology</u>. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Alexander, J. and K. Bryson (2005). "T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm." Immunol Lett **99**(1): 17-23.
- Armstrong, C. M. and D. E. Goldberg (2007). "An FKBP destabilization domain modulates protein levels in Plasmodium falciparum." <u>Nat</u> <u>Methods</u> 4(12): 1007-1009.
- Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses." Int J Parasitol **30**(12-13): 1269-1281.
- Balana-Fouce, R., C. Garcia-Estrada, et al. (2008). "Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable phenotype in the hemoflagellate Leishmania major." <u>BMC Microbiol</u> 8: 113.
- Balana-Fouce, R., R. M. Reguera, et al. (1998). "The pharmacology of leishmaniasis." <u>Gen Pharmacol</u> **30**(4): 435-443.
- Banaszynski, L. A., L. C. Chen, et al. (2006). "A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules." <u>Cell</u> **126**(5): 995-1004.
- Barrio, A., M. C. Mora, et al. (2007). "Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina." <u>Am J Trop Med Hyg</u> 77(4): 636-639.
- Basu, N. K., L. Kole, et al. (1997). "Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, Leishmania donovani." <u>FEMS Microbiol Lett</u> 156(1): 43-47.
- Beverley, S. M. (2003). "Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age." <u>Nat Rev Genet</u> **4**(1): 11-19.
- Birk, Y. (1985). "The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsininhibitor from soybeans." Int J Pept Protein Res **25**(2): 113-131.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." <u>Nucleic Acids Res</u> 7(6): 1513-1523.

- Bogdan, C. and M. Rollinghoff (1999). "How do protozoan parasites survive inside macrophages?" <u>Parasitol Today</u> **15**(1): 22-28.
- Boucher, J. L., C. Moali, et al. (1999). "Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization." <u>Cell Mol Life Sci</u> 55(8-9): 1015-1028.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." <u>Annu Rev Biochem</u> **63**: 175-195.
- Camargo, E. P. (1979). Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico. <u>Instituto de Química</u>. São Paulo, Universidade de São Paulo.
- Camargo, E. P. (1999). "Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit." <u>Adv Parasitol</u> **42**: 29-112.
- Camargo, E. P., C. Sbravate, et al. (1992). "Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids." <u>J Parasitol</u> **78**(1): 40-48.
- Carvajal, N., M. Salas, et al. (1999). "Manganese-dependent inhibition of human liver arginase by borate." J Inorg Biochem **77**(3-4): 163-167.
- Castilho, T. M., J. J. Shaw, et al. (2003). "New PCR assay using glucose-6phosphate dehydrogenase for identification of Leishmania species." J <u>Clin Microbiol</u> **41**(2): 540-546.
- Corraliza, I. M., G. Soler, et al. (1995). "Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrowderived macrophages." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 206(2): 667-673.
- Cruz, A., C. M. Coburn, et al. (1991). "Double targeted gene replacement for creating null mutants." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **88**(16): 7170-7174.
- Cruz, A. K., R. Titus, et al. (1993). "Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in Leishmania by targeting." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> 90(4): 1599-1603.
- Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." <u>Exp Mol Pathol</u> **72**(2): 132-141.
- da Silva, E. R. (2001). Caracterização do gene da arginase de Leishmania Leishmania amazonensis e sua expressão em Escherichia coli. .

Instituto de Ciencias Biomedicas. Sao Paulo, Universidade de Sao Paulo. **doutorado**.

- da Silva, E. R., T. M. Castilho, et al. (2002). "Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase and its protein structure prediction." <u>Int J Parasitol</u> **32**(6): 727-737.
- da Silva, E. R., M. F. da Silva, et al. (2008). "Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from Leishmania (Leishmania) amazonensis and subcellular localization of native enzyme." Mol Biochem Parasitol **159**(2): 104-111.
- da Silva, R. and D. L. Sacks (1987). "Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation." <u>Infect Immun</u> 55(11): 2802-2806.
- de Andrade Stempliuk, V. and L. M. Floeter-Winter (2002). "Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in Leishmania." Int J Parasitol **32**(4): 437-447.
- Descoteaux, A. and S. J. Turco (1999). "Glycoconjugates in Leishmania infectivity." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1455**(2-3): 341-352.
- Faber, W. R., L. Oskam, et al. (2003). "Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis." J Am Acad Dermatol **49**(1): 70-74.
- Franke, E. D., P. B. McGreevy, et al. (1985). "Growth cycle-dependent generation of complement-resistant Leishmania promastigotes." J <u>Immunol</u> 134(4): 2713-2718.
- Fung, K. and C. Clayton (1991). "Recognition of a peroxisomal tripeptide entry signal by the glycosomes of Trypanosoma brucei." <u>Mol Biochem</u> <u>Parasitol</u> 45(2): 261-264.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." <u>Nature</u> 288(5789): 373-376.
- Gaur, U., S. C. Roberts, et al. (2007). "An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis." <u>J Immunol</u> **179**(12): 8446-8453.

- Genestra, M., W. J. de Souza, et al. (2003). "Comparative analysis of the nitric oxide production by Leishmania sp." <u>Med Microbiol Immunol</u> **192**(4): 217-223.
- Genestra, M., W. J. Souza, et al. (2006). "Nitric oxide biosynthesis by Leishmania amazonensis promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms." <u>Arch Microbiol</u> **185**(5): 348-354.
- Grody, W. W., G. J. Dizikes, et al. (1987). "Human arginase isozymes." <u>Isozymes Curr Top Biol Med Res</u> **13**: 181-214.
- Guerra-Giraldez, C., L. Quijada, et al. (2002). "Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in Trypanosoma brucei." J <u>Cell Sci</u> **115**(Pt 13): 2651-2658.
- Ha, D. S., J. K. Schwarz, et al. (1996). "Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania." <u>Mol Biochem Parasitol</u> 77(1): 57-64.
- Haanstra, J. R., A. van Tuijl, et al. (2008). "Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> 105(46): 17718-17723.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. <u>Nucl. Acids.</u> <u>Symp. Ser.</u> **41**: 95-98.
- Hart, D. T., P. Baudhuin, et al. (1987). "Biogenesis of the glycosome in Trypanosoma brucei: the synthesis, translocation and turnover of glycosomal polypeptides." <u>EMBO J</u> 6(5): 1403-1411.
- Hedin, S. G. (1895). " Eine Methode das Lysin zu isoliren, nebst einigen Bemerkungen uber das Lysatinin. ." <u>Z Physiol Chem</u> **21**: 297-305.
- Herm-Gotz, A., C. Agop-Nersesian, et al. (2007). "Rapid control of protein level in the apicomplexan Toxoplasma gondii." <u>Nat Methods</u> 4(12): 1003-1005.
- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1987). "Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite." <u>Science</u> 235(4787): 473-476.

- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1988). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 157(1): 87-94.
- Holtta, E. and P. Pohjanpelto (1982). "Polyamine dependence of Chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity." <u>Biochim Biophys Acta</u> **721**(4): 321-327.
- Hrabak, A., T. Bajor, et al. (1996). "The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide (NO) formation, on arginase." <u>FEBS Lett</u> **390**(2): 203-206.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> 84(24): 9265-9269.
- Iniesta, V., J. Carcelen, et al. (2005). "Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease." <u>Infect Immun</u> **73**(9): 6085-6090.
- Iniesta, V., L. C. Gomez-Nieto, et al. (2001). "The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages." <u>J Exp Med</u> **193**(6): 777-784.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major." <u>Science</u> **309**(5733): 436-442.
- Jeffcoate, S. L. and N. White (1974). "Use of benzamidine to prevent the destruction of thyrotropin-releasing hormone (TRH) by blood." <u>J Clin</u> <u>Endocrinol Metab</u> **38**(1): 155-157.
- Jenkinson, C. P., W. W. Grody, et al. (1996). "Comparative properties of arginases." <u>Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol</u> **114**(1): 107-132.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn, et al. (1990). "Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." <u>Mol Cell Biol</u> **10**(3): 1084-1094.
- Krazy, H. and P. A. Michels (2006). "Identification and characterization of three peroxins--PEX6, PEX10 and PEX12--involved in glycosome

biogenesis in Trypanosoma brucei." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1763**(1): 6-17.

- Krebs, H. A. and K. Henseleit (1932). "Studies on urea formation in the animal organism." <u>Z. Physiol. Chem.</u> **210**: 33-66.
- Kuge, O. and M. Nishijima (1997). "Phosphatidylserine synthase I and II of mammalian cells." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1348**(1-2): 151-156.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**(5259): 680-685.
- Louassini, M., M. Foulquie, et al. (1999). "Citric-acid cycle key enzyme activities during in vitro growth and metacyclogenesis of Leishmania infantum promastigotes." <u>J Parasitol</u> **85**(4): 595-602.
- Madeira da Silva, L., K. L. Owens, et al. (2009). "Regulated expression of the Leishmania major surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**(18): 7583-7588.
- Marletta, M. A., P. S. Yoon, et al. (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate." <u>Biochemistry</u> 27(24): 8706-8711.
- Medina-Acosta, E. and G. A. Cross (1993). "Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure." <u>Mol</u> <u>Biochem Parasitol</u> 59(2): 327-329.
- Moncada, S. and E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." <u>FASEB J</u> **9**(13): 1319-1330.
- Moss, D. E. and D. Fahrney (1978). "Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources." <u>Biochem</u> <u>Pharmacol</u> **27**(23): 2693-2698.
- Moyersoen, J., J. Choe, et al. (2003). "Characterization of Trypanosoma brucei PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins." <u>Eur J Biochem</u> 270(9): 2059-2067.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." <u>Cold Spring Harb Symp Quant</u> <u>Biol</u> **51 Pt 1**: 263-273.

- Munder, M., K. Eichmann, et al. (1998). "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype." J Immunol 160(11): 5347-5354.
- Murta, S. M., T. J. Vickers, et al. (2009). "Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase and the synthesis of 10-CHO-THF are essential in Leishmania major." <u>Mol Microbiol</u> **71**(6): 1386-1401.
- Nourbakhsh, F., S. R. Uliana, et al. (1996). "Characterisation and expression of a stage-regulated gene of Leishmania major." <u>Mol Biochem Parasitol</u> **76**(1-2): 201-213.
- Opperdoes, F. R., P. Baudhuin, et al. (1984). "Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate Trypanosoma brucei." <u>J Cell Biol</u> **98**(4): 1178-1184.
- Opperdoes, F. R. and J. P. Szikora (2006). "In silico prediction of the glycosomal enzymes of Leishmania major and trypanosomes." <u>Mol</u> <u>Biochem Parasitol</u> **147**(2): 193-206.
- Palmer, R. M., D. S. Ashton, et al. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." <u>Nature</u> **333**(6174): 664-666.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." <u>Nature</u> 327(6122): 524-526.
- Papageorgiou, F. T. and K. P. Soteriadou (2002). "Expression of a novel Leishmania gene encoding a histone H1-like protein in Leishmania major modulates parasite infectivity in vitro." <u>Infect Immun</u> **70**(12): 6976-6986.
- Paveto, C., C. Pereira, et al. (1995). "The nitric oxide transduction pathway in Trypanosoma cruzi." J Biol Chem **270**(28): 16576-16579.
- Pegg, A. E. (1986). "Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes." <u>Biochem J</u> 234(2): 249-262.
- Penha, L. L., C. B. Sant'Anna, et al. (2009). "Sorting of phosphoglucomutase to glycosomes in Trypanosoma cruzi is mediated by an internal domain." <u>Glycobiology</u> **19**(12): 1462-1472.

- Qadoumi, M., I. Becker, et al. (2002). "Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **70**(8): 4638-4642.
- Reczkowski, R. S. and D. E. Ash (1992). "EPR Evidence for Binuclear Mn(I1) Centers in Rat Liver Arginase." <u>J Am Chem Soc</u> **114**: 10992-10994.
- Reguera, R. M., R. Balana-Fouce, et al. (2009). "Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice." <u>Mol Biochem Parasitol</u> **165**(1): 48-56.
- Reguera, R. M., B. L. Tekwani, et al. (2005). "Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development." <u>Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol</u> **140**(2): 151-164.
- Reinach, F. C. and R. Karlsson (1988). "Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of chicken skeletal muscle troponin C." <u>J Biol Chem</u> 263(5): 2371-2376.
- Rey, L. (1992). <u>Bases da parasitologia médica</u>. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Roberts, S. C., M. J. Tancer, et al. (2004). "Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants." <u>J Biol Chem</u> 279(22): 23668-23678.
- Ross, R. (1903). "(a) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan." <u>British Medical Journal</u> **2**: 1261.
- Sacks, D. L., P. F. Pimenta, et al. (1995). "Stage-specific binding of Leishmania donovani to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan." J <u>Exp Med</u> 181(2): 685-697.
- Salas, M., R. Rodriguez, et al. (2002). "Insights into the reaction mechanism of Escherichia coli agmatinase by site-directed mutagenesis and molecular modelling." <u>Eur J Biochem</u> **269**(22): 5522-5526.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). <u>Molecular Cloning: a laboratory</u> <u>manual.</u> New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F. and A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." <u>J Mol</u> <u>Biol</u> **94**(3): 441-448.

Saúde, F.-M. d. (2002) "Leishmanioses." <u>Boletim Eletronico Epidemiologico</u> 06.

- Saúde, M. r. d. (2000). Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília.
- Saúde., B. M. r. d. S. d. S. d. V. n. e. (2007). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. . Brasília, Editora do Ministério da Saúde.
- Schulze, E. and E. Steiger (1886). "Ueber das Arginin." <u>Z Physiol Chem</u> **11**: 43-65.
- Scolnick, L. R., Z. F. Kanyo, et al. (1997). "Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function." <u>Biochemistry</u> **36**(34): 10558-10565.
- Shapiro, S. Z., J. Naessens, et al. (1984). "Analysis by flow cytometry of DNA synthesis during the life cycle of African trypanosomes." <u>Acta Trop</u> **41**(4): 313-323.
- Shih, S., H. Y. Hwang, et al. (1998). "Localization and targeting of the Leishmania donovani hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase to the glycosome." <u>J Biol Chem</u> 273(3): 1534-1541.
- Simao, R. C. and S. L. Gomes (2001). "Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete Blastocladiella emersonii." <u>J Bacteriol</u> **183**(7): 2280-2288.
- Smirlis, D., S. N. Bisti, et al. (2006). "Leishmania histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces Leishmania infectivity in vivo." <u>Mol Microbiol</u> **60**(6): 1457-1473.
- Smith, D. F. and M. Parsons (1996). <u>Molecular biology of parasitic protozoa</u>. Oxford ; New York, IRL Press at Oxford University Press.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **76**(9): 4350-4354.
- Uliana, S.R., Affonso, M. H., Camargo, E. P., Floeter-Winter, L. M. (1991).
 "Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence." <u>Exp Parasitol</u>. **72**(2):157-63.

- Van Nieuwenhove, S., P. J. Schechter, et al. (1985). "Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO (DL-alphadifluoromethylornithine), an inhibitor of ornithine decarboxylase; first field trial." <u>Trans R Soc Trop Med Hyg</u> **79**(5): 692-698.
- Vincendeau, P., A. P. Gobert, et al. (2003). "Arginases in parasitic diseases." <u>Trends Parasitol</u> **19**(1): 9-12.
- Wanasen, N. and L. Soong (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection." <u>Immunol Res</u> 41(1): 15-25.
- Wang, W. W., C. P. Jenkinson, et al. (1995). "Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **210**(3): 1009-1016.
- WHO. (2010). "<u>http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/.</u>" Retrieved 10 de janeiro, 2010.
- Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." <u>Biochem J</u> 336 (Pt 1): 1-17.

Anexos