Emerson Augusto Castilho Martins

Caracterização fisiológica e genética do transporte de arginina em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Physiologic and genetic characterization of arginine transport in *Leishmania (Leishmania)* amazonensis

São Paulo

2011

Emerson Augusto Castilho Martins

Caracterização fisiológica e genética do transporte de arginina em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Physiologic and genetic characterization of arginine transport in *Leishmania (Leishmania)* amazonensis

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: Dra. Lucile Maria Floeter-Winter

São Paulo

2011

Martins, Emerson A. C.

Caracterização fisiológica e genética do transporte de arginina em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 146 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Transporte de aminoácido 2. Fisiologia da relação parasita-hospedeiro I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

Lista de Preferências

Alegrias, as desmedidas. Dores, as não curtidas.

> Casos, os inconcebíveis. Conselhos, os inexequíveis.

Meninas, as veras. Mulheres, insinceras.

> Orgasmos, os múltiplos. Ódios, os mútuos.

Domicílios, os passageiros. Adeuses, os bem ligeiros.

> Artes, as não rentáveis. Professores, os enterráveis.

Prazeres, os transparentes. Projetos, os contingentes.

> Inimigos, os delicados. Amigos, os estouvados.

Cores, o rubro. Meses, outubro.

> Elementos, os fogos. Divindades, o logos.

Vidas, as espontâneas. Mortes, as instantâneas.

> Bertolt Brecht Trad. Paulo César Souza

Agradecimentos

À minha orientadora, Lucile M. Floeter Winter, por ter aceitado o desafio de me orientar mesmo sabendo que eu nunca havia visto um gel de agarose; pelas valiosas discussões científicas, e especialmente pela dedicação e rapidez com que corrigiu este e todos os outros trabalhos, mesmo aos finais de semana, numa demonstração incrível de seu amor pela ciência.

À minha mãe, Regina M. Castilho Martins; meu pai, Elsio Martins e minhas irmãs, Elaine R. Castilho Martins e Erica M. Castilho Martins: sem vocês nada disso aqui seria possível, e nem importância teria. Obrigado pelo amor e carinho que temos, pelo "*painancial* support" em tempos difíceis, e por entender a minha ausência mesmo com nossos corações juntos.

À minha mulher, Maíra Pombo, pela presença ao meu lado em todo o decorrer do meu doutoramento, dos momentos mais importantes aos mais desesperançados, com compreensão de minha ausência, frequentemente em decorrência deste trabalho.

Aos meus colaboradores, Luiz R. Sardinha, pela ajuda na execução de experimentos desse trabalho; ao professor Arial M. Silber, pelas discussões valiosas; à professora Sílvia B. Uliana, pela biblioteca de cosmídeos cedida; às professoras Edna Haapalainen e Rita Sinigaglia-Coimbra, pelo auxílio na microscopia eletrônica.

Aos meus colegas de laboratório, alunos e técnicos, pela indispensável ajuda nesse trabalho.

À FAPESP, pelo financiamento deste trabalho.

Índice

1 Introdução	1
1.1 Aspectos gerais	1
1.2 Ciclo de vida	2
1.3 Mecanismos de regulação gênica em Leishmania	4
1.4 Metabolismo de arginina na infecção	6
1.5 Transporte de L-arginina	9
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 Material e Métodos	13
3.1 Organismos	13
3.1.1 Leishmania	13
3.1.2 Macrófagos	14
3.1.3 Bactérias	14
3.2 Ensaios com células	15
3.2.1 Ensaios de infecção	15
3.2.2 Isolamento dos fagolisossomos	15
3.2.2.1 Gradiente descontínuo de sacarose	15
3.2.2.2 Citometria de fluxo com "sorting"	16
3.2.3 Ensaio de tomada de aminoácidos	17
3.2.4 Ensaio de privação de aminoácidos	17
3.3 Ensaios com ácidos nucleicos	18
3.3.1 Extração de DNA Genômico	18
3.3.2 Extração de DNA de plasmídeo e cosmídeo	18
3.3.3 Extração de RNA Total	19
3.3.3.1 Determinação da meia-vida de mRNA	19
3.3.3.2 Transcrição Reversa	20
3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	20
3.3.4.1 Oligonucleotídeos utilizados	20
3.3.4.2 PCR de DNA	20
3.3.4.3 RT-PCR	21
3.3.4.4 PCR Quantitativo	21
Curva de calibração	21
PCR em Tempo Real	22
3.3.5 Fracionamento de ácidos nucleicos	22
3.3.5.1 Fracionamento de DNA	22
Digestão de DNA	22
Eletroforese em gel de agarose	22
3.3.5.2 Fracionamento de RNA	23
3.3.5.3 Southern Blot	23
3.3.5.4 Northern blot	23
3.3.6 Hibridação de ácidos nucleicos	23
3.3.6.1 Marcação de sonda de DNA	23
3.3.6.2 Reação de hibridação	24
3.3.6.3 Lavagem das membranas e exposição	24
3.3.6.4 "Screening" de biblioteca de cosmídeo	24
3.3.7 Clonagem	25
3.3.7.1 Purificação de fragmentos de DNA	25

	~ -
3.3.7.2 Ligação de fragmentos de DNA em plasmideo	25
Vetores utilizados	25
Ligação de DNA	26
3.3.7.3 Transformação de bactérias competentes	26
Preparação de bactérias competentes.	26
Transformação com plasmídeo e cosmídeo	27
3 3 7 4 Transfecção de macrófagos J774	27
Curva de ação de neomicina em macrófagos .1774	27
Transferção e seleção clonal	
3 3 7 5 Transferção de Leishmania	
2.2.9 Sequenciamento de DNA	02 20
4 Desultades	20
4 Resultations	30
4.1 Purificação de fagolisossomos	30
4.1.1 Avaliação da infecção	30
4.1.2 Purificação por gradiente de sacarose	32
4.1.3 Purificação por citometria de fluxo com "sorting"	36
4.1.4 Construção de macrófago com marcação de membrana de fagolisossomo.	40
4.1.5 Purificação de fagolisossomos pEGFP-Lamp1	45
4.2 Caracterização do gene do transportador de arginina de L. (L.) amazonensis	46
4.2.1 Busca inicial	46
4.2.2 Varredura da biblioteca de cosmídeo	49
4 2 3 Sequenciamento da Fase Aberta de Leitura (ORF)	55
4 2 4 Maneamento da região 5'UTR	58
4 2 5 Caracterização da região 3'LITR	64
$4.2.6$ Construção para transferição em L_{1} amazonansis	0∓ 7∩
4.2.0 Constitução para transfecção em L. (L.) amazonensis	
4.3 Availação da expressão dos genes	12
4.3.1 Quantificação de mRNA	
4.3.2 Quantificação do mRNA que codifica o transportador de arginina ao longo	
curva de crescimento	73
4.3.3 Estabilidade do mRNA do transportador	75
4.4 Fisiologia do transporte de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	76
4.4.1 Caracterização fisiológica do transportador de arginina de L. (L.) amazone	nsis
	76
4.4.2 Resposta à privação de arginina	78
4.4.3 Influência da interrupção da via da arginase no transporte de arginina	80
5 Discussão	82
5.1 Tentativas de padronização de purificação de fagossomos e ensaios de tomada	de
arginina	82
5.2 Caracterização do gene que codifica o transportador de arginina.	87
5.3 Regulação do transporte e da expressão do gene que codifica o transportado	de
arginina	89
6 Conclusões	90
7 Resumo	
9 Abstract	100
0 AUSTI dul	100
	101
	112
Anexo II	115
Anexo III	119

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema geral do metabolismo de L-arginina em mamíferos Figura 2. Representação do metabolismo de L-arginina na interação entre <i>Leishi</i>	7 mania e
macrófago	11
Figura 3 Teste de infectividade de L (L) amazonensis em macrófagos .1774	31
Figura 4. Detalhes das infeccões de promastigotas de / (/) amazonensis EGEE	² em .1774 31
Figura 5. Isolamento de facolisossomos por gradiente de sacarose	32
Figura 6. Contaminação de fagolisossomos por promastigotas livres	
Figura 7. Avaliação da integridado das organolas purificadas	
Figura 7. Availação da lintegridade das organeias purilidadas	
Figura 0. Citametria da fluva da fagaliazzamas purificadas por gradiante da ase	
Figura 9. Citometria de fluxo de lagoilsossomos purificados por gradiente de saci	alose
Figura 10. Citometria de fluxo pre-"sorting	
Figura 11. Analise da amostra separada em R2	
Figura 12. Análise da amostra separada em R3	
Figura 13. Microscopia de fagolisossomos purificados com citometria de fluxo	
Figura 14. Avaliação de especificidade de marcação de compartimentos ácidos	40
Figura 15. Estratégia de construção do plasmídeo pEGFP-Lamp	41
Figura 16. Avaliação de funcionalidade de pEGFP-C1 em macrófagos	42
Figura 17. Sequências de Lamp1	43
Figura 18. Marcação de GFP-Lamp1 indica a membrana do fagossomo	44
Figura 19. Curva dose-resposta de neomicina em macrófagos	44
Figura 20. Avaliação de marcação pEGFP-Lamp1 em citômetro de fluxo.	
Figura 21 Avaliação microscónica de pEGEP-I amp1 em fagolisossomos	46
Figura 22 PCR para isolamento do fragmento de DNA codificador do transportar	dor de arginina 47
Figura 23. Confirmação de fragmento de DNA contendo o gene que codifica o tra	ansportador de
Figura 24. Sequencia de AAP3 de L. (L.) donovani	
Figura 25. Varredura da biblioteca de cosmideos	
Figura 26. "Southern blot" para transportador de arginina	51
Figura 27. Confirmação de clones com fragmento esperado	52
Figura 28. Sequência parcial do transportador de arginina de L. (L.) amazonensis	s53
Figura 29. Oligonucleotídeos para obtenção de complemento da sequência do tra	ansportador54
Figura 30. Sequência completa da ORF que codifica o transportador de arginina	de <i>L. (L.)</i>
amazonensis	57
Figura 31. Obtenção da região 5'UTR do gene do transportador de arginina de L.	. (L.)
amazonensis	
Figura 32. Digestão de DNA de "mini-prep" para verificar presenca de inserto	59
Figura 33. Sequência do fragmento menor correspondente à região 5'UTR do ge	ne que codifica o
transportador de arginistica de $I = I = I$ amazonensis	60 BO
Figure 34. Sequência do fragmento major correspondente à região 5'LITP do ger	
transportador do arginina do $L_{(L)}$ amazononsis	
L'ansponduoi de argiñas EUITD de gans que sodifias e transportador d	
Figura 35. Alinnamento de regiões 5 0 i R do gene que codifica o transportador d	e arginina de L.
Figura 36. Fragmentos contendo a região 3'UTR do gene que codifica o transpor	tador de arginina
de L. (L.) amazonensis	65
Figura 37. Sequência parcial da região 3'UTR do gene que codifica o transportac	lor de arginina de
L. (L.) amazonensis	66
Figura 38. Sequencia de nucleotídeos da região 3'UTR do gene que codifica o tra	ansportador de
arginina de L. (L.) amazonensis	
Figura 39. Possível orientação dos genes do transportador de arginina de L. (L.)	amazonensis68
Figura 40. Seguência de fragmento entre as duas cópias do gene que codifica o	transportador de
arginina de L. (L.) amazonensis	69
Figura 41 Estratégia de construção de plasmídeo para obter o nocaute de transi	oortador de
arginina em 1 (1) amazonensis	71

Figura 42.	Sequência da construção para nocaute de transportador de arginina em <i>L. (L.)</i> amazonensis
Figura 43.	Fragmentos amplificados para PCR quantitativo em 5'UTR do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>
Figura 44.	Curvas de calibração para PCR quantitativo de RNA codificador do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>
Figura 45.	Expressão de mRNA de transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i> ao longo da curva de crescimento de promastigotas
Figura 46.	Caracterização do mRNA codificador do transportador de arginina em <i>L. (L.)</i> amazonensis
Figura 47.	Decaimento de mRNA de promastigotas de L. (L.) amazonensis
Figura 48.	Tomada de arginina em função do tempo por promastigotas de L. (L.) amazonensis77
Figura 49.	Curva de tomada de arginina em função da concentração do aminoácido78
Figura 50.	Avaliação da resposta de promastigotas de L. (L.) amazonensis em fase log
	intermediária à privação de arginina79
Figura 51.	Tomada de arginina por promastigotas de L. (L.) amazonensis em duas fases de
	crescimento
Figura 52.	Tomada de arginina em mutantes de L. (L.) amazonensis nulos para arginase80
Figura 53.	Tomada de arginina em mutantes arg81

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais

Protozoários do gênero *Leishmania* (Ross 1903) pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São organismos digenéticos, parasitas obrigatórios, com uma fase da vida no tubo digestório de um díptero flebotomíneo e uma fase da vida em hospedeiro vertebrado. No hospedeiro invertebrado, possuem uma forma flagelada, livre nadante no tubo digestório, chamada de promastigota. Quando inoculados no hospedeiro vertebrado, os promastigotas são fagocitados e se diferenciam em formas amastigotas, sem flagelo aparente, intracelular obrigatório. Retornam ao hospedeiro invertebrado em um repasto sanguíneo, onde se diferenciarão em promastigotas novamente, fechando o ciclo (Rey 2002).

O gênero *Leishmania* é dividido em 2 subgêneros, de acordo com a posição ocupada no tubo digestório do hospedeiro invertebrado (Lainson e Shaw 1987): *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*, sendo que espécies deste último são encontradas exclusivamente nas Américas. São conhecidas 30 espécies de *Leishmania*, 10 na Europa, Ásia e África com registros de infecção humana por 7 delas e 20 nas Américas, das quais 6 espécies de *Leishmania (Leishmania)* e 8 *Leishmania (Viannia)* infectam humanos (Shaw 1994).

Organismos do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos responsáveis por um conjunto de quadros clínicos que constituem doenças genericamente conhecidas como Leishmaniose. Por ano, cerca de 70.000 pessoas no mundo morrem de leishmaniose, o que a coloca como segunda protozoose que mais registra óbitos, sendo superada apenas pela malária (Alvar e col. 2006). Ocorre como doença endêmica em 88 países em áreas tropicais e subtropicais, e estima-se que haja cerca de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo, cerca de 2 milhões de novos casos por ano, com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (Desjeux 1996). Esses números podem estar subestimados porque a parasitose atinge principalmente o 30. Mundo com maior ocorrência em áreas rurais, onde o acesso da população ao atendimento médico é difícil, o diagnóstico usa técnicas que não são capazes de identificar todas as fases e formas da doença e nem sempre são registrados os casos diagnosticados (Desjeux 2004).

A manifestação da doença pode ocorrer sob 4 formas clínicas, embora essa manifestação dependa do tipo de parasita encontrado e do estado imunológico do paciente (Rey 2002):

- leishmaniose cutânea, com a ocorrência de lesões cutâneas localizadas com ulcerações ou não;
- leishmaniose cutânea difusa, com disseminação de lesões não ulcerativas pelo corpo do paciente;
- leishmaniose mucocutânea, caracterizada pela presença de ulcerações deformativas em mucosas do nariz, boca e faringe, e
- leishmaniose visceral, com lesões disseminadas pelo fígado, baço, linfonodos e medula óssea, com progressão que pode levar a óbito.

1.2 Ciclo de vida

No hospedeiro invertebrado, em sua fase promastigota, os parasitas reproduzem-se por divisão binária, com as linhagens sendo consideradas clonais (Tibayrenc e col. 1990) embora recentemente tenha sido demonstrada a ocorrência de troca de material genético entre indivíduos, sugerindo que a reprodução sexuada

pode ocorrer na natureza (Akopyants e col. 2009). No início da fase replicativa, os promastigotas, ocupam o tubo digestório dos insetos, e se apresentam com uma forma mais alongada, menos infectiva, denominada de promastigota procíclico. Essas formas ficam aderidas ao epitélio do tubo digestório do inseto. Considerandose que os parasitas foram adquiridos em um repasto sanguíneo, a digestão e a multiplicação do parasita levam ao esgotamento do suprimento alimentar. Esse parece ser um dos sinais que levam os parasitas a se diferenciar, parando a divisão celular, soltando-se do epitélio e migrando para as porções anteriores do tubo digestório, numa forma mais oval e infectiva denominada promastigota metacíclico, (Sacks e Perkins 1984).

Com um novo repasto sanguíneo do inseto, as formas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro vertebrado. O início da infecção do parasita no hospedeiro vertebrado é uma fase crítica, pois o parasita deve sobreviver aos mecanismos de defesa recrutados pelo sistema imunológico logo após a picada do inseto. A picada do inseto leva a uma pequena hemorragia local. Dessa forma, há interação no local dos componentes do sangue do vertebrado, da saliva do inseto e da *Leishmania* (Titus e Ribeiro 1988; Charlab e col. 1999; Menezes e col. 2008).

No hospedeiro vertebrado, a forma metacíclica é fagocitada por fagócitos profissionais e se diferencia em amastigota, forma intracelular obrigatória nos hospedeiros vertebrados. O início da infecção no mamífero é uma fase crítica para o parasita, já que o mesmo deve ser fagocitado mas deve, de alguma forma, contornar os mecanismos de defesa do hospedeiro para garantir sua sobrevivência, escapando da ativação do sistema inato de defesa do organismo. A apresentação de moléculas de superfície que simulem uma célula em apoptose pode ser um dos mecanismos, já que poderia sinalizar aos macrófagos um alvo à fagocitose sem desencadear resposta inflamatória. Nesse contexto, a fosfatidilserina ocupa lugar de

destaque, uma vez que faz parte do repertório de sinalizações de células em apoptose e também é exposta na face externa dos parasitas amastigotas (Balanco e col. 2001). Em promastigotas, há a exposição de fosfatidilserina por metacíclicos, no entanto evidências mostram que esses parasitas estão, de fato, entrando em apoptose, embora sejam importantes na cooperação com metacíclicos viáveis durante a infecção (van Zandbergen e col. 2006; Wanderley e col. 2009).

Outro mecanismo que entrou em evidência é a entrada nos macrófagos via neutrófilos, teoria conhecida como "cavalo de troia". Estudos *in vivo* demonstram que os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao local da infecção, e fagocitam as *Leishmania* que sobrevivem. Eles entram, então, em apoptose e são fagocitados por macrófagos. A entrada nos macrófagos via neutrófilos em apoptose evita a ativação de macrófagos. Os parasitas passam para os macrófagos e lá podem se adaptar às novas condições fisiológicas antes do macrófago desencadear resposta oxidativa (van Zandbergen e col. 2004; Peters e col. 2008).

1.3 Mecanismos de regulação gênica em Leishmania

Leishmania, assim como os demais tripanosomatídeos, apresenta mecanismos de transcrição peculiar entre os eucariotos, sem a presença em cada gene de um sítio definido de ligação da RNA polimerase II (RNA polII) (Myler e col. 1999; Monnerat e col. 2004). Assim, seu genoma é organizado em grandes estruturas contínuas de transcrição em tandem, no mesmo sentido, de forma que a transcrição se inicia em um ponto e prossegue continuamente ao longo do cromossomo (Landfear e col. 1983).

A transcrição ocorre com a formação de grandes RNAs policistrônicos sem informação individualizada (Tschudi e Ullu 1988), de forma que a

individualização das diferentes informações ocorre depois da transcrição. A identificação de ocorrência desse fenômeno ocorreu quando, ao estudar a sequência de mRNA de glicoproteínas de superfície de *Trypanosoma brucei*, encontrou-se uma sequência inicial consensual de 39 nucleotídeos em sua região 5' ausente nas sequências genômicas dos genes estudados (Boothroyd e Cross 1982). Essa sequência foi, sucessivamente, sendo identificada em outros mRNA do tripanosomatídeo e de outros membros da família (De Lange e col. 1984A; De Lange e col. 1984b; Kooter e col. 1984). Essa sequência não ficava nos RNAs onde era encontrada, sendo a adição por *"trans*-splicing" a explicação para sua ocorrência. Essa sequência foi chamada de mini-exon ou "spliced leader" (SL), e seu mecanismo de adição via *"trans*-splicing" ao RNA é bastante semelhante ao *"cis*-splicing" (Mayer e Floeter-Winter 2005).

Enquanto os eucariotos podem se utilizar de mecanismos de regulação de expressão por controle de transcrição, com a ligação de fatores que potenciam ou diminuem a taxa de transcrição, a ausência das sequências promotoras de RNA polII em *Leishmania* leva esses organismos a apresentar a regulação de sua expressão gênica em outros níveis, como a alteração no nível de maturação do mRNA (poliadenilação e "*trans*-splicing") ou na estabilidade de seu mRNA (Flinn e Smith 1992). Sequências presentes nas regiões não transcritas a 5' e 3' (5'UTR e 3'UTR) da fase aberta de leitura (ORF) são capazes de controlar a sinalização para a degradação do mRNA, de forma que a quantidade de mRNA presente em um determinado momento ("steady-state") pode ser alterada de acordo com essas sequências (Clayton e Shapira 2007). Muito pouco se sabe ainda sobre a regulação da tradução nos tripanosomatídeos, com o conhecimento se limitando a identificação de alguns complexos que se ligam nas regiões 5'UTR em interação com regiões 3'UTR, mas os mecanismos de ação ainda não estão claros (Clayton e Shapira

5

2007; Haile e Papadopoulou 2007).

1.4 Metabolismo de arginina na infecção

Após a fagocitose pelo macrófago, o vacúolo fagocítico ou fagossomo funde-se com lisossomos formando o compartimento celular denominado fagolisossomo. Essa é uma fase bastante crítica para a sobrevida do parasita, tanto pela limitação de acesso a nutrientes quanto pela presença de compostos sabidamente microbicidas. O destino dos parasitas no hospedeiro vertebrado é determinado pelo estado de ativação dos macrófagos (Martinez e col. 2009). Um dos principais meios de defesa dos macrófagos é a explosão respiratória, caracterizada produção de compostos reativos de oxigênio, especialmente o óxido nítrico (NO) (Murray 1982; Murray e Cartelli 1983; Murray e col. 1989; Liew e col. 1990; Assreuy e col. 1994; Liew e col. 1999; Murray e Nathan 1999).

A produção do NO ocorre nos macrófagos pela atividade da sintase induzível do óxido nítrico (iNOS). Essa enzima utiliza o aminoácido L-arginina como substrato, gerando citrulina e óxido nítrico (Hibbs e col. 1987; Iyengar e col. 1987; Marletta e col. 1988). Esse processo ocorre quando há resposta imunológica do tipo Th1, caracterizada por produção de interferon gama (IFN-γ). No entanto, dependendo das condições do hospedeiro, pode ser desencadeada uma resposta do tipo Th2, caracterizada por produção de interleucinas 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10 e IL-13). Nesse tipo de resposta, ocorre a ativação da arginase, enzima que também utiliza a L-arginina como substrato, produzindo L-ornitina e ureia (Weil e Russell 1934; Baldwin 1935; Niedbala e col. 1999). Enquanto uma resposta Th1 tende a eliminar o parasita, resposta do tipo Th2 leva à sua proliferação, por bloquear a produção de NO e por prover compostos necessários para o desenvolvimento do

parasita (Sacks e Anderson 2004).

Os parasitas apresentam tanto a arginase (Camargo e col. 1992; Camargo 1999; da Silva e col. 2002) quanto uma forma de NOS, mais semelhante à NOS constitutiva (cNOS), como a encontrada em células endoteliais e nervosas principalmente (Genestra e col. 2006). A arginase de *L. (L.) amazonensis* possui localização glicossomal (da Silva e col. 2008). Sabe-se que ocorre regulação cruzada entre as duas enzimas (Figura 1). A arginase, consumindo arginina, reduz consideravelmente a atividade da iNOS, enquanto que um produto intermediário da iNOS, o N^ω-hidroxil-L-arginina (NOHA), inativa a arginase (Boucher e col. 1999). Assim, a atividade da arginase da *Leishmania* pode diminuir a atividade da iNOS nos macrófagos, evidenciado por estudo que demonstra que a presença de NOHA na infecção de *L. (L.) major* diminui consideravelmente a capacidade do parasita estabelecer a infecção (Iniesta e col. 2001). Já o papel da cNOS em *Leishmania* deve estar relacionado ao início da infecção, uma vez que formas promastigotas metacíclicas apresentam maior concentração de NO do que formas promastigotas procíclicas, que são menos infectivas (Genestra e col. 2003).



Figura 1. Esquema geral do metabolismo de L-arginina em mamíferos. Representação das principais vias de uso e produção de arginina, citrulina e ornitina, adaptado de Das e col. (2010). Inibição identificada pelo símbolo ⊥; DFMO: difluorometil-ornitina; iNOS: sintase induzível de óxido nítrico; NO: óxido nítrico; NOHA: N^ω-hidroxil-L-arginina; OAT: ornitina aminotransferase; ODC: ornitina decarboxilase; Spd syn: espermidina sintase; Spm syn: espermina sintase.

O nocaute do gene da arginase em *L. (L.) amazonensis* foi realizado em nosso laboratório, e os parasitas nocauteados não apresentam atividade de arginase, além de terem sua infecção atrasada quando comparada com os parasitas selvagens (da Silva e col., em preparação), resultado compatível com o nocaute duplo do gene da arginase em *L. (L.) mexicana* que demonstrou menor infectividade tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Gaur e col. 2007). Esse efeito foi relacionado a uma maior produção de IFN- γ e de NO nos camundongos infectados com o parasita nocauteado, corroborando com a hipótese de que a arginase do parasita, de alguma forma, reduziria a explosão respiratória da célula hospedeira. O efeito era anulado quando o parasita nocauteado era suplementado pela transfecção do gene de arginase na forma de epissomo ou quando o camundongo infectado era nocauteado para iNOS. No entanto, recentemente foi demonstrado que *L. (L.) major* nocauteada hospedeira, sugerindo a importância da enzima também na produção de poliaminas, sabidamente essenciais ao parasita (Muleme e col. 2009).

Outro estudo avalia a interação entre o inseto e o hospedeiro vertebrado na infecção com *Leishmania*. Os autores avaliam o papel de proteofosfoglicanas presentes na saliva do inseto para o estabelecimento da infecção, e encontram correlação entre a infectividade e a regulação do metabolismo de L-arginina (Rogers e col. 2009). Essa substância, presente no gel secretado pelo inseto durante a picada, ajuda no recrutamento de macrófagos no local da picada. Além disso, aumenta consideravelmente a expressão de arginase na célula hospedeira, sem alterar a expressão de iNOS. Caso seja bloqueado esse aumento de expressão da arginase, ocorre a diminuição na infectividade do parasita, novamente ressaltando a importância do direcionamento da L-arginina para a sobrevivência ou não do parasita.

1.5 Transporte de L-arginina

Para que ocorra um aumento na atividade tanto da arginase quanto da iNOS, deve haver necessariamente um aumento no influxo de L-arginina na célula hospedeira (Yeramian e col. 2006). O transporte de L-arginina ocorre por meio de transportadores de aminoácidos catiônicos da família CAT (cationic amino acid transporter), que se comportam como o sistema y+ clássico de transporte de aminoácidos, e de maneira independente de sódio (Hatzoglou e col. 2004). São conhecidos 6 membros da família CAT, CAT1, CAT2A, CAT2B, CAT3, CAT4 e CAT14. A função de CAT4 e CAT14 ainda não foi bem definida, e os demais transportam L-arginina, L-lisina e L-ornitina, sendo CAT2A e CAT2B os dois transportadores catiônicos relevantes para os macrófagos, produzidos por "splicing" alternativo do mesmo gene (Closs e col. 2006).

O influxo de arginina como resposta induzida nos macrófagos é realizado pelo transportador CAT2B. A expressão de CAT2B, e consequentemente do influxo de L-arginina, aumenta na presença de estímulos com TNF- α , e essa resposta ocorre em dependência da atividade de NF- κ B (Visigalli e col. 2004). Se esse transportador for bloqueado, não ocorre o aumento de atividade de iNOS ou de arginase, sugerindo que a quantidade do aminoácido contida normalmente na célula não é o suficiente para a atividade dessas enzimas (Yeramian e col. 2006). Esses dados reforçam a hipótese de que possa haver o controle da explosão respiratória através de uma competição pelo substrato da iNOS.

De maneira interessante, o estímulo de macrófagos infectados por IFN-γ juntamente com LPS provoca uma diminuição na infecção, relacionado com maior produção de NO pelas células hospedeiras, mas estímulo somente com IFN-γ causa um aumento na quantidade de parasitas (Qi e col. 2004). Quando a resposta de transporte de arginina ao estímulo é avaliada, vemos que o estímulo somente com IFN-y não é capaz de promover o aumento do influxo de arginina (Visigalli e col. 2004). O aumento na carga parasitária deve ocorrer porque, para que a explosão respiratória ocorra, deve haver o aumento da transcrição do gene da iNOS, estimulado por IFN-y com LPS ou IFN-y com TNF- α e, necessariamente, o aumento da expressão do gene para o CAT2B, mediado por NF-κB (Visigalli e col. 2004; Yeramian e col. 2006). Embora haja relato de NF-kB ativar simultaneamente a expressão de iNOS e de CAT2B (Hammermann e col. 2000), aparentemente a ativação da transcrição de CAT2B por Leishmania ocorre por meio de ativação de receptores "toll-like" associado à ativação do complexo p50/p50 NF-kB, diminuindo a quantidade de p65 e causando, simultaneamente, um aumento na expressão do transportador de arginina e repressão da expressão de iNOS (Tuon e col. 2008; Calegari-Silva e col. 2009). Como a ativação somente com IFN-y leva a um aumento do influxo de arginina no macrófago sem a ativação da iNOS, e um paralelo aumento na quantidade de Leishmania nos macrófagos (Wanasen e col. 2007), especulamos que o parasita leve ao influxo de arginina pela célula hospedeira e esse influxo seja desviado para o parasita, disponibilizado para sua sobrevivência e replicação.

Para que isso ocorra, deve haver um meio de transportar o aminoácido do citoplasma do macrófago para o citoplasma do parasita (Figura 2). *Leishmania* é auxotrófica para vários aminoácidos, e precisa, de alguma forma, retirá-los dos fagolisossomos (McConville e col. 2007; Naderer e McConville 2008). Nesse ponto, destacam-se duas barreiras físicas: a membrana externa do fagolisossomo, originalmente do macrófago, e a da própria *Leishmania*. Sabe-se que o parasita tem a capacidade de retirar L-arginina do meio (Kandpal e col. 1995), e um transportador de L-arginina já foi caracterizado em *L. (L.) donovani* (Shaked-Mishan e col. 2006). Esse transportador, denominado AAP3, apresenta 480 aminoácidos, com 11

domínios transmembrana preditos. Tem alta afinidade por L-arginina e sua atividade não é influenciada pela presença de outros aminoácidos. Esse transportador apresenta uma identidade de 44% e similaridade de 67% com o transportador de aminoácidos descrito para *L. (L.) amazonensis* (Geraldo e col. 2005), um próton/aminoácido simporter que se utiliza de gradiente eletroquímico de concentração de prótons para transportar os aminoácidos. Em *L. (L.) donovani,* foram descritos mecanismos de aumento de transporte do aminoácido por meio de aumento da expressão do transportador, embora ainda não esteja claro em que nível esse controle ocorra (Darlyuk e col. 2009). O transporte de arginina pelos parasitas novamente aparece em destaque, apresentando-se como um fator limitante para a sobrevivência dos parasitas (Kropf e col. 2005; Naderer e McConville 2008).



Representação do metabolismo de L-arginina na interação Figura 2. entre Leishmania e macrófago. A ativação do tipo clássica por citocinas Th1 nos macrófagos (IFNy+LPS ou IFNy+TNF- α) leva à ativação de iNOS e aumento da expressão de CAT2B, levando à morte do parasita. Já o estímulo com IL-4, IL-13 e TGF-β, em decorrência de resposta tipo Th2, leva também a um aumento da expressão do CAT2B, mas em conjunto com a de arginase, causando um aumento na produção de poliaminas e consequente reprodução dos parasitas. Uma possível via de desvio de L-arginina para evitar seu uso como substrato pela iNOS seria através de seu uso pelos parasitas dentro do fagolisossomo. Embora haja descrição de transportador de arginina na membrana dos parasitas (LdAAP3), a presenca de transportadores na membrana do fagolisossomo (PV) é necessária e ainda não foi identificada (interrogações na membrana de PV). Lsh: Leishmania; iNOS: sintase induzível de óxido nítrico; NO: óxido nítrico; MO: macrófago (Wanasen e Soong 2008; licença para reprodução/tradução Springer Science+Business Media: 2611130570145).

2 Objetivos

Tendo em vista o exposto acima, este trabalho tem por:

2.1 Objetivo geral

 Caracterizar o transporte de L-arginina em L. (L.) amazonensis e sua importância na infecção em macrófagos

2.2 Objetivos específicos

- Isolar fagolisossomos de macrófagos contendo L. (L.) amazonensis;
- Avaliar a pureza do isolamento de fagolisossomos;
- Verificar a integridade da organela isolada;
- Caracterizar o gene do transportador de arginina em L. (L.) amazonensis;
- Construir mutantes de *L. (L.) amazonensis* nocaute para o transportador de arginina;
- Avaliar a expressão do gene do transportador de arginina;
- Avaliar a resposta fisiológica no transporte de arginina ao longo do desenvolvimento do parasita;
- Verificar a influência da concentração do aminoácido na expressão do transportador;
- Verificar a influência da interrupção de via de degradação de arginina no transporte do aminoácido.

3 Material e Métodos

3.1 Organismos

3.1.1 Leishmania

Utilizamos promastigotas de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269 e *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/80/DD8), além das linhagens de *L. (L.) amazonensis* GFP e RFP, obtidas a partir da linhagem MHOM/BR/73/M2269 (da Silva e col. em preparação; dos Santos e col. in press). Essas linhagens apresentam o plasmídeo pXG com a fase aberta de leitura do gene eGFP ou eRFP, o que a torna o parasita verde ou vermelho ao ser observado em microscópio de fluorescência ou microscópio laser confocal.

Os parasitas foram cultivados em meio M199 pH 7,4 (Gibco, Invitrogen) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 5% penicilina-estreptomicina, 0,1% hemina e 10mM adenina, em garrafas de cultura de células de 25cm² mantidas em B.O.D. a 25°C (Kapler e col. 1990). O repique era feito a cada 7 dias, quando a fase estacionária (cerca de 5x10⁷ por mL) era atingida. Foi utilizado um inóculo de 5x10⁶ células em 10mL de meio novo. As células eram contadas em um contador de partículas Coulter Z1 Particle Counter, e conferidas por contagem em microscópio óptico em câmara de Neubauer (Sambrook e Russell 2001). Para *L. (L.) donovani*, o meio de cultura foi complementado com 2% de urina humana filtrada, e para os parasitas GFP e RFP adicionamos 10µg/mL de neomicina (G-418, Invitrogen).

Para a realização de experimentos com curva de crescimento, mantivemos os parasitas em fase log, com repique diário, até estabilização do crescimento dos mesmos, a partir de onde começamos as avaliações (dos Santos e col. in press).

3.1.2 Macrófagos

Macrófagos J774 foram mantidos no laboratório em meio de cultura do tipo RPMI 1640 pH 7,1 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina-estreptomicina em garrafas de cultura de tecidos com 25cm² de área, com tampas com filtros, a 37°C em estufa de 5% de CO₂, com troca de meio de 2 a 3 dias e repique de cultura uma vez por semana, condições que asseguram uma média de 1x10⁶ células por mL de meio, formando um tapete contínuo de células aderidas ao fundo da garrafa de 25cm² quando observadas no microscópio óptico.

Linhagens de macrófagos pEGFP e pEGFP-Lamp1, construídos neste trabalho, foram mantidas nas mesmas condições, com adição de 500µg/mL de neomicina no meio de cultura.

3.1.3 Bactérias

Bactérias *E. coli* foram cultivadas em meio de cultura líquido SOB (20g de triptona, 5g de extrato de levedura, 0,5g de NaCl, 2,5mL de KCl 1M em volume de 1L) com adição de 10mL de MgCl₂ 1M. Placas de cultura com meio semi-sólido eram preparadas com o mesmo meio SOB acrescido de 1,5% (M/V) de agar em placas de Petri de 10cm de diâmetro. Para utilização em vetores com sistema LacZ e resistência à ampicilina, era adicionado 150µL de IPTG (200 mg/mL), 4mL X-Gal (20 mg/mL) e 1mL de ampicilina (100 mg/mL). As bactérias cresciam por 14-18h a 37°C, com agitação de 250rpm quando em meio líquido.

A biblioteca de cosmídeos foi propagada em meio tipo TB (12g triptona, 24g extrato de levedura em 900mL) com adição de 100mL de solução mix de KH₂PO₄ 0,17M e K₂HPO₄ 0,72M e ampicilina para concentração final de 100µg/mL. Clones foram selecionados em placas de Petri de 20cm de diâmetro com o mesmo meio de cultura com adição de 1,5% de agar (M/V).

3.2 Ensaios com células

3.2.1 Ensaios de infecção

A padronização da infecção foi realizada expondo macrófagos aos parasitas em proporções e tempos descritos nos resultados, com 10 lavagens com M199 sem soro após a exposição aos parasitas.

Para as purificações de fagolisossomos, as infecções foram realizadas com a exposição dos macrófagos aos parasitas em proporções de 10 parasitas por célula hospedeira, por 4 horas a 34°C, seguidos de lavagens por 10 vezes com 5mL de meio M199 sem soro. As células eram então incubadas por mais 14 horas e lavadas novamente.

Fizemos também a infecção de macrófagos J774 com Zymosan (Sigma), com 10⁸ partículas disponibilizadas para fagocitose de 10⁷ macrófagos pelos mesmos tempos usados com os parasitas.

3.2.2 Isolamento dos fagolisossomos

3.2.2.1 Gradiente descontínuo de sacarose

O isolamento das organelas por gradiente descontínuo de sacarose foi realizado adaptando-se a metodologia descrita por Chakraborty e col. (1994) para fagolisossomos contendo *L. (L.) mexicana*. As garrafas de cultura com as células infectadas foram lavadas com meio de cultura RPMI 1640, e em seguida adicionamos 2,5mL de tampão de lise em cada garrafa de cultura, composto por 20mM de HEPES, 0,5mM de EGTA, 0,25mM de sacarose e 0,1% de gelatina mais um coquetel de inibidores de protease em 1% de concentração (Sigma, P-8340). As

células removidas eram lisadas por passagens repetidas por homogenizador tipo Dounce, monitoradas por microscopia óptica de forma que 90% das células fossem lisadas.

O conteúdo da lise era passado para tubos tipo "Falcon" de 15mL, e então centrifugados a 200xg por 10 minutos para remoção de células intactas e núcleos. O sobrenadante era então recolhido, centrifugado a 4500xg por 20 minutos e o precipitado ressuspenso em 1mL de tampão de lise. A suspensão era colocada sobre um gradiente descontínuo de sacarose, formado em tubo de 15mL contendo 4mL de sacarose a 60%, 4mL a 40% e 4mL a 20%. Após centrifugação por 25 minutos a 700xg, o conteúdo da interface 40-60% era coletado e passando para tubos tipo "eppendorf" de 1,5mL. Esses eram submetidos à centrifugação de 12000xg por 25 minutos. O precipitado era ressuspenso em 1mL de tampão de lise e uma alíquota era analisada em microscopia confocal ou microscopia de fluorescência. Fizemos a coloração de amostras com DAPI (Invitrogen), para a marcação de núcleo e cinetoplasto numa diluição 1:50 e/ou 1µM de Neutral Red (Invitrogen) por 10min, um corante que fluoresce em vermelho em organelas com pH abaixo de 6,0.

3.2.2.2 Citometria de fluxo com "sorting"

Os isolamentos das organelas por citometria de fluxo com "sorting" foram realizados com dois equipamentos: inicialmente com a utilização de um citômetro FACS Vantage (BD Biosciences), alocado no Instituto de Ciências Biomédicas da USP e depois com um FACS Aria (BD Biosciences), alocado no Instituto Israelita Albert Einstein, ambos operados pelo Dr. Luiz R. Sardinha. A infecção e a lise eram executadas nas mesmas condições, com os mesmos tampões descritos.

Fizemos a separação através de um "gate" com partículas fluorescentes

para o primeiro canal de fluorescência (FL1) que não apresentavam fluorescência no segundo canal de fluorescência (FL2), quando os parasitas utilizados na infecção expressavam eGFP, e com "gate" em FL2 não fluorescente em FL1 quando os parasitas utilizados expressavam eRFP, de maneira a evitar partículas auto-fluorescentes. As amostras foram colhidas em tubos tipo "Falcon" de 15mL com 1mL de tampão de lise, passadas novamente em leitura para avaliação de pureza, coradas e levadas para análise no microscópio confocal.

3.2.3 Ensaio de tomada de aminoácidos

Para o ensaio de tomada de aminoácidos utilizamos promastigotas de *L.* (*L.*) *amazonensis* em diferentes fases da curva de crescimento, conforme indicado nos resultados. Para o ensaio, os parasitas foram lavados com Solução de Sais Balanceados de Earle (EBSS, LGC Biotecnologia) gelado por 2 vezes, e ressuspensos em 2x10⁸ parasitas/mL no mesmo tampão. Alíquotas de 50µL por tubo dessa suspensão eram estabilizadas a 25°C por 3 minutos, após o que eram adicionados 50µL de arginina tritiada (1mCi/mL, 43Ci/mmol; GE Healthcare) em diferentes concentrações como citado nos resultados, de modo a ter 100.000 contagens por minuto no volume total. A incorporação foi parada com a adição de 100µL de aminoácido não radioativo com arginina a 50mM em gelo. As células foram lavadas por 2 vezes com EBSS gelado, ressuspensas em 200µL do mesmo tampão e adicionadas a 800µL de liquido de cintilação Ecolume (ICN Biomedicals) em tubo para cintilador. As amostras tiveram a radioatividade determinada em espectrômetro de cintilação líquida 2100TR Packard Tri-Carb (PerkinElmer).

3.2.4 Ensaio de privação de aminoácidos

Parasitas eram lavados por duas vezes e ressuspensos em 1x10⁸ parasitas/mL em EBSS. Para a determinação da tomada no tempo 0, a amostra era

mantida no gelo, enquanto que para os demais tratamentos, as amostras eram mantidas em 25°C, na ausência ou presença de 400µM de arginina por 4h.

3.3 Ensaios com ácidos nucleicos

3.3.1 Extração de DNA Genômico

Utilizamos a metodologia descrita por Uliana е col. (1991). Resumidamente, as células são coletadas por centrifugação a 2000xg por 10 minutos e ressuspendidas em NaCl 150mM. A suspensão era gotejada em solução de Tris 150mM, EDTA 50mM e SDS 1% a 65°C para a lise, e Pronase 0,2 mg/mL era acrescentado num tratamento por 2 horas a 45°C para digerir as proteínas. Seguiase uma extração orgânica com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). A fase aquosa era precipitada pela adição de acetato de sódio para final 300mM e dois volumes de álcool etílico absoluto gelado. O precipitado ressuspenso era tratado com RNase A 20µg/mL por 1 hora a 37°C, seguido de tratamento com Proteinase K 50µg/mL por 1 hora a 42°C, uma segunda extração orgânica e precipitação com etanol, como descrito anteriormente. Finalmente, o precipitado era ressuspenso em Tris 10mM; EDTA 1mM. A quantificação e a pureza da preparação eram determinadas em espectrofotômetro pela leitura em A_{260/280}. O tampão de ressuspensão final era preparado com água para injeção (Aster) para que não houvesse contaminação com exo/endonucleases. Essa mesma água era utilizada em diluições de DNA e preparo de PCR.

3.3.2 Extração de DNA de plasmídeo e cosmídeo

Usamos a preparação em mini e média-escala para recuperar os plasmídeos e cosmídeos das bactérias (Sambrook e Russell 2001).

Resumidamente, as células eram ressuspensas em solução P1 (Tris/HCI 50mM, EDTA 10mM, RNase 100µg/ml), lisadas em seguida com adição de 1 volume de NaOH 0,2N e SDS 1%, o que também desnatura o DNA tanto do plasmídeo quanto o genômico da própria bactéria, e neutralizadas após poucos minutos, por adição de 1 volume de acetato de potássio 3M pH 5,5, fazendo com que o plasmídeo ficasse em suspensão aquosa enquanto o DNA genômico ficasse precipitado. A fase aquosa era submetida à extração orgânica com clorofórmio, e em seguida precipitada com adição de isopropanol, para final 40%. Após seco, o precipitado era lavado em etanol 70% e ressuspenso em tampão Tris-EDTA (10mM/1mM) ou água para a sua utilização.

3.3.3 Extração de RNA Total

RNA foi obtido pelo método de Trizol (Gibco, Invitrogen) segundo instruções do fabricante. O ácido nucleico era então ressuspenso em água para injeção, quantificado em espectrofotômetro do tipo NanoDrop 2000 (NanoDrop Tech.). Checamos a integridade do material por eletroforese em agarose 1% em tampão fosfato 10mM pH 7,0 com o RNA desnaturado com DMSO 38% e Glioxal 2,3M em tampão fosfato 10mM pH 7,0 por 1h a 50°C.

3.3.3.1 Determinação da meia-vida de mRNA

Usamos o protocolo descrito por Archer e col. (2008) para cálculos da meia-vida do mRNA dos parasitas. Brevemente, 10⁷ parasitas eram incubados em EBSS contento 2µg/mL de sinefungina e/ou 10µg/mL de actinomicina por diferentes tempos após o que as células eram colhidas por centrifugação (10000rpm/2min) e lisadas em 1mL de Trizol para posterior extração de RNA.

3.3.3.2 Transcrição Reversa

Fizemos a transcrição reversa com o kit Revert Aid (Fermentas) conforme instruções do fabricante, com 2µg de RNA, e 1µM de "random primer"; oligo(d)T ou iniciador específico conforme citado nos resultados. A extensão foi feita por 60 minutos a 42°C, seguida de inativação da enzima a 70°C por 10 minutos.

3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.3.4.1 Oligonucleotídeos utilizados

 Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados ao longo dos experimentos

Nome	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Função
LdAAP3F	ATGAGCAAGCCCAGCAAGTC	61	PCR ORF L. (L.)donovani*
LdAAP3R	CTACACGAAGAAGCTGTAGT	56	PCR ORF L. (L.)donovani*
TArg1F	ATGAGCAAGCCTAACGAGCC	52	PCR ORF
TArg2F	ACTACTTCGTTGGGTTTGTC	50	Walking para 3'
TArg3F	GTGCCGAAACTTCGTCTACC	53	Walking para 3'
TArg4F	TTCGTGTGATATTCATCCAC	54	Walking de 3'
Targ5F	GTGTCATTGCAGTTGTCTTTGG	60	Walking de 3'
TArg1R	CTCGATGAGTCTGTCAGGC	53	Transcrição Reversa
TArg2R	CACCGCTCGGGTATTTAGTG	54	Semi-nested de 5'UTR
dTAdap	GACTCGAGTCGACATCGA(T) ¹⁷	67	RT a partir de 3'
Adap	GACTCGAGTCGACATCGA	56	RT-PCR de 3'UTR
MedL	CGCTATATAAGTATCAGTTTC	47	RT-PCR de 5'UTR
T5u1kF	GGTCCCCGATACACACATTC	60	Real Time 5'UTR 5.1AAP3
T5u1kR	GTCTCCCGTTTTGCAAGAGA	58	Real Time 5'UTR 5.1AAP3
T5u500F	ACCATTGTGGGTTAGTTATACATCC	63	Real Time 5'UTR 4.7AAP3
T5u500R	CAAGATCGCTAGCAGTGGAG	60	Real Time 5'UTR 4.7AAP3
Lamp1F	GTGAGGAGTAAGCTGGCGG	62	RT-PCR de Lamp1
Lamp1R	CTGTGCATCTCTGGTGCAC	60	RT-PCR de Lamp1
Lmp ¹ NF	ctcgagaaATGGCGGCCCCCGGCGC	77	Nested PCR de Lamp
Lmp1NR	ccgcggGATGGTCTGATAGCCGGCGTG	77	Nested PCR de Lamp
	* (Chalend Michan a cal 2006)		

* (Shaked-Mishan e col. 2006)

3.3.4.2 PCR de DNA

Realizamos as PCRs de acordo com a metodologia descrita por Saiki e col. (1986) com utilização de 2U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Fermentas), em tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4; KCl 50mM, dNTP 200µM, MgCl₂ 1,5mM, contendo 1µM de oligonucleotídeos iniciadores e 100ng de DNA molde num volume final de 50µl. Era aplicada uma temperatura inicial de 94°C por 4 minutos seguidos 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, associação dos iniciadores e

extensão por diferentes tempos descritos nos resultados dependendo do fragmento a ser amplificado. Após o último ciclo, as amostras foram mantidas por 72°C durante 7 minutos para que a enzima terminasse a extensão de possíveis fragmentos incompletos e para a adição de uma adenina no final de cada fragmento, tornando possível a clonagem dos mesmos em kits de clonagem "T-A". A temperatura ideal de associação foi calculada inicialmente pela composição de CG dos iniciadores e adaptada *a posteriori* experimentalmente pela utilização de um termociclador com bloco em gradiente. Diferentes iniciadores foram utilizados; suas sequências e no quê foram aplicados estão apresentadas na tabela 1.

3.3.4.3 RT-PCR

Os RT-PCR eram realizados de acordo com a metodologia descrita para PCR em DNA, usando como molde diluição do cDNA obtido por transcrição reversa conforme descrito anteriormente.

3.3.4.4 PCR Quantitativo

Curva de calibração

DNA de plasmídeo contendo o fragmento alvo para quantificação era linearizado pela ação de enzima de restrição, purificado de gel como descrito anteriormente e quantificado por espectrofotômetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Tech.). Fizemos a conversão da massa por unidade de volume para número de moléculas por volume, e preparamos uma diluição em série de 1/10 em escala de 10⁷ a 10⁻¹ moléculas/µL. Cada diluição foi utilizada para obtenção da construção da curva padrão de quantificação.

PCR em Tempo Real

No ensaio de quantificação dos genes, utilizamos cDNA produzido por transcrição reversa com "random primer" a partir de RNA total como descrito anteriormente. Tratamos o RNA com DNase para nos certificarmos de que o amplificado vinha a partir de cDNA, e não de DNA genômico, e sempre incluímos um controle em que RNA não submetido à transcrição reversa era utilizado como molde. A reação de PCR em tempo real para quantificação absoluta de cópias de transcrito era realizada com 50 ciclos consistindo de 20 segundos de desnaturação a 94°C e 50 segundos a 62°C em aparelho SDS 7300 (Applied Biosystems).

3.3.5 Fracionamento de ácidos nucleicos

3.3.5.1 Fracionamento de DNA

Digestão de DNA

Digestões com enzimas de restrição (Fermentas) eram realizadas adicionando 3U/µg de DNA, com tampão próprio para a enzima fornecido pelo fabricante, por 1h a 37°C, tomando-se o cuidado de não realizar a digestão em volume final maior de que 100µL e de forma que o volume de enzima adicionado não ultrapassasse 10% do volume final de reação.

Eletroforese em gel de agarose

Fragmentos de DNA foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 7,4), corado com brometo de etídio (2,5µg/L) e observado em transiluminador UV e registrado com câmera fotográfica KODAK Easyshare C743.

3.3.5.2 Fracionamento de RNA

O RNA extraído foi submetido à eletroforese após desnaturado com DMSO 38% e Glioxal 2,3M em tampão fosfato 10mM pH 7,0 por 1h a 50°C, em seguida resfriado no gelo. O material foi adicionado em gel de agarose 1% em tampão fosfato 10mM pH 7,0.

3.3.5.3 Southern Blot

DNA digerido com enzimas de restrição e fracionado, seguindo-se as condições descritas, era transferido para membrana de nylon após imersão do gel de agarose por 30min em solução desnaturante (NaOH 0,5M; NaCl 1,4M) e mais 30min em solução neutralizante (Tris-Cl 0,5M pH 7,4; NaCl 1,5M). A transferência para membrana de "nylon" foi executada overnight em SSC 10X (SSC 20X: NaCl 3M, citrato de sódio 300mM) conforme descrito (Sambrook e Russell 2001). Após a transferência, a membrana era mergulhada brevemente em SSC 6X e o material era fixado à membrana por tratamento com UV Stratagene Crosslinker.

3.3.5.4 Northern blot

O gel contendo RNA fracionado, como descrito anteriormente, era transferido para membrana de "nylon" em SSC 10X "overnight" em aparelho montado conforme descrito (Sambrook e Russell 2001).

3.3.6 Hibridação de ácidos nucleicos

3.3.6.1 Marcação de sonda de DNA

Fragmentos de DNA obtidos por PCR ou digestão de plasmídeos eram utilizados para a marcação com "random priming" através do kit Megaprime DNA labelling systems (Amersham-Pharmacia-Biotech) com a adição de 50μCi de 5'-[α⁻ ³²P]dATP (3000Ci/mmol, Amersham-Pharmacia-Biotech), seguindo o protocolo do

fabricante.

3.3.6.2 Reação de hibridação

As membranas com DNA ou RNA fixado eram hibridadas com sonda radioativa utilizando-se a solução de hibridação "Rapid-Hyb Buffer" (Amersham-Pharmacia-Biotech) seguindo instruções do fabricante. Brevemente, fizemos préhibridação com o tampão citado por 2 horas a 50°C. As sondas eram fervidas por 10min e resfriadas em banho água-gelo. Eram então adicionadas ao líquido de hibridação e mantidas em 50°C overnight.

3.3.6.3 Lavagem das membranas e exposição

Após a hibridação, lavamos as membranas com 50mL de SSC 2X SDS 0,1% por 20 minutos cada lavagem. Realizamos as duas primeiras lavagens à temperatura ambiente, e duas lavagens seguintes a 50°C.

Após a última lavagem, expusemos as membranas a filme de radiografia por 1-14 dias, dependendo do tempo de decaimento da sonda utilizada e da radioatividade avaliada com medidor de radioatividade tipo Geiger. Os filmes foram então revelados com kit Kodak Dental segundo instruções do fabricante.

3.3.6.4 "Screening" de biblioteca de cosmídeo

Uma biblioteca de cosmídeos de *L. (L.) amazonensis*, gentilmente cedida pela Dra. Sílvia R. B. Uliana (Depto. Parasitologia - ICB-USP) foi propagada e plaqueada como descrito anteriormente. Após crescimento por 16h a 37°C as bactérias eram transferidas por contato direto para membranas de "nylon" (Hybond-N, Amersham). A placa era novamente incubada por 1 hora a 37°C e armazenada em geladeira.

A lise das colônias foi realizada pelo contato da membrana com uma

solução de SDS 10% (m/v) por 3 minutos. O DNA em seguida é desnaturado pelo contato com solução desnaturante por 5 minutos e a membrana em seguida é passada para solução neutralizante. Após a lavagem em SSC 10X por 10 minutos, o DNA era fixado à membrana por tratamento no aparelho UV-Stratalinker 1800 (Stratagene).

Colônias selecionadas foram localizadas na placa "mãe" e recuperadas em meio SOB com 100µg/mL de ampicilina por 18h a 37°C com agitação. Os cosmídeos foram extraídos conforme procedimento descrito anteriormente.

3.3.7 Clonagem

3.3.7.1 Purificação de fragmentos de DNA

Fragmentos de interesse detectados após fracionamento do DNA foram então recortados do gel, e o ácido nucleico foi purificado com kit QiaQuick DNA Extraction Kit (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante.

3.3.7.2 Ligação de fragmentos de DNA em plasmídeo

Vetores utilizados

pUC 19: 2686 bases, origem de replicação ColE1, sítio múltiplo de clonagem (SMC) dentro do gene de β-lactamase, marca de seleção por resistência a ampicilina, sítios de ligação M13F e M13R flanqueando o SMC

pGEM-T Easy (Promega): Linear com timinas ligadas nas extremidades 3', 3018 bases, origem de replicação f1, marca de seleção por resistência a ampicilina, sítio múltiplo de clonagem flanqueado por sequências de ligação de oligonucleotídeos T7 e SP6 dentro do gene de β-lactamase.

pBlueScript SK+: 2958 bases, origem de replicação f1 e pUC, marca de seleção por resistência a ampicilina, sítio múltiplo de clonagem flanqueado por

sequências de ligação de oligonucleotídeos M13F/M13R e T7/T3 dentro do gene de β-lactamase

pEGFP-C1 (Clontech): 4731 bases, origem de replicação f1, pUC e SV40, marca de seleção por resistência a kanamicina (bactérias) e neomicina (eucariotos); promotor de CMV seguido de "enhanced green flourescent protein" (eGFP) com o SMC ao final, antes do "stop codon", e o sinal de poliadenilação de SV40 depois do "stop codon".

cLHYG (Ryan e col. 1993): 12189 bases, resistência a higromicina e neomicina (eucariotos) e ampicilina e kanamicina (bactérias), sítio de ligação e promotor T7, origem de replicação CoIE1, sequência do gene DHFR-TS de *L. (L.) major*.

Ligação de DNA

Fragmentos amplificados por PCR, após serem purificados conforme descrito, eram adicionados em uma proporção de 3 moléculas de inserto para cada molécula de plasmídeo pGEM-T (Promega, A-1360), utilizando enzima T4 DNA ligase seguindo as instruções do fabricante.

Fragmentos obtidos por digestão de DNA eram ligados em plasmídeo, como citado nos resultados, digerido e purificado da mesma forma que o inserto, com a utilização de T4 ligase (Invitrogen) em proporção de 3 moléculas de inserto para 1 molécula de vetor, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.7.3 Transformação de bactérias competentes

Preparação de bactérias competentes

Bactérias competentes foram preparadas através do método de lavagens com cálcio seguindo protocolo de Hanahan e col. (1995).

Transformação com plasmídeo e cosmídeo

Cosmídeos ou os produtos da ligação foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* da linhagem SURE ou linhagem DH5α por choque térmico segundo protocolo descrito por Hanahan e col. (1995). As bactérias, após choque térmico, permaneceram por 1 hora em 1mL meio SOB sem antibiótico a 37°C.

Os clones que receberam o plasmídeo foram selecionados plaqueando-se 100µL do meio com bactérias recuperadas do choque térmico, em placas de Petri com SOB preparadas como descrito anteriormente. Após um crescimento de 16-18 horas, as colônias foram selecionadas e recuperadas em meio de cultura líquido com a mesma concentração da droga a 37°C. Os plasmídeos desses clones foram purificados seguindo adaptação do protocolo de mini-preparo de DNA de plasmídeo por lise alcalina com SDS, como descrito anteriormente

3.3.7.4 Transfecção de macrófagos J774

Curva de ação de neomicina em macrófagos J774.

Cerca de 10⁵ macrófagos aderidos em placas para ELISA com 24 poços, contendo 1mL de meio de cultura com diferentes concentrações da droga foram examinados diariamente para obtenção da CL₅₀ e CL₉₅ de neomicina nessas células.

Transfecção e seleção clonal

Os plasmídeos foram transfectados utilizando 10µg de DNA e o sistema Turbofect (Fermentas) seguindo instruções do fabricante, usando 10⁷ células em 10mL de meio de cultura completo em garrafa de cultura de 25cm². Dois dias após a transfecção as células passaram a ser cultivadas com o dobro da CL₉₅ de neomicina determinada experimentalmente, mantidas assim por 4 passagens em garrafas de cultura de 25cm². A seleção de clones transfectados resistentes foi feita por diluição
limitante dessas células em 1mL de meio de cultura com droga, com inóculo inicial de 10⁶ células no primeiro poço e diluídas seriadamente em razão de 1:2 nos poços seguintes, em placas de 24 poços. O desenvolvimento das células foi acompanhado ao microscópio óptico invertido, e após 3 semanas as células do poço com maior diluição foram recuperadas para garrafas de cultura de 25cm².

3.3.7.5 Transfecção de Leishmania

Para a transfecção dos parasitas, adaptamos o protocolo anteriormente utilizado em nosso laboratório (de Andrade Stempliuk e Floeter-Winter 2002) pela utilização de tampão com características de meio intracelular cytomix (KCl 120mM; CaCl₂ 0,15mM; K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10mM; MgCl₂ 5mM; EDTA 2mM; HEPES 25mM; pH 7,6 acertado com KOH) (van den Hoff e col. 1995). Promastigotas em fase logarítmica (1x10⁷ parasitas/mL) eram lavados com o cytomix, ressuspensas em 2x10⁸ parasitas/mL, aliquotadas em cubetas de eletroporação com 4mm (BioRad) às quais eram adicionados 10µg do DNA a ser transfectado. Após 10min no gelo, as células eram submetidas a 2 choques, intercalados por 10s de repouso no próprio aparelho, com 1500V e 25µF. As células eram passadas então para 10mL de M199 sem droga e incubadas por 24h a 25°C.

No dia seguinte, as células eram centrifugadas e ressuspensas em 500µL, e 100µL da suspensão eram plaqueados placa de agar 1% contendo 20mL de M199 com 20% SFB, com adição de 10µg/mL de neomicina. As placas eram seladas com "parafilm" e mantidas por até 6 semanas, monitoradas para verificar o aparecimento de colônias. Colônias eram recuperadas em meio M199 líquido com 10% SFB e 10µg de neomicina.

3.3.8 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado com o kit ABI Prism BigDye

(Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante pelo método de didesoxinucleotídeos (Sanger e col. 1977), utilizando-se os oligonucleotídeos comerciais *T7, SP6, M13F, M13R* (Fermentas) ou oligonucleotídeos específicos como iniciadores da reação. A reação foi fracionada no sequenciador do Serviço de Sequenciamento de DNA, no Departamento de Bioquímica do IQ USP. Fizemos alinhamento das sequências e observação dos cromatogramas utilizando o BioEdit (Hall 1999). As sequências foram confirmadas por BLAST (Altschul e col. 1990).

4 Resultados

4.1 Purificação de fagolisossomos

Para estudar como se dá o transporte de arginina do interior do macrófago para o interior do fagolisossomo, e desse para o interior do amastigota, procedemos à padronização da purificação da organela, e a caracterização de sua integridade.

4.1.1 Avaliação da infecção

A avaliação das diferentes relações parasita/hospedeiro (19/1, 7/1 e 4/1) e tempo de infecção (2h, 8h e 16h) em microscópio confocal à laser, que nos levou a utilizar a concentração de 4 parasitas por célula hospedeira em 16 horas de infecção (Figuras 3 e 4).



Figura 3. Teste de infectividade de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos J774. Infecção de macrófagos J774, em três diferentes tempos de exposição dos parasitas (linhas) com três diferentes concentrações de parasitas por macrófagos (colunas). Quadrados demarcados na linha 16 horas apresentados na Figura 4.



Figura 4. Detalhes das infecções de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* EGFP em J774. As infecções de 16 horas para as 3 diferentes concentrações de parasita/hospedeiro, conforme áreas marcadas na Figura 3, são apresentadas. Os parasitas são visualizados em verde.

4.1.2 Purificação por gradiente de sacarose

Utilizando as condições de infecção padronizadas expusemos 10⁸ macrófagos com 4x10⁸ parasitas por 16 horas. Após esse tempo aplicamos a metodologia descrita por Chakraborty e col. (1994), conseguimos isolar um total de aproximadamente 10⁵ fagolisossomos. O material purificado foi observado em microscópio de fluorescência, como observamos na Figura 5.

Transmissão

Transmissão + Fluorescência



Figura 5. Isolamento de fagolisossomos por gradiente de sacarose. Fotomicrografia de transmissão e fluorescência de fagolisossomos contendo *L. (L.) amazonensis* expressando GFP. As três linhas correspondem a três campos de visão. Setas indicando fagolisossomos contendo *L. (L.) amazonensis*.

Na figura 6 apresentamos em mais detalhe o resultado da purificação.

Percebe-se que apesar de termos obtido organelas purificadas (Figura 6A),

pudemos ao mesmo tempo observar uma contaminação grande com promastigotas livres (Figura 6B).



Figura 6. Contaminação de fagolisossomos por promastigotas livres. Fagolisossomos purificado por gradiente descontínuo de sacarose de infecção de macrófago J774 com *L. (L.) amazonensis* expressando GFP. A. Fagolisossomo com parasita verde fluorescente dentro. Detalhe de promastigota (seta vermelha) e de outra partícula, possivelmente um fagolisossomo rompido, na mesma lâmina em outro campo (seta branca).

Realizamos a coloração das organelas purificadas com Neutral Red, um

marcador com fluorescência vermelha em compartimentos ácidos, que nos indicaria a integridade da membrana dos fagolisossomos. Observamos a purificação no microscópio confocal, confirmando nossa avaliação de um grande número de promastigotas livres contaminantes entre organelas com marcação para Neutral Red (Figuras 7 e 8).



Figura 7. Avaliação da integridade das organelas purificadas. Avaliação de integridade de membranas com a utilização do corante Neutral Red. Fluorescência de GFP marcada em verde, detectada em 525nm, e fluorescência de Neutral Red, detectada em 565-615nm e marcada em vermelho em microscópio confocal. Notar a presença de promastigotas contaminantes que não apresentam marcação com Neutral Red (setas brancas). A. canal fluorescente para GFP; B. canal I fluorescente para Neutral Red; C. contraste de fase; D. sobreposição de contraste e dos dois canais.

Com o intuito de diminuir a contaminação com promastigotas das organelas purificadas, passamos a fazer as infecções com 10 parasitas por célula por 4 horas a 34°C, mas aumentamos para 10 o número de lavagens após a infecção, a fim de retirar os parasitas não internalizados. O período de incubação dos macrófagos infectados continuou por 14h a 34°C para completa internalização dos parasitas e seguiram-se mais 10 lavagens antes de remover as células para lise e purificação dos fagolisossomos.



Figura 8. Fagolisossomo purificado corado com Neutral Red. Observação em microscópio confocal da preparação de fagolisossomos. Fluorescência de GFP (verde), corresponde ao parasita internalizado, a fluorescência de Neutral Red (vermelho) corresponde à organela ácida. Nesta preparação, não encontramos mais promastigotas livres. A. canal fluorescente para GFP, detectado em 525nm; B. canal I fluorescente para Neutral Red, detectado entre 565-615nm; C. contraste de fase; D. sobreposição de contraste e dos dois canais.

Passamos, então, a fazer análise do material purificado após gradiente de

sacarose por citometria de fluxo, com o objetivo de avaliar com maior precisão o grau de pureza da purificação. A quantidade de partículas positivas para FL1, canal em que é detectável a fluorescência emitida por GFP, apresentou-se variável durante as repetições realizadas, com uma média de 15,51±5,36 de positivos para FL1 em 4 experimentos independentes (Figura 9).



Figura 9. Citometria de fluxo de fagolisossomos purificados por gradiente de sacarose. A. Histograma de FL1 para fagolisossomos contendo *L. (L.) amazonensis* fluorescentes (vermelho) ou não fluorescentes (preto). B. "Dot plot" da população de fagolisossomos contendo *L. (L.) amazonensis* fluorescentes. Partículas dentro da região M1 em A, foram destacadas com vermelho em B. Representação de uma repetição de 4 experimentos independentes.

4.1.3 Purificação por citometria de fluxo com "sorting"

Como uma pureza de cerca de 15% não é suficiente para realização de ensaios de transporte de arginina na organela, deixamos de fazer a purificação por gradiente de sacarose e passamos a utilizar a purificação dos fagolisossomos por citometria de fluxo com "sorting", separando as regiões R2 e R3 demonstradas na Figura 10.



Figura 10. Citometria de fluxo pré-"sorting". Avaliação da pureza inicial do lisado celular de macrófagos J774 infectados com *L. (L.) amazonensis* antes do "sorting". As regiões R2 e R3 foram marcadas para posterior separação. A. "Dot plot" das partículas avaliadas por "Forward Scatter" (FSC) versus "Side Scatter" (SSC). B. histograma de fluorescência no canal 1 (FL1). C. "Dot plot" de fluorescência no canal 1 com fluorescência no canal 2. O destaque na tabela mostra a porcentagem de pureza da purificação.

Separamos as regiões R2 e R3 por parecerem duas populações

diferentes. O resultado da avaliação das purificações pode ser observado na Figura

11 para a região R2 e Figura 12 para a região R3.



Figura 11. Análise da amostra separada em R2. A. "Dot plot" das partículas avaliadas por Forward Scatter (FSC) *versus* Side Scatter (SSC). B. histograma de fluorescência no canal 1 (FL1). C. Dot plot de fluorescência no canal 1 com fluorescência no canal 2. Pureza do material em destaque na tabela.



Figura 12. Análise da amostra separada em R3. A. Dot plot das partículas avaliadas por Forward Scatter (FSC) *versus* Side Scatter (SSC). B. histograma de fluorescência no canal 1 (FL1). C. Dot plot de fluorescência no canal 1 com fluorescência no canal 2. Pureza do material em destaque na tabela.

As amostras coletadas nas regiões R1 e R2 foram observadas em microscopia confocal. Conforme apresentado na figura 13, observamos que as partículas marcam com Neutral Red, com amastigotas em seu interior e que não há no campo outras estruturas que poderiam representar células rompidas, ou outras organelas ou estruturas celulares.



Figura 13. Microscopia de fagolisossomos purificados com citometria de fluxo. Imagem de microscopia confocal de fagolisossomos purificadas de macrófagos J774 contendo *L. (L). amazonensis* expressando GFP. A fluorescência vermelha indica pH < 6,0 por coloração com Neutral Red (Invitrogen), característico dos fagolisossomos. A caixa branca em A é detalhada em B. Primeiro quadrante representa a fluorescência de Neutral Red, detectada entre 565-615nm; o segundo quadrante representa a fluorescência de GFP detectada em 525nm; terceiro quadrante representa o contraste de fases, e o quarto quadrante é a sobreposição das imagens.

O controle de especificidade da marcação com Neutral Red foi verificado

pela coloração de macrófagos intactos que foram previamente apresentados a

Zymosan. Como observado na Figura 14, o vacúolo fagocítico se encontra marcado,

junto com pequenas organelas citoplasmáticas, indicando que o corante é específico

para ambiente ou compartimentos ácidos.



Figura 14. Avaliação de especificidade de marcação de compartimentos ácidos. Macrófago J774 contendo Zymosan fagocitado e corado com Neutral Red conforme descrito em material e métodos. A fluorescência vermelha indica pH < 6,0 característico de lisossomos e fagolisossomos. O primeiro quadrante representa a fluorescência de Neutral Red, detectada entre 565-615nm; o segundo quadrante representa o contraste de fases, e o terceiro quadrante é a sobreposição das imagens.

4.1.4 Construção de macrófago com marcação de membrana de

fagolisossomo

Para nos assegurarmos de que as organelas separadas tinham como constituinte a membrana proveniente do macrófago, construímos macrófagos que expressam a proteína Lamp1 (lysosomal associated membrane protein 1), uma proteína encontrada em fagolisossomos, fundida à GFP A Figura 15 ilustra os passos seguidos para obtenção desse macrófago.



Figura 15. Estratégia de construção do plasmídeo pEGFP-Lamp1. A partir de RNA total de macrófagos foi feita uma preparação de cDNA com oligo(d)-T, e PCR com iniciadores Lamp1F e Lamp1R em 30 ciclos com associação a 60°C e 2min de extensão. O produto amplificado foi diluído 1:10.000 e levado a uma "nested" PCR com utilização dos iniciadores Lmp1NF e Lmp1NR e associação e extensão a 72°C por 1,5min. O produto foi em seguida clonado em pGEM-T e sequenciado. Obtivemos o fragmento de 1235 bases por clivagem com as enzimas de restrição *Xho*I e *Eco*RI, que foi clonado no plasmídeo pEGFP-C1 aberto com as mesmas enzimas de modo a constituir uma fusão da ORF de Lamp1 com GFP.

Macrófagos J774 foram transformados com o plasmídeo pEGPF-C1 para

testar a funcionalidade do vetor no hospedeiro (Figura 16A). Podemos observar em

detalhe que o macrófago transformado expressa GFP em todo o citoplasma (Figura

16B), indicativo que a transfecção foi bem sucedida e que o marcador pode ser

utilizado.



Figura 16. Avaliação de funcionalidade de pEGFP-C1 em macrófagos. Microscopia confocal de macrófagos J774 transfectados com pEGFP-C1, mostrando as células expressando GFP em um campo geral (A) e um detalhe de duas células, o macrófago à esquerda provavelmente não carrega o plasmídeo, enquanto que da direita deve ter sido transfectado pois expressa GFP uniformemente em todo o citoplasma (B). O primeiro quadrante representa a fluorescência de GFP detectada em 525nm; o segundo quadrante representa o contraste de fases, e o terceiro quadrante é a sobreposição das imagens.

RNA total de macrófagos foi utilizado em transcrição reversa utilizando oligo(d)T como iniciador. Em seguida, fizemos uma primeira PCR com oligonucleotídeos externos à ORF de Lamp (Lamp1F e Lamp1R da Tabela 1, em Material e Métodos), uma vez que o início da sequência corresponde a uma região muito rica em G-C, o que eleva a temperatura de associação do oligonucleotídeo senso para 77°C (Tabela 1). Dessa forma amplificamos uma região que corresponde a toda ORF e mais 47 nucleotídeos da região 5'UTR e 31 da região 3'UTR. Em seguida fizemos um "nested" PCR com esse DNA como molde, com os iniciadores Lamp1NF e Lamp1NR (Tabela 1), o que nos possibilitou diminuir a temperatura de associação sem que ocorra amplificação inespecífica. O produto de PCR obtido, correspondente a 1235 pares de base, foi então clonado em pGEM-T Easy e seguenciado (Figuras 15 e 17).



Figura 17. Sequências de Lamp1. Alinhamento de 3 clones (8, 4 e 7) obtidos da ORF de Lamp1 de *Mus musculus* com a sequência do banco de dados. No consenso, em rosa, a região dos oligonucleotídeos, e em destaque (rosa choque) nessas regiões, sítio para *Xho*I (no início da ORF) e *Sac*II (fim da ORF).

DNA dos plasmídeos selecionados foi recuperado de *E. coli* por preparação em média escala e utilizado em ensaio de transfecção de macrófago J774, nas condições descritas em Material e Métodos. Como se observa na Figura 18, em alguns macrófagos foi possível detectar a proteína fluorescente ligada à Lamp1,em localização que deve corresponder ao lisossomo ou autofagossomos dos macrófago. Dessa forma, a construção é funcional e assim foi possível selecionar macrófagos expressando GFP-Lamp1. Para isso, utilizamos o dobro do valor da CL₉₅, uma concentração de 400µg/mL de Neomicina previamente determinada pela

curva dose resposta em macrófagos J774 não transfectados após 48 horas (figura 19), quando foram obtidos os valores de CL_{50} de 25,6µg/mL e de CL_{95} de 203,7µg/mL.



Figura 18. Marcação de GFP-Lamp1 indica a membrana do fagossomo. Macrófagos J774 transfectados com pEGFP-Lamp1, que marca em fluorescência verde lisossomos e fagolisossomos numa visão em menor aumento (A) e em maior detalhe (B). O primeiro quadrante representa a fluorescência de GFP detectada em 525nm; o segundo quadrante representa o contraste de fases, e o terceiro quadrante é a sobreposição das imagens.



Figura 19. Curva dose-resposta de neomicina em macrófagos. Curva de resposta de macrófagos J774 à concentração de neomicina após 48 horas de tratamento, a 37°C, com 10⁵ células por tratamento. Células foram contadas em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) e o valor relativo de sobreviventes calculado pela divisão do número de sobreviventes pelo número de células no tratamento sem droga.

4.1.5 Purificação de fagolisossomos pEGFP-Lamp1

Os macrófagos pEGFP-Lamp1 (pEL) selecionados foram recuperados em garrafas de cultura e cultivados rotineiramente em RPMI com 500µg/mL de neomicina. Essas células foram infectadas por *L.(L.) amazonensis* RFP e a seguir fizemos a lise das mesmas e a citometria de fluxo visando observar duas fluorescências, verde proveniente da GFP-Lamp1 do macrófago e vermelha da RFP dos parasitas (Figura 20). Como controles, utilizamos pEL com parasitas selvagens, macrófagos selvagens com parasitas RFP e macrófagos/parasitas selvagens.



Figura 20. Avaliação de marcação pEGFP-Lamp1 em citômetro de fluxo. Citometria de fluxo com "dot plot" de "Forward Scatter" (FSC-Height) por "Side Scatter" (SSC-Height) e de fluorescência de GFP (FL1-GFP) por RFP (FL2-RFP), obtido a partir de lisado de infecção de macrófagos com *L. (L.) amazonensis*. A - Macrófago J774 e *L. (L.) amazonensis* selvagens. B - Macrófago pEGFP-Lamp1 (pEL) e *L. (L.) amazonensis* RFP. C - Macrófago selvagem e *L. (L.) amazonensis* RFP. D - Macrófago pEL e *L. (L.) amazonensis* selvagem.

Levamos esse mesmo material para observação em microscopia confocal, e observamos fluorescência verde bastante fraca nas partículas que apresentavam fluorescência vermelha (Figura 21).



46

Figura 21. Avaliação microscópica de pEGFP-Lamp1 em fagolisossomos. Partículas de lisado de macrófago J774 expressando eGFP fundida à Lamp1 infectado com *L.* (*L.*) amazonensis expressando RFP observada ao microscópio confocal com canal vermelho marcando RFP (1^a. imagem), transmissão (2^a. Imagem), verde marcando GFP (3^a. imagem), azul marcando DAPI (4^a. imagem) e sobreposição de todos os canais (5^a. imagem).

4.2 Caracterização do gene do transportador de arginina de *L. (L.)* amazonensis

4.2.1 Busca inicial

A estratégia inicial foi utilizar a sequência dos iniciadores descritos para amplificar AAP3 de *L. (L.) donovani* (Shaked-Mishan e col. 2006) usando como molde o DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*. Para padronizar a PCR avaliamos a melhor temperatura de associação dos iniciadores desenhados com o DNA de *L. (L.) donovani* como molde. Conforme observamos na Figura 22, a melhor temperatura de associação foi de 52°C; temperatura menor não aumentou a intensidade da banda, enquanto que maior diminuiu a quantidade de produto (Figura 22). No entanto, quando as mesmas condições foram aplicadas tendo DNA de *L. (L.) amazonensis* como molde, nenhum produto foi formado (Figura 22).

λ/HindIII	A-50	A-52	A-54	A-56	A-58	A-60	D-50	D-52	D-54	D-56	D-58	D-60	0
			te.				Y						
• • •													
(uu)						•							
-				•					,				
->							-	-	-	-			
		•											
						•							

Figura 22. PCR para isolamento do fragmento de DNA codificador do transportador de arginina. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR em gradiente de temperatura de associação dos iniciadores, para *L. (L.) amazonensis* (A) e *L. (L.) donovani* (D), de 50 a 60°C. Os números em frente às letras indicam a temperatura usada, em graus Celsius; a seta indica altura da banda de interesse. *NHin*dIII - DNA de bacteriófago λ digerido com *Hin*dIII usado como marcador de tamanho molecular; 0 - controle negativo (sem DNA).

O produto de aproximadamente 1500 pares de bases obtido com DNA de

L. (L.) donovani tem o tamanho esperado, segundo sequência descrita no GenBank com o número AY247004 que foi indicada como sendo a que codifica o transportador de arginina AAP3 de *L. (L.) donovani.* O produto foi purificado e ligado em pGEM-T e utilizado para transformar *E. coli* SURE, como descrito em Material e Métodos. De 5 clones selecionados, 3 foram escolhidos para sequenciamento, pois após terem seu DNA digerido com *Eco*RI apresentavam insertos do tamanho esperado (Figura 23). A sequência de nucleotídeos parcial, obtida de um dos clones, foi alinhada com a sequência de AAP3 de *L. (L.) donovani.* Podemos observar na Figura 24 a similaridade que indica ser o gene homólogo. Um desses plasmídeo foi utilizado para a produção de sonda na busca do gene na biblioteca de cosmídeos de *L. (L.)*

amazonensis.



Figura 23. Confirmação de fragmento de DNA contendo o gene que codifica o transportador de arginina. Digestão de DNA de "mini-preps" de 5 clones selecionados. Os clones 1, 2 e 3 passaram então por sequenciamento, conforme descrito nos métodos. ND - plasmídeo não digerido; D - plasmídeo digerido. *λ/Hin*dIII - DNA de bacteriófago *λ* digerido com *Hin*dIII usado como marcador de peso molecular. Setas indicam as bandas de interesse.

Clone Obtido AY247004	AT GA GCA A GC C C A G C C T A T T C C A G C A C A G G C G G G G G G G G G	69 69
Clone Obtido AY247004	GGGAACCCCGGCAACGCCGTCGATAAACACCCGAGCGGCGAGCAGGGCAACCATCTCCACAAAAACGGA	138 138
Clone Obtido AY247004	AGCCTGACGGCCTCATCAAGCCACAATGA <mark>C</mark> AACGG <mark>T</mark> GCCGACGCCGCCAAGCCGGGGCGCAACATCATC	207 207
Clone Obtido AY247004	TTCCGCTTCACCGGGTGGCTGATACCCTATGGCGGTGTCATCTCGAACTGCTTCAGCCTTGGCTCCGTC	276 276
Clone Obtido AY247004	ACACTCGGCGGCGGTATTATCTCGATGCCGTCCTCCTTCGCCATGTCGGGCATCATCATGTCTGTC	345 345
Clone Obtido AY247004	TACCTCGTGGTCATTACGGCGGCGACGGTGTACACCATGACGCTGCTTGGCTACGCGATGAAGGCGACG	414 414
Clone Obtido AY247004	GGCTGCAAAACGTTTGAGGAGCTGTCTCACGTGCTCTTTGGTCGCGGCTGGGACTACTTCGTTGGGTTT	483 483
Clone Obtido AY247004	GTCCTGTGGCTGTCGTGCTTCGGCACGGCGGTCGCCTACATCAGCGCCGTCAGCAGCCTCATCACACCG	552 552
Clone Obtido AY247004	ATCCTCGAGAAGTCGCCCGGCACGCCCGCGTACCTGCTAACCACCTCCGGCAACCGCCTGATCACGAGC	621 621
Clone Obtido AY247004	CTGATACGGCTCGTGTTCATGGTGCCAGTCGTGATTCCGAAGCGCGTAA-CAGCATCCGCTACGTCTCC	689 690
Clone Obtido AY247004	GCAATCGGTGTCTTCATGGTGCTGTATTTTGCCGTCACTATTGTGGTGCACTCGAGCATGAATGGGCTG	758 759
Clone Obtido AY247004	AAGGAGGGCATGCGCGGGGACATGAAGTACTTCACCAGCGGCAACGAAGCGGTTTACGGATTGTCCATC	827 828
Clone Obtido AY247004	TTCATTTTCTCGTTTCTGTGCCAGGCTGTGACGGGGTCAGTGTACTTCGAGCAGCGCCCTCGCCCGTCT	896 897
Clone Obtido AY247004	GTACGCCAGCTGACGATCGCGAGTGCGATCTCGATGACGGTGTGCATGGTGCTGTACATCTTTACCGGC	965 966
Clone Obtido AY247004	GTCTTTGGCTACTTCGACTTCGCGGACGATACACAGGACTCCATCCTGTACAACTTCGACCCTGTGCAT	1034 1035
Clone Obtido AY247004	CAGCCGTACATGATGATCGCGTACATTGGCATGCTGATCAAGATCTGCGCCGCCTTTGCGATGAACATG	1103 1104
Clone Obtido AY247004	CTGCCGTGCCGAAACTTCGCCTACCACTGCCTGAACTGGGATCTGGAGACGGTGCCGTACTGGAAGCAC	1172 1173
Clone Obtido AY247004	ACCATCGCGATTCTCACCATGGCTGTCGCCACCCTTGTGTGCGGTCTGTTCATCCCGAGCATCAACACG	1241 1242
Clone Obtido AY247004	GCTTTCGGTTTGGTGGGCTCCCTGTGCGGCGGGGTTCATCGGCTTCATCTTCCCTGCGTACTTTTGGATG	1310 1311
Clone Obtido AY247004	TACAGCGGCAACTGGAGCCTGTCATCTGTGGGCATCTGGCACTGGCGACGTACTTCCTCGTGGTG	1379 1380
Clone Obtido AY247004	GCGGGTGTCATTGCAGTTGTGTTTGGCACCATTTCGACCGTGTACTACAGCTTCTTCGTGTAG 1442 	

Figura 24. Sequência de AAP3 de *L. (L.) donovani.* Alinhamento da sequência do clone obtido com a sequência do gene do transportador de arginina de *L. (L.) donovani* (AY247004). Estão assinalados os nucleotídeos diferentes.

4.2.2 Varredura da biblioteca de cosmídeo

A biblioteca de cosmídeos foi plaqueada de forma que obtivéssemos 10.000 clones por placa, o que daria uma representação de 10 cópias de cada clone em cada placa. O DNA dessas bactérias foi transferido para membrana de "nylon" como descrito em Material e Métodos. A Figura 25 apresenta o resultado da hibridação de uma das membranas com a sonda correspondente ao produto de PCR de *L. (L.) donovani*, marcado radioativamente, como descrito em Material e Métodos.



Figura 25. Varredura da biblioteca de cosmídeos. A. Autoradiograma da placa que resultou sinal positivo para alguns clones (assinalado pelas setas) com sonda construída com o fragmento que codifica o transportador de arginina descrito para *L. (L.) donovani* (pontos azuis indicam marcações para alinhamento na placa de Petri); B. "Dot blot" controle da marcação da sonda de gene do transportador de arginina de *L. (L.) donovani*. (L) = controle fosforescente, (+) = 50 ng de pGEM-T+AY247004; (-) = 50 ng pUC-18.

Os clones positivos foram então recuperados e seu DNA foi extraído e digerido com enzimas *Eco*RI, *Hin*dIII e *Xho*I. Os produtos da digestão foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1%, e em seguida transferidos para membrana de nylon. DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) donovani* também foi digerido com as mesmas enzimas, para comparação de padrão de bandas positivas. A enzima *Xho*I produziu duas bandas detectadas tanto no DNA genômico quanto na digestão dos cosmídeos. Esses dois fragmentos são de aproximadamente 4000 e 2000 pares de base (Figura 26).



Figura 26. "Southern blot" para transportador de arginina. "Southern blot" de DNA genômico de L. (L.) amazonensis e L. (L.) donovani em A e de DNA de 2 cosmídeos recuperados da biblioteca em B. Os números em preto indicam a altura de bandas de DNA de bacteriófago λ digerido com *Hind*III; as setas brancas indicam bandas de interesse. A. AX, AH e AE - DNA de L. (L.) amazonensis digerido com *Xhol*, *Hind*III e *Eco*RI respectivamente; DX, DH e DE - DNA de L. (L.) donovani digerido com *Xhol*, *Hind*III e *Eco*RI respectivamente; B. DNA de cosmídeo dos clones 21 e 22, digerido com *Eco*RI, *Hind*III e *Xhol*, respectivamente E, H e X após o número do clone.

Uma vez identificados fragmentos de DNA presentes no cosmídeo de L.

(*L.*) *amazonensis* que apresentavam complementariedade com *AAP3* de *L.* (*L. donovani*) Os fragmentos de interesse foram eluídos do gel, ligados em pBlueScript e utilizados para transformar *E. coli*. Digestão com a enzima *Xho*I dos clones selecionados mostrou a presença de inserto do tamanho próximo ao esperado, e estes foram, então, selecionados para sequenciamento (Figura 27).



Figura 27. Confirmação de clones com fragmento esperado. Digestão de DNA recombinante resultado da transformação de plasmídeo pBlueScript ligado com fragmento de DNA de cosmídeo. Números nas laterais indicam o tamanho em 1000 bases (Kb). Setas brancas indicam fragmentos do tamanho esperado. Números em branco superiores a dois poços contíguos indicam o número do clone, sendo o poço da esquerda, digerido e o da direita, não digerido. Asteriscos marcam clones selecionados para sequenciamento.

O sequenciamento parcial do DNA de três dos clones (13, 45 e 51) selecionados mostrou similaridade de sequência com AAP3 de *L. (L.) donovani*, sugerindo tratar-se de sequência do transportador de arginina para *L. (L.) amazonensis.* A Figura 28 mostra o alinhamento das sequências parciais obtidas dos 3 clones, alinhadas com as sequências do transportador de *L. (L.) donovani*, do banco de dados ou obtida por PCR, a partir de DNA genômico daquele organismo, como descrito nos Materiais e Métodos.



53

Figura 28. Sequência parcial do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Alinhamento das sequências de clones de transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis*. AAP3 obtida: transportador de arginina clonado e sequenciado anteriormente, a partir de *L. (L.) donovani*. AAP3 B. Dados: sequência de *L. (L.) donovani* obtida do banco de dados GenBank (AY247004).

Podemos notar que, embora o consenso das sequências de L. (L.)

amazonensis tenha uma identidade de 518 dos 561 nucleotídeos com a sequência

que codifica o transportador de *L. (L.) donovani*, os 20 primeiros nucleotídeos da ORF apresentam diferença de 4 nucleotídeos, inclusive no nucleotídeo 19. Com a sequência consenso, desenhamos alguns oligonucleotídeos tanto para obter as sequências vizinhas por "walking" no cosmídeo, como para obter a região 5'UTR por transcrição reversa seguida de PCR a partir de RNA total de promastigotas e posteriormente a sequência de nucleotídeos dessa região 5'UTR. A sequência inicialmente determinada possibilitou ainda desenhar iniciadores para PCR quantitativo para tempo real. A posição dos iniciadores encontra-se destacada na figura 29.

TArglF ATG AGC AAG CCT AAC GAG CCT GTT CCA GCA CAG GCG GGG GGC CAG ATC CTG AGC GAC TCG CTG ATG GAC GGG AAT Consensus TAC TCG TTC GGA TTG CTC GGA CAA GGT CGT GTC CGC CCC GTC TAG GAC TCG CTG AGC GAC TAC CTG CCC TTA

and transformed by the second seco Consensus TAralR TArg2R TCA TCG AGC CAC AAT GGC AAC GGT GCC GAC GCC GCC AAG CCG GAG CGC AAC ATC ATC TTC CGG TTC ACC GGG TGG Consensus A GT A GC TCG GTG TTA CCG TTG CCA CGG CTG CGG CGG TTC GGC CTC GCG TTG TAG TAG AAG GCC AAG TGG CCC ACC CTG ATA CCG TAT GGG GGT GTC ATC TCG AAC TGC TTC AGC CTT GGC TCC GTC ACA CTC GGC GGC GGT ATC ATC TCG Consensus GAC TAT GGC ATA CCC CCA CAG TAG AGC TTG ACG AAG TCG GAA CCG AGG CAG TGT GAG CCG CCG TAG TAG AGC ATG CCG TCC TTC GCC ATG TCG GGC ATC ATC ATG TCT GTC ATC TAC CTG GTG GTC ATC ACA GCG GCG ACG GTG Consensus TAC GGC AGG AGG AAG CGG TAC AGC CCG TAG TAG TAC AGA CAG TAG ATG GAC CAC CAG TAG TGT CGC CGC TGC CAC Consensus TAC ACC ATG ACG CTG CTT GGC TAC GCG ATG AAG GCG ACG GGC TGC AAA ACG TTC GAG GAG CTG TCT CTC GTG CTC ATG TGG TAC TGC GAC GAA CCG ATG CGC TAC TTC CGC TGC CCG ACG TTT TGC AAG CTC CTC GAC AGA GAG CAC GAG TArg2F TTT GGT CGC GGC TGG GAC TAC TTC GTT GGG TTT GTC CTG TGG CTG TGC TTT GGC ACG GCG GTC GCC TAC ATC AAA CCA GCG CCG ACC CTG ATG AAG CAA CCC AAA CAG GAC ACC GAC ACG AAA CCG TGC CGC CAG CGG ATG TAG Xhol 560 AGC GCC GTC AGC AGC CTC ATC ACG CCG ATC CTC GAG Consensus TCG CGG CAG TCG TCG GAG TAG TGC GGC TAG GAG CTC

Figura 29. Oligonucleotídeos para obtenção de complemento da sequência do transportador. A sequência de nucleotídeos obtida por consenso de sequenciamento de 3 clones que contém fragmento do cosmídeo selecionado por hibridação com AAP3 de *L. (L.) donovani.* Posição dos oligonucleotídeos desenhados para auxiliar a caracterização do fragmento putativo de codificar o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.*

54

4.2.3 Sequenciamento da Fase Aberta de Leitura (ORF)

Padronizamos reações de sequenciamento de DNA do cosmídeo utilizando o oligonucleotídeo TArg2F como iniciador e variando a quantidade de DNA do cosmídeo entre 4 a 32µg. O melhor cromatograma foi obtido com uma massa de 16µg de cosmídeo, gerando uma leitura com mais de 600 bases contínuas. Com isso, foi possível a obtenção da sequência até a posição de 1190, restando cerca de 250 bases para o final da ORF. Em seguida, desenhamos os iniciadores TArg3F, TArg4F e TArg5F, que nos permitiu determinar a ORF completa, conforme alinhamento observado na Figura 30.

		20		40		60		80 1	
H Q91 202 7 XM_00146 734 6 XM_00146 731 3 AY24 7004 XM_00168 502 0 XM_00156 705 0 Consensus	A TGAG CAAGC A TGAG CAAGC A TGAG CAAGC A TGAG CAAGC A TGAG CAAGC A TGAG CAAGC A UGAG CAAGC	TAA GAG CAG GAG CAG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	TGTTCAGCA TATTCCAGCA TATTCCAGCA TATTCCAGCA TATTCCAGCA TATTCCAGCA UAUUCCAGCA		G CAGATCT G CAGGTCT G CAGGTCT G CAGGTCT G CAGGTCT G CAGGTCT G CGAGGTCT G CGAGGUCCU	GAG GA T G GAG GA T G GAA T GG T G GAA C GA C U CG	TGA TGGA CG TTA TAGA CG TTA TAGA CG TTA TAGA CG TTA TGGA CG TTA TGGC CG TTA TGGC CG CUUAUNGA CG	GGAACCCCNGG	80 80 80 80 80 80
Conservation				1100 1200 1200 1200 1200 1200 1200 1200		140		160	160
XM_001467346 XM_001467313 AY247004 XM_001685020 XM_001567050 Consens us	CAACGCCGTC CAACGCCGTC CAACGCCGTC CAACGCCGTC CAACGCCGTC CAACGCCGUC	GA TAXA CA CC GA TAXA CA CC GA TAXA CA CC GA TAXA CA CC GG TG TGA CC GAUAAA CA CC	CGAG CGC CGA CGAG CGC CGA CGAG CGC CGA CGAG CGC CGA CGAG CGA CGG CGAG CGG CGA	G CAGGG CAAC G CAGGG CAAC G CAGGG CAAC G CAGGG CAAC G CAGGG CAAC G CAGGG CAAC	CATCTCACA CATCTCACA CATCTCACA CATCTCACA CACCTCACA AACCTCTCACA CAUCUCCACA	AAAA GGAAG AAAA GGAAG AAAA GGAAG AAAG GGAAG AAAG GGAAG AAAG GGAAG AAAN CGGAAG	CCTGA CGGC CCTGA CGGC CCTGA CGGC CCTGA CGGA CCGA CGGA CCUGA CGGN C	TCATCAAGCC TCATCAAGCC TCATCAAGCC TCGTCAAGCC TCCACTGGTC UCAUCAAGCC	160 160 160 160 160
Conservation		100 IN						240	
H Q91 202 7 XM_00146 7346 XM_00146 7313 AY24 7004 XM_00168 502 0 XM_00156 705 0 Consens us	A CAATGG CAA A CAATGAAAA A CAATGAAAA A CAATGGAAA A CAATGG CAA A CAAUGAAAA	GG TG C GA GG C GA GA GG C GA GA GG C GA GA GA GA GG C GA GA GA GA GA GA GA GA GA GA GA GA GA G		GG G G G G G AA GGGG G G G AA GGGGG G G AA GGGGG G G AA GGG G G C AA GGG G G C AA CGGNG CG CAA			GGTGG CTGAT GGTGG CTGAT GGTGG CTGAT GGTGG CTGAT GGTGG CTGAT GGTGG CTGAT GGUGG CUGAU	ACCCUAUGGC	2 40 2 40 2 40 2 40 2 40 2 40 2 37
Conservation		260		280		300		320	
H Q912027 XM_001467346 XM_001467313 AY247004 XM_001685020 XM_001567050 Consensus	GGTGTGTCATCT GGTGTCATCT GGTGTCATCT GGTGTCATCT GGTGTCATCT GGTGTCATCT GGUGUCAUCU	CAACTCCTT CAACTCCTT CAACTCCTT CAACTCCTT CAACTCCTT CAACTCCTT CAACTCCTT CAACUCCUU	CAGCCUUGGC	TE CG TEA CA TE CG TEA CA UCCGU CA CA C	T CGG CGG CGG T CGG CGG CGG U CGG CGG CGG	TATTATTTG TATTATTTG TATTATTTG TATTATTTG TATTATTTG TATTATTTG CATCATCTCG UAUUAU CU CG	A TGC CGT CGT A TGC CGT CGT		320 320 320 320 320 320 317
Conservation a		340		360		380		400	
H Q912027 XM_001467346 XM_001467313 AY247004 XM_001685020 XM_001567050 Consensus Conservation	GT CGG CAT GT CGG CAU C	ATCATGTCTG ATCATGTCTG ATCATGTCTG ATCATGTCTG ATCATGTCTG ATCATGTCTG ATCATGTCTG AUCAUGUCUG	TCATCTACT TCATCTACCT TCATCTACCT TCATCTACCT TCATCTACCT TCATCTACCT TCATCTACCT TCATCTACCT TCATCTACCT TCATCTACCT	GGTGGTGAT GTGGTGAT GTGGTGAT GTGGTGAT GTGGTGAT GTGGTGAT GTGGTGTTGT CGUGGUCAUU	A CGC CGC CGA A CGC CGC CGA	GG TG TA CA C GG TG TA CA C CG GU GU A CA C	CATGA CG CTG CATGA CG CTG CATGA CG CTG CATGA CG CTG CATGA CG CTG CATGA CG CTG CATGA CG CUG	TTGG TA G TTGG TA G TTGG TA G TTGG TA G TTGG TA G TTGG TA G CTGG TA G CUUGG CUA CG	400 400 400 400 397
H Q912027 XM_001467346 XM_001467313 AY247004 XM_001685020 XM_001567050 Consensus 1000 Conservation 000	GA TGAAGG CA TGAAGG GA TGAAGG GA TGAAGG GA TGAAGG CA TGAAGG CGAUGAAGG CGAUGAAGG C	GA CGGG TG GA CGGG TG GA CGGG TG GA CGGG TG GA CGGG TG GA CGGG CUG C	AAAA CG TT G AAAA CG TT TG AAAA CG TT TG AAAA CG TT TG CAAA CG TT G CAAA CG TT G AAAA CG TT G AAAA CG TT G	AGGAG CTGTC AGGAG CTGTC AGGAG CTGTC AGGAG CTGTC AGGAG CTGTC AGGAG CUGUC	TETEGTGETE TETEGTGETE TETEGTGETE TETEGTGETE UCUCGUGCUC	TTTGGTGG TTTGGTGGG TTTGGTGGGG TTTGGTGGGG TTTGGTGG	G TGGGA TA G TGGGA TA G TGGGA TA G TGGGA TA G TGGGA TA G TGGGA TA G CUGGGA CUA		480 480 480 480 480 477
H Q91202 7 XM_00146 7346 XM_00146 7313 AY24 7004 XM_00168 502 0 XM_00156 705 0 Consens us	TTTGTCCTGT TTTGTCCTGT TTTGTCCTGT TTTGTCCTGT TTTGTCCTGT TTTGTCTCTCT		CTTTGGCACG CTTCGCACG CTTGGCACG CTTGGCACG CTTGGCACG CTTGGCACT CUUCGGCACG		A CATCAG CG C A CAU CAG CG C	GT CAG CAG C CGT CAG CAG C CGU CAG CAG C	CTCATCACGC CTCATCACAC CTCATCACAC CTCATCACAC CTCATCACAC CTCATCACAC CTCATCACAC CTCATCACAC	GATECTEGA CGATECTEGA CGATECTEGA CGATECTEGA CGATECTEGA CGATECTEGA CGAUCCUCGA	560 560 560 560 560 557
Conservation						633		640	
H Q91 202 7 XM_00146 7346 XM_00146 7313 AY24 7004 XM_00168 502 0 XM_00156 705 0 Consensus	GAAGTCGCCC				GGCAACGCC GGCAACGGC GGCAACGGC GGCAACGGC GGCAACGGC GGCAACGGC GGCAACCGCC	TGATCACGAG TGATCACGAG TGATCACGAG TGATCACGAG GCATCACGAG UGAUCACGAG	C TGA TA TGG C TGA TA TGG C TGA TA TGG TC TGA TA TGG C TGA TA TGG C TGA TA TGG C C UGAUAUGG		640 640 640 640 640 637
Conservation		660		630		700		720	
H Q912027 XM_001467346 XM_001467313 AY247004 XM_001685020 XM_001567050 Consensus	TGG TG C CG T TGG TG C CAG T UGGUG C CAG U	GTGATTEG GTGATTEG GTGATTEG GTGATTEG GTGATTEG GTGATTEG	AAGCGCGTAA AAGCGCGTAA AAGCGCGTAA AAGCGCGTAA AAGCGCGTAA AAGCGCGTGA AAGCGCGTGA	A CAG CA T C CG A CAG CA T C CG		G CAATCGG TG G CAATCGG TG G CAATCGG TG G CAATCGG TG G CAATCGG TG G CAATCGG TG G CAAUCGGUG	TETERATGET TETERATGET TETERATGET TETERATGET TETERATGET UCUCCAUGGU	GETGTATTTT GETGTATTTT GETGTATTTT GETGTATTTT GETGTATTTT GETGTATTTT GECUGUAUUUU	720 720 720 720 720 720 717
0		740		760		780		800	
H Q912027 XM_001467346 XM_001467313 AY247004 XM_001685020 XM_001567050 Consensus	G C C C C A C A G C C C T C A C T A G C C G T C A C T A G C C G T C A C T A G C C G T C A C T A G C C G T C A C T A G C C G T C A C T A	TTGTGGTGCA TTGTGGTGCA TTGTGGTGCA TTGTGGTGCA TTGTGGTGCA UUGUGGUGCA	TT GAG CATG TT GAG CATG CT GAG CATG CT GAG CATG CT GAG CATG CT CAG CATG CT CAG CATG CU CGAG CAUG	A TGGG TGA AA UGGG CUGA	AGGAGGG CA T AGGAGGG CA T AGGAGGG CA T AGGAGGG CA T GGGAAGG CA T AGGAGGG CA T	G G G G G G G A G G G G G G G G G A G G G G	A TGAAG TA C T A UGAAGUA CU	TCA CCAG CGG TCA CCAG CGG TCA CCAG CGG TCA CCAG CGG TCA CCAG CGG TCA CCAG CGG	800 800 800 800 800 797
- senservation									



Figura 30. Sequência completa da ORF que codifica o transportador de arginina de L. (L.) amazonensis. Alinhamento da sequência obtida do transportador de arginina de L. (L.) amazonensis (HQ912027) com sequências obtidas do GenBank de L. (L.) infantum (XM_001467346 e XM_001467313), L. (L.) donovani (AY247004), L. (L.) major (XM_001685020) e L. (V.) braziliensis (XM_001567050).

57

4.2.4 Mapeamento da região 5'UTR

Utilizamos o iniciador TArg1R numa reação de transcrição reversa, partindo de RNA total de promastigotas, e em seguida fizemos RT-PCR utilizando o oligonucleotídeo Targ2R em conjunto com o oligonucleotídeo MedL, desenhado a partir do exon de SL-RNA de *L. (L.) amazonensis*. Esse iniciador é complementar à sequência do mini-exon de *L. (L.) amazonensis* que é adicionado por "*trans*-splicing" à 5' de todos os mRNAs do parasita. Assim, a utilização do Targ2R permitiu uma maior especificidade na reação, pois esse é um iniciador localizado à montante daquele utilizado na transcrição reversa (TArg1R). Como resultado dessa estratégia foram observadas duas bandas bem definidas no RT-PCR de *L. (L.) amazonensis*, e nenhuma banda no controle (B) ou no RT-PCR de *L. (L.) donovani* (Figura 31). As bandas correspondem a fragmentos de DNA amplificados que apresentaram um tamanho aproximado de 1000 pares de base e de 500 pares de base.



Figura 31. Obtenção da região 5'UTR do gene do transportador de arginina de L. (L.) amazonensis. RT-PCR de cDNA obtido por transcrição reversa de RNA total de L. (L.) amazonensis (La) e L. (L.) donovani (Ld). M: marcador de tamanho molecular; as bandas mais fortes de cima para baixo correspondem a fragmentos de 3000, 1000 e 500 pares de bases, respectivamente.

Esses fragmentos foram eluídos e ligados em pGEM-T e utilizados para transformar *E. coli*. DNA dos plasmídeos dos clones selecionados foi obtido e digerido com *Eco*RI para verificar a presença do inserto (Figura 32).

М	1	*	2	3*	4	5	*	6	7*	8	9]	0	11*	12	13	14	15*	16*	17*	18*	19	20*	U1*	U2*	U3*	U4*
		-		12	i vint 🛶			-	==	· 100 -	-	-		-	-	-	101 =		101-	-						٤	
1.000	-			_ 1		-	2.				-	-									-	-3	_				Ŀ
																											-

Figura 32. Digestão de DNA de "mini-prep" para verificar presença de inserto. M: marcador de peso molecular (DNA de λ digerido com *Hin*dIII); Números superiores aos poços correspondem ao número do clone; Asteriscos indicam clones selecionados para sequenciamento.

Em 8 das sequências com fragmentos de 500 bases e em 4 das

sequências dos fragmentos de 1000 bases encontramos os iniciadores utilizados no

RT-PCR. Foi importante a escolha de iniciadores antes de uma região conhecida,

pois assim sabemos que o produto não se trata de amplificação não específica no

PCR, já que encontramos uma região interna do SL depois do iniciador utilizado, e

um bom pedaço da ORF antes do iniciador anti-sense utilizado (Figura 33).



Figura 33. Sequência do fragmento menor correspondente à região 5'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Alinhamento de sequência de DNA de fragmentos de 400 bases da região 5'UTR do gene do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis*. Na sequência consenso, em destaque: azul-MedL; rosa-continuação do SL; amarelo-ORF; verde-TArg2R.

As sequências de nucleotídeos do fragmento de 984 pares de bases

também apresentaram os oligonucleotídeos utilizados na PCR, certificando a

especificidade da reação. Além disso, essas sequências alinharam com o início da OFR do gene que codifica o transportador de arginina. (Figura 34).





Figura 34. Sequência do fragmento maior correspondente à região 5'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Alinhamento dos clones com inserto de 984 pares de bases para a região 5'UTR do gene do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Na sequência consenso, em destaque: azul - MedL; rosa-continuação do SL; amarelo - ORF; verde - TArg2R.

O alinhamento dos consensos dos fragmentos de 984 bases e de 400

bases só foi conseguido quando eram introduzidos "gap" em ambas as sequências (Figura 35). Conforme observado no alinhamento dos consensos, a região da ORF e mais 27 bases à sua montante alinham-se bem, com 132 de 136 bases idênticas. Depois, começam alguns "gaps" e então uma região de 79 dentro de 80 bases é alinhada, aparece um "gap" de 8 bases, e uma região de 17 bases se alinha novamente. A partir desse ponto, somente a região de SL é alinhada (Figura 35).

62



Figura 35. Alinhamento de regiões 5'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis*. Alinhamento das sequências consensos dos fragmentos de 400 e 984 bases correspondentes à região 5'UTR do RNA codificador do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis*. Destaque: azul=MedL; rosa=continuação do SL; amarelo=ORF; verde=TArg2R.

As sequências dos 5'UTR, juntamente com suas respectivas ORFs, foram

63
depositadas no GenBank com os números de acesso HQ912026 (5.1AAP3, a cópia com 5'UTR de 984 bases) e HQ912027 (4.7AAP3, a cópia com 5'UTR de 400 bases). Os nomes foram dados pela estimativa do tamanho obtido à partir de "northern blot" (dados não mostrados).

4.2.5 Caracterização da região 3'UTR

Para caracterizar a região 3'UTR do transcrito correspondente ao gene do transportador de L-arginina de *L. (L.) amazonensis*, fizemos, a partir de RNA total de promastigotas, uma reação de transcrição reversa com oligo-d(T) com sequência adaptadora em sua extremidade 5' (oligonucleotídeo dTAdap de Tabela 1). Após a transcrição reversa, 1/10 do cDNA obtido foi utilizado em reação de PCR com 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 20s, associação a 54°C por 20s e extensão por 4min a 72°C, usando o oligonucleotídeo adaptador e o oligo TArg4F (Tabela 1). Inicialmente a amplificação gerou um "arraste" grande, como pode ser observado nas canaletas 1, 2 e 3 da Figura 36A. Desse modo, investimos em aumentar a especificidade da reação, fazendo um "semi-nested" PCR, utilizando o produto da reação anterior numa diluição de 1/10.000 vezes como "template" com 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 20s, associação a 60°C por 20s e extensão por 4min a 72°C, com os "primers" Adap e Targ5F (Tabela 1). Como podemos observar na canaleta 1 da Figura 36B, essa estratégia produziu duas bandas com tamanhos aproximados de 1800 e 1500 pares de base.



Figura 36. Fragmentos contendo a região 3'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR (A) e "semi-nested" PCR (B) da região 3'UTR do RNA que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* P = marcador de tamanho molecular; - indica o controle negativo do PCR; rt- - controle negativo da transcrição reversa; números nos poços - amostras; números ao lado do marcador de tamanho molecular - tamanho aproximado.

Os dois produtos foram purificados, clonados e sequenciados, e a

sequência de alguns dos clones, quando submetidas ao GenBank, indicaram similaridade com a parte da ORF do transportador, que inclui os códons de terminação, seguidas do que deve corresponder à região 3'UTR. Na Figura 37 apresentamos o alinhamento das sequências obtidas de cinco clones. Pode-se observar que a qualidade das sequências não está boa. Uma possível explicação poderia ser um consumo de T pela presença da cauda de poli-A nos clones, causando diminuição na altura dos picos do cromatograma. Mas também foram observados picos duplos.



Figura 37. Sequência parcial da região 3'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Alinhamento de 5 clones obtidos por transcrição reversa com oligo-d(T) e seguinte PCR "semi-nested" para 3'UTR do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* As 3 primeiras bases equivalem ao "stop codon". Os números ao lado da sequência indicam o clone sequenciado. As adenosinas no final da sequência são parte da cauda de poli-A encontrada.

Voltamos, então, a aplicar a estratégia de "walking" no cosmídeo selecionado da biblioteca genômica, para obter a sequência de uma das regiões 3'UTR completa. Assim, poderíamos desenhar oligonucleotídeo complementares ao final do transcrito para obtermos, por PCR, as duas cópias de 3'UTR detectadas. Inicialmente as reações de sequência apresentavam bases não identificadas no começo do 3'UTR, o que nos fez acreditar pudesse haver mais de um cosmídeo em nossa preparação. Usamos o DNA do cosmídeo para transformar *E. coli* novamente e repurificamos 8 clones isolados, para preparar DNA novamente. Na Figura 38 apresentamos o alinhamento das sequências de nucleotídeos obtida a partir de cada um dos oito cosmídeos por "walking".



Figura 38. Sequencia de nucleotídeos da região 3'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Alinhamento de sequências obtidas por "walking" em 8 cosmídeos selecionados, contendo o gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* As 3 primeiras bases equivalem ao "stop codon". Os números ao lado da sequência indicam o clone de origem.

Novamente, observamos o mesmo tipo de cromatograma das reações,

com paradas sempre nos mesmos lugares, também apresentando picos duplos de

cada reação de sequenciamento. Como na preparação de DNA dos cosmídeos usamos clones bem isolados para a obtenção desse material, chegamos à conclusão de que o cosmídeo apresenta as duas cópias do gene, e os locais de parada são justamente os pontos onde não há conservação da sequência entre as duas diferentes cópias.

Decidimos, então, fazer a subclonagem do cosmídeo, por PCR utilizando iniciador reverso ao 5'UTR. Usamos dois iniciadores reversos distintos das duas regiões 5'UTR (T500UR e T1kR) com iniciador direto no final da ORF (Targ4F) em amplificação no cosmídeo, como indicado na Figura 39. Utilizamos 35 ciclos de amplificação com associação a 55°C e 5 minutos de extensão.



Figura 39. Possível orientação dos genes do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Esquema de amplificação de região 3'UTR entre as duas cópias em tandem.

Foi então amplificado um fragmento usando o iniciador TArg4F com T500UR, demonstrando que as cópias se apresentavam em tandem, com a cópia de 4.7AAP3 à jusante da cópia 5.1AAP3. O fragmento foi clonado e sequenciado, e parte da sequência obtida é apresentada na figura 40.



69

Figura 40. Sequência de fragmento entre as duas cópias do gene que codifica o transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Alinhamento dos nucleotídeos de dois clones obtidos da amplificação da região entre as duas diferentes cópias do transportador (plasm7sp6 e plasm3t7) com a sequência obtida por "walking" no final da ORF no cosmídeo.

Fizemos, em seguida, mapa de restrição do segmento clonado, digerindo o plasmídeo contendo a região entre as duas cópias do gene. Baseados nesses resultados foram feitas sucessivas subclonagens e sequenciamentos, de forma a obter a sequência completa do "contig", conforme apresentado no Anexo I.

Com a sequência completa foi feita uma busca em banco de dados que indicou não haver similaridade da sequência intergênica com genes anotados. O sítio de sinalização para "trans-splicing" para a cópia de 5.1AAP3 foi mapeado e obedece o padrão canônico dessa sinalização, um AG precedido por uma "carreira" de pirimidinas. O sítio de poliadenilação, que embora não seja canônico nos tripanosomatídeos, também pode ser mapeado com sequências dos fragmentos obtidos a partir de cDNA produzido com oligo(d)T. O Anexo II apresenta o alinhamento das regiões 3'UTR de cada um dos dois genes.

4.2.6 Construção para transfecção em *L. (L.) amazonensis*

Para a construção de mutantes nocaute para o transportador de arginina, passamos a fazer clonagens de forma a colocar um cassete de resistência a drogas entre as regiões 5'UTR e 3'UTR do gene do transportador. Para tal, recuperamos plasmídeos contendo o cassete de resistência de neomicina e higromicina flanqueados por regiões 5' e 3'UTR do gene de di-hidrofolato redutase (Cruz e col. 1991). Assim, seria possível fazer recombinação homóloga utilizando as regiões 5'UTR e 3'UTR do gene alvo com o cassete de resistência entre eles. Obtivemos fragmento de 3'UTR do gene do transportador de arginina com sítios de *Xhol* e *Hind*III que foi ligado em pBlueScript para transformação em E. coli SURE. O DNA extraído dos clones obtidos foi sequenciado, confirmando a presença do inserto correto e com sítios presentes no pBlueScript, e foi chamado de pBs-3UTR.

Como os cassetes, contendo as regiões que codificam os marcadores de resistência, estavam clonados em pGEM-T Easy, a estratégia foi usar o sítio de *Eco*RI que flanqueia o inserto em ambos os lados para retirar o cassete e o ligá-lo no mesmo sítio de pBs-3'UTR, e posteriormente ligar o 5'UTR no sítio de *Not*I. No entanto, a seleção de colônia branco/azul não seria possível, uma vez que o plasmídeo já apresentava inserto no sítio de clonagem. Fizemos a seleção usando "screening" de colônia por PCR em placa de 96 poços, usando o iniciador DHFRas2 junto com M13R. Assim, somente haveria amplificação onde houvesse a inserção do cassete de resistência e na orientação correta (Figura 41).

70





Com essa estratégia foram selecionados 9 clones. DNA de plasmídeo foi recuperado conforme descrito nos Materiais e Métodos. Foi feita a digestão do DNA que permitiu selecionar 6 clones para sequenciamento, e parte das sequências do clone com a orientação correta é mostrada na Figura 42.



Figura 42. Sequência da construção para nocaute de transportador de arginina em *L.* (*L.*) amazonensis. Parte das sequências do 5'UTR de 5.1AAP3 (amarelo), cassete de resistência a neomicina com sinalizações para "*trans*-splicing" de DHFR-TS (ciano) e 3'UTR de 5.1AAP3 (verde). As partes em branco são fragmentos de pBlueScript SK+.

Realizamos a transfecção dos parasitas conforme descrito em Material e Métodos, e embora a transfecção tenha funcionado, evidenciado pelo controle de transfecção com pX-GFP, ainda não foi possível obter clones com o nocaute do transportador.

4.3 Avaliação da expressão dos genes

4.3.1 Quantificação de mRNA

Para avaliar a expressão dos genes que codificam o transportador de arginina de *L.(L.) amazonensis*, nos aproveitamos da diferença encontrada entre as duas cópias para desenhar iniciadores que amplificassem diferencialmente as cópias. Cada produto de PCR foi certificado, após clonagem e sequenciamento (Figura 43).



Figura 43. Fragmentos amplificados para PCR quantitativo em 5'UTR do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Alinhamento de parte das sequências de 4.7AAP3 e 5.1AAP3 com as sequências dos produtos amplificados para curva padrão de PCR em tempo real (4.7PB e 5.3PB, respectivamente).

DNA de cada um dos clones foi também utilizado para obtenção da curva

de calibração do PCR em tempo real. As curvas de amplificação são mostradas na





Figura 44. Curvas de calibração para PCR quantitativo de RNA codificador do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.* Curvas-padrão obtidas tendo como molde sequências específicas das regiões 5'UTR da cópia 4.7AAP3 (A) e 5.1AAP3 (B), demonstrando a linearidade (R² = 99%) em função do Ct para ambas as curvas, numa escala de amplificação entre 10² e 10⁸ cópias (indicado no eixo x apenas pelo expoente).

4.3.2 Quantificação do mRNA que codifica o transportador de arginina

ao longo da curva de crescimento.

A partir de $2\mu g$ do RNA total de promastigotas de cada ponto, extraído ao

longo da curva de crescimento, previamente tratados com DNase, como descrito em Material e Métodos, foi feita uma preparação de cDNA, por transcrição reversa utilizando "random primers" como iniciadores. Com essa preparação de cDNA quantificamos, então, ambas as cópias do mRNA do transportador ao longo da curva de crescimento do parasita. Para normalização utilizamos o número de cópias de mRNA codificador de GAPD. Observamos que ocorre um aumento na quantidade das cópias ao longo do desenvolvimento dos parasitas, principalmente da cópia 5.1AAP3. (Figura 45) Como podemos notar, a cópia 5.1AAP3 apresenta até 100 vezes mais cópias de mRNA que 4.7AAP3.



Figura 45. Expressão de mRNA de transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis* ao longo da curva de crescimento de promastigotas. Quantificação do mRNA das cópias de 4.7AAP3 e 5.1AAP3 ao longo da curva de crescimento dos promastigotas (colunas, escala esquerda) e curva de crescimento do parasita (linha, escala direita). Quantidade relativa de RNA obtida pela divisão da quantidade absoluta do respectivo RNA pela quantidade de mRNA de GAPDH. Média de 4 pontos independentes com barra de erro padrão.

Para certificar esse resultado, utilizamos cada um dos fragmentos específicos como sonda em um "Northern blot" contendo 5 µg de RNA total de promastigotas em fase logarítmica da cultura. A transferência do RNA desnaturado fracionado por eletroforese em gel de agarose, as condições de hibridação lavagem e exposição seguiram o descrito em Material e Métodos. A figura 46 confirma que cada sonda é específica para o transcrito para o qual foi desenhada e que o transcrito 5.1AAP3 é mais abundante do que o de 4.7AAP3.



Figura 46. Caracterização do mRNA codificador do transportador de arginina em *L. (L.) amazonensis.* "Northern blot" de 5µg de RNA total extraído de cultura de parasitas em fase logarítmica. Números indicam o tamanho. (A. sonda 5'UTR de 4.7AAP3; B. sonda 5'UTR de 5.1AAP3; * - membrana de nylon corada com azul de metileno, mostrando as 3 bandas de RNA ribossômico para certificar a quantidade de RNA aplicada na eletroforese.

4.3.3 Estabilidade do mRNA do transportador

Para avaliar se a diferença do número de cópias do transcrito detectada tanto por RT-PCR quantitativo como por "Northern blot" era um indicativo de uma maior expressão ou devido a uma maior estabilidade de uma das cópias do mRNA do transportador de arginina, realizamos ensaio com actinomicina, um inibidor de transcrição, e sinefungina, inibidor de "*trans*-splicing", de modo a inibir a síntese e a maturação de RNA e assim podermos determinar a meia-vida de cada transcrito. Avaliamos, por PCR em tempo real, a quantidade das duas cópias de mRNA do

transportador, de mRNA de GAPDH e do SSUrRNA, normalizando os três primeiros pela quantidade de cópias de SSUrRNA (Figura 47). Os dados revelaram uma meiavida de 32,6±5,0min para 4.7AAP3, e de 29,2±8,8min para GAPDH, enquanto que não foi possível ver degradação do mRNA de 5.1AAP3 até os 180min.





Figura 47. Decaimento de mRNA de promastigotas de *L. (L.) amazonensis.* Número de cópias relativo obtido pela divisão de 5.1AAP3 (A), 4.7AAP3 (B) e GAPDH (C) pelo número de cópias absoluto de SSUrRNA (D). Linhas representam aproximação dos dados a um decaimento exponencial, em B e C com R²>90%; linha contínua de tratamentos com actinomicina, e linha descontínua com actinomicina + sinefungina, conforme descrito em Material e Métodos. Média de 3 pontos independentes com barra de erro padrão.

4.4 Fisiologia do transporte de arginina de *L. (L.) amazonensis*

4.4.1 Caracterização fisiológica do transportador de arginina de L. (L.)

amazonensis

Iniciamos os experimentos de incorporação de aminoácidos, conforme descrito em Material e Métodos, utilizando promastigotas em fase log intermediária (~2x10⁷ parasitas/mL) e obtivemos uma incorporação linear ao longo de 15 minutos

de transporte (Figura 48).



Figura 48. Tomada de arginina em função do tempo por promastigotas de *L. (L.) amazonensis.* Cerca de 10⁶ promastigotas em fase log intermediária de crescimento foram alimentados com 20µM de arginina tritiada (0,1µCi) e em diferentes tempos a incorporação do aminoácido foi determinada como descrito em Material e Métodos. Média de 3 pontos independentes com barra de erro padrão.

Como a incorporação nas condições utilizadas no ensaio de tomada se

mostrou linear até o tempo de 15 minutos, para a determinação do K_m do transportador fizemos ensaio de incorporação por 2 minutos em 10⁷ parasitas com diferentes concentrações de arginina tritiada. O K_m determinado foi de 30,9 ± 2,5µM (Figura 49).



Figura 49. Curva de tomada de arginina em função da concentração do aminoácido. Cerca de 10⁷ promastigotas em fase log intermediária de crescimento foram mantidos em concentrações crescentes de arginina (μM) misturada ao traçador tritiado (0,1μCi) por 2 minutos, quando a incorporação era interrompida e a tomada avaliada, como descrito em Material e Métodos. Linha vermelha representa o ajuste dos dados em hipérbole, com R² = 99% (n=3).

4.4.2 Resposta à privação de arginina

Os experimentos de privação de aminoácido foram realizados seguindo uma adaptação do protocolo de Darlyuk e col. (2009) como descrito nos Materiais e Métodos. Avaliamos a resposta dos parasitas à privação de aminoácidos determinando o número de cópias dos dois tipos de mRNA do transportador de arginina e correlacionando com a tomada de arginina em diferentes condições de privação e recuperação. Na figura 50A podemos observar que ocorre um aumento do número de cópias do mRNA 5.1AAP3 quando as células são submetidas a 4 horas de privação do aminoácido. Esse aumento não é detectado na cópia mRNA 4.7AAP3 nem nos mRNAs para arginase e meta1. A privação do aminoácido também leva a um aumento na tomada de arginina (figura 50B).



Figura 50. Avaliação da resposta de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase log intermediária à privação de arginina. A. Quantidade relativa de mRNA, obtida pela divisão da quantidade absoluta do mRNA pela quantidade absoluta de mRNA de GAPDH determinadas a partir da mesma preparação de cDNA. B. Incorporação de 20μM de arginina tritiada 0,1μCi por 10⁷ parasitas ao longo do tempo. Linhas representam regressão linear dos dados, com R² acima de 90%. Média de 3 pontos independentes com barra de erro padrão.

Para determinar se a resposta à privação tinha relação temporal com o desenvolvimento do parasita, avaliamos a tomada do aminoácido em resposta à privação em promastigotas em fase log inicial (1x10⁷ parasitas/mL) e em fase estacionária inicial (5x10⁷ parasitas/mL) da cultura. Os resultados apresentados na figura 51 indicam que em fase estacionária os parasitas respondem menos à privação, e apresentam uma tomada de aminoácido basal (tempo 0) maior que em fase logarítmica.



Figura 51. Tomada de arginina por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em duas fases de crescimento. Cerca de 10⁷ promastigotas em fase log inicial (Log) ou em fase estacionária inicial (Est) da cultura foram submetidos à privação de arginina, seguido pela determinação da tomada do aminoácido, como descrito de Material e Métodos. Média de 3 pontos independentes com barra de erro padrão.

4.4.3 Influência da interrupção da via da arginase no transporte de arginina

Como os resultados de tomada após a privação indicam que a concentração ou disponibilidade do aminoácido influencia tanto na velocidade de tomada como na quantidade de mRNA de uma das cópias do transportador, fomos verificar se a concentração interna do aminoácido também era importante. Para isso utilizamos mutantes para gene da arginase, anteriormente construído no laboratório (da Silva 2010), partindo da premissa que nesses mutantes, a concentração interna do aminoácido estaria alterada. Assim, fizemos o ensaio de tomada com 10⁷ promastigotas em fase log intermediária, comparando o transporte do parasita selvagem (Figura 52A) com dois diferentes mutantes arg⁻ (Figura 52B e C) ao longo do tempo. Como se pode observar, embora os mutantes tenham a resposta à privação de arginina semelhante aos selvagens (linhas tracejadas), o nível basal de incorporação apresenta-se mais baixo em ambos os clones comparado ao nível basal dos parasitas selvagens (linha contínua).



Figura 52. Tomada de arginina em mutantes de *L. (L.) amazonensis* nulos para arginase. Cerca de 10⁷ promastigotas em fase log intermediária de *L. (L.) amazonensis* selvagens (A) e dois mutantes nulos para arginase (B e C) foram submetidos a ensaio de tomada de arginina, após privação do aminoácido, conforme descrito em Material e Métodos. Linhas representam regressão linear dos dados, com R² acima de 90% em todos os casos. Média de 3 pontos independentes com barra de erro padrão.

Utilizamos ainda outros dois mutantes, geneticamente suplementados para recuperar a expressão de arginase, pela inserção da ORF da arginase no lócus de RNA ribossômico, mas um deles sem o sinal para endereçamento para glicossomo (arg⁻/argΔSKL) e outro com o sinal, como o que é observado na enzima nativa (arg⁻/ARG) (da Silva e col., em preparação). A resposta de tomada de aminoácido desses mutantes em relação à privação está apresentada na figura 53. Os parasitas mutantes nocauteados apresentam uma tomada de arginina menor do que os selvagens e os mutantes suplementados corretamente tendem a voltar à condição dos selvagens, o que não ocorre nos mutantes suplementados com a arginase sem a sinalização de localização glicossomal.



Figura 53. Tomada de arginina em mutantes arg-. Cerca de 10⁷ promastigotas em fase estacionária da cultura foram submetidos ao ensaio de tomada de arginina , após privação do aminoácido, conforme descrito em Material e Métodos, em *L.* (*L.*) amazonensis selvagens (WT), mutantes nulos para arginase (arg-), mutante suplementado com ORF de arginase (arg⁻/ARG) e mutante complementado com ORF arginase sem sinalização para endereçamento ao glicossomo (arg⁻/argΔSKL). Média de 3 pontos independentes com barra de erro padrão.

Foi preparado um manuscrito contendo os resultados apresentados nesse

último bloco, que se encontra submetido à publicação (Anexo III).

5 Discussão

O estudo da fisiologia da interação parasito-hospedeiro permite obtenção de dados importantes tanto para o entendimento da biologia de cada organismo envolvido na relação como também evidenciando alvos que podem ser passíveis de utilização para a interrupção e controle da infecção. Dados na literatura, que contam com a contribuição de estudos do laboratório, indicam que a enzima arginase representa papel importante na fisiologia do parasita e do macrófago, e que a atividade da enzima (ou falta dela) pode deslocar para a sobrevivência ou para a morte do parasita. Neste trabalho buscamos entender como se dá o suprimento do aminoácido arginina, envolvido nessas respostas por ser o substrato de arginase e de iNOS. Buscamos então estudar como se dá a tomada de arginina pelo promastigota e também tentamos verificar como a concentração ou disponibilidade do aminoácido pode influenciar nas respostas fisiológicas do macrófago e do parasita.

5.1 Tentativas de padronização de purificação de fagossomos e ensaios de tomada de arginina

Como na célula hospedeira do mamífero, o macrófago, o parasita se localiza em uma organela particular, iniciamos nossos estudos tentando padronizar a purificação da organela para o estudo de seu funcionamento. A obtenção da organela purificada permite tanto a realização de determinações de constituintes mais detalhadas, como a obtenção de seu proteoma (Desjardins e col. 1994; Boulais e col. 2010) ou o estudo de interação entre a célula hospedeira e o parasita, já que há evidências de alterações na estrutura e funcionamento das células hospedeiras pelos parasitas (Hsiao e col. 1991; Desjardins e Descoteaux 1997; Gruenheid e col. 1997). Nesse sentido, o estudo de fagolisossomos isolados contendo *Leishmania* pode resolver questões interessantes sobre possível modulação da resposta do hospedeiro ao parasita. Sabe-se que mecanismos do macrófago para o controle do parasita envolvem a tomada de arginina do meio extracelular, e isso é um fator limitante para o mesmo (Yeramian e col. 2006).

A aplicação de um protocolo inicialmente descrito por Chakraborty e col. (1994) permitiu o isolamento de fagossomos, por gradiente descontínuo de sacarose. Contudo, o protocolo foi descrito para isolamento de fagossomos de macrófagos peritoniais com *L. (L.) mexicana*, o que nos levou a introduzir modificações para atingir nossos objetivos. Na descrição daquele protocolo, os autores relatam que linhagens estabelecidas de macrófagos são menos infectáveis, e por essa razão preferiram utilizar células de cultura primária. Fizemos ensaios de infecção com macrófagos peritoniais e de fato encontramos uma porcentagem maior de macrófagos infectados do que quando as infecções foram feitas em macrófago da linhagem J774 (resultados não apresentados). No entanto, como nossa finalidade era estabelecer um protocolo para o isolamento dos fagossomos de forma que pudéssemos utilizá-los para ensaios de tomada de arginina, seria necessária uma quantidade muito grande de material, o que nos levou a optar pela cultura de macrófagos J774. Apesar de termos observado parâmetros da infecção mais baixos, contornamos a situação aumentando a quantidade de células na infecção.

Ainda introduzimos mais uma modificação importante que foi a utilização de parasitas expressando eGFP ou eRFP, de modo a facilitar a monitoração da infecção. Utilizamos inicialmente uma razão de 10 parasitas por macrófago, com um choque térmico a 0°C por 5min seguido de 60min a 37°C (Chakraborty e col. 1994). Nessas condições, quase não houve entrada de *L. (L.)*

amazonensis nos macrófagos J774. Começamos a testar, então, maior tempo de exposição dos parasitas às culturas, chegando a 16 horas, guando foi detectada com uma grande quantidade de parasitas por células. No entanto, os fagolisossomos formados eram muito grandes, o que dificultaria a manutenção de sua estrutura durante a lise, como já reportado anteriormente para L. (L.) pifanoi infectando macrófagos RAW 264.7 (Kima e Dunn 2005). Após testarmos diferentes relações parasita/hospedeiro, chegamos a uma relação ideal de 4 parasitas por hospedeiro, numa exposição de 16 horas. Assim, obtivemos uma quantidade grande de fagolisossomos pequenos (com um ou dois parasitas internalizados) e bem definidos. Apesar do protocolo ter permitido a formação de vacúolos bem definidos, as purificações realizadas com esse protocolo apresentaram uma grande quantidade de contaminação com promastigotas livres, o que seria um problema em ensaios de incorporação de aminoácidos. Para solucionar o problema, passamos a realizar as infecções por 4 horas com 10 parasitas/hospedeiro, com lavagens após esse tempo e manutenção da cultura por mais 14 horas em 34°C. Esse protocolo de infecção reduziu os promastigotas contaminantes.

Em sua descrição de lise, Chakraborty e col. (1994) se utilizavam de repetidas passagens das células infectadas por agulha 23G monitorada por microscopia óptica. Em nossos procedimentos, verificamos que as passagens pelas agulhas não resultaram em lise efetiva, possivelmente pelo tamanho reduzido dos macrófagos J774 quando comparados com o tamanho dos peritoniais. Optamos, então, pela lise por ruptura em homogenizador do tipo Dounce, onde eram realizados movimentos bastante delicados pela fragilidade das organelas. Essa lise foi realizada mantendo as células no gelo, e monitorada por microscopia ótica.

Embora a purificação por gradiente de sacarose seja um método satisfatório para estudos qualitativos, como uma caracterização microscópica, nem a

pureza do material, nem a quantidade obtida, foram suficientes para estudos bioquímicos e fisiológicos, como estudos de incorporação de aminoácidos. Kima e Dunn (2005), utilizando o mesmo protocolo de gradiente descontínuo de sacarose, já haviam relatado a quantidade excessiva de contaminantes e melhoraram a pureza do material aplicando um passo adicional pela ligação das organelas com anticorpos anti-calnexina e sua posterior separação magnética. No entanto, a utilização de anticorpos aderentes à membrana pode alterar sua fisiologia, mascarando transportadores de membrana, por exemplo.

Buscando uma maior sensibilidade de detecção de contaminações, avaliamos o material purificado por gradiente de sacarose em citometria de fluxo. Nessa análise, observamos uma pureza sempre em torno de 15%, mas notamos que os parasitas florescentes eram facilmente detectáveis dentro das organelas pelo citômetro e, assim, mudamos o protocolo, passando a separar as organelas por citometria de fluxo com "sorting". Para realização desses experimentos, é necessário citômetro de fluxo com "sorting" de alta capacidade. Contamos com a gentil colaboração do Dr. Luiz R. Sardinha, pós-doutorando do Departamento de Imunologia do ICB–USP que possui em suas instalações um citômetro de fluxo com "sorting" de alta eficiência FACS Vantage (BD Biosciences). Esse equipamento é capaz de fazer a seleção com um bom nível de segurança de 1000 partículas por segundo. Com isso, a partir de um material com 20% de pureza, chegaríamos a 10⁵ partículas purificadas em cerca de 1 hora de procedimento. Para experimentos de microscopia é bastante razoável, embora a velocidade ainda não seja adequada para purificação em ordem de 10⁷ partículas, estimativa da necessidade para a realização de ensaios de tomada de aminoácido. Tivemos acesso, por auxílio do Dr. L. R. Sardinha, ao equipamento FACS Aria, no Instituto Israelita Albert Einstein (IIAE), com capacidade 10 vezes maior de separação de organelas. Isso viabilizaria

85

experimentos de maior escala. A realização da colaboração no IIAE ocorreu em meados do primeiro semestre de 2010, e durante todo o decorrer houve muita disposição dos envolvidos com a colaboração, embora tenha havido dificuldades na sincronização de agendas entre nosso laboratório, do colaborador e do equipamento, o que restringiu o número de ensaios que pudemos realizar.

No entanto, no protocolo padronizado foi possível mostrar a integridade da membrana das organelas, determinada indiretamente pelo tratamento com Neutral Red, um corante marcador de organelas ácidas (Goren e col. 1976; Allen e Fok 1983; Clarke e Maddera 2006). A proposição era que, se o fagossomo estivesse corado, seria um indicativo de sua integridade, pois haveria mantido o ambiente ácido encontrado em seu interior. Embora tenhamos encontrado organelas que não apresentassem coloração, a grande maioria mostrou-se positiva para a técnica, com marcações em torno de 90% em diferentes campos, indicando que o protocolo de isolamento era adeguado. No entanto, com o intuito de reduzir ainda mais a contaminação por estruturas que poderiam influenciar nos ensaios de tomada de aminoácido, desenvolvemos uma linhagem de macrófago derivada de J774, expressando Lamp1, uma proteína do macrófago bastante abundante em fagolisossomos de Leishmania (Kima e Dunn 2005), fundida com eGFP. A utilização desse macrófago nos ensaios de infecção poderia nos dar um parâmetro extra na seleção citométrica, uma vez que poderíamos fazer os "gates" para a seleção com duas fluorescências presentes, a vermelha dos parasitas e a verde de eGFP-Lamp1. No entanto, apesar de conseguirmos a detecção de ambas fluorescências em microscopia confocal, no citômetro de fluxo não foi possível detectar a fluorescência de eGFP-Lamp (Figuras 20 e 21). A quantidade de GFP na membrana pode ser pequena para a detecção da fluorescência pelo citômetro de fluxo, uma vez que a passagem das partículas pelo laser e sua detecção é feita em frações de centésimos

de segundo.

Para finalizar a caracterização da purificação, tentamos por várias vezes preparar o material para microscopia eletrônica. Inicialmente buscamos a metodologia e tentamos, sem sucesso, preparar a inclusão do material em bloco em resina para ultramicrotomia. Tivemos dificuldade em manter o material durante as sucessivas lavagens para desidratação das partículas. Buscamos auxílio da Dra. Edna Haapalainen e Dra. Rita Sinigaglia-Coimbra, do Centro de Microscopia Eletrônica da EPM/UNIFESP, para a inclusão do material. Inicialmente não foi possível a preparação devido à quantidade reduzida de material, e fizemos, então, o "sorting" de 10⁷ partículas para a posterior fixação e inclusão do mesmo, o que levou mais de 10h de trabalho no equipamento. Essa caracterização é indispensável para nossos experimentos, pois representa uma validação morfológica da integridade da membrana externa das organelas e, embora tenhamos conseguido a inclusão do material, não foi possível chegar a resultados conclusivos, necessitando maior padronização do experimento nas próximas repetições.

Sem a certeza da integridade da organela, e com o tempo exíguo, acabamos por não realizar ensaio de transporte da organela. Mas padronizamos os ensaios de transporte de arginina em promastigotas, determinando um de $30,9 \pm 2,5\mu$ M, um valor de ordem de grandeza próximo ao determinado para *L. (L.) donovani* (14µM). (Shaked-Mishan e col. 2006).

5.2 Caracterização do gene que codifica o transportador de arginina

Para a caracterização do gene que codifica um possível transportador de arginina, desenhamos iniciadores para PCR baseados na sequência descrita para o

transportador de arginina de L. (L.) donovani para amplificar o gene de L. (L.) amazonensis a partir de seu DNA genômico (Shaked-Mishan e col. 2006). Mesmo reduzindo a temperatura de associação dos "primers" na reação até 40°C, não conseguimos amplificar nenhum fragmento de DNA. Posteriormente, após a análise da seguência, percebemos que, embora haja grande conservação da proteína entre as duas espécies, justamente o início da sequência apresenta 4 diferenças que se encontram nas 10 últimas bases no iniciador desenhado (Figura 28). A estratégia de varredura de uma biblioteca de cosmídeo, utilizando como sonda o fragmento de PCR de L. (L.) donovani, permitiu selecionar um cosmídeo contendo regiões complementares à sonda. Subclonagens do DNA desse cosmídeo permitiram isolar um pedaço do gene, ainda complementar à sonda, e assim iniciar a determinação da sua sequência de bases e determinar a ORF completa que codifica um possível transportador de arginina de L. (L.) amazonensis. Posteriormente, a utilização de estratégias conjuntas, como "walking" no DNA do cosmídeo e obtenção de fragmentos contendo as regiões 5' e 3' UTR por RT-PCR de RNA total de promastigotas, nos levou à determinação da sequência completa do "contig" do cosmídeo (Anexo II). Dificuldades em determinar as seguências 5' e 3' UTR no DNA do cosmídeo culminaram com a identificação de duas cópias do gene, dispostas em tandem, apresentando assim uma organização cromossômica distinta à encontrada em L. (L.) infantum, que também apresenta duas cópias no mesmo cromossomo (LinJ31.0900 e LiJ31.1250 no GenBank) porém com uma sequência de 160.000 pares de base entre elas, na qual estão codificados 35 genes. Por outro lado, o mesmo banco de dados indica que L. (L.) donovani apresenta o registro de somente uma sequência codificando o transportador de arginina.

O alinhamento das sequências do cosmídeo com as sequências das regiões 5' e 3' UTR obtidas por RT-PCR permitiram o mapeamento das regiões

gênicas responsáveis pela sinalização de "*trans*-splicing", que segue a organização canônica que consiste em um AG que se segue a uma carreira de pirimidinas, e a sinalização para poliadenilação, que não apresenta consenso como em todos os tripanosomatídeos.

5.3 Regulação do transporte e da expressão do gene que codifica o transportador de arginina

Como as duas cópias do gene são transcritas e a ORF de cada transcrito é muito semelhante (98% de identidade de bases), indagamos se a presença da duplicação pode trazer vantagens adaptativas ao parasita, uma vez que as mesmas passam por pressão seletiva para manter a proteína funcional. A determinação da sequência de nucleotídeos das regiões 5'UTR de transcritos das duas cópias do gene foi obtida por RT-PCR. As diferenças encontradas nos permitiram explorar e quantificar mRNA transcrito de cada cópia por RT-PCR quantitativo em tempo real.

As determinações foram feitas por quantificação absoluta, por meio de curva padrão. Para efeito de comparação em diferentes condições fisiológicas, os números absolutos foram normalizados pelos números absolutos de transcritos de genes cuja expressão não varia ao longo do desenvolvimento. Determinações com essa metodologia são menos sujeitas a variações decorrentes de diferenças nas taxas de amplificação de diferentes genes (Bustin 2002), e é possível detectar qualquer anomalia no equipamento ou reagentes independentemente da quantidade de produto nos tratamentos, observando o padrão de amplificação da curva, e verificando seus valores de R² e inclinação da reta. Além disso, a curva padrão ainda permite estabelecer em que faixa de amplificação de sensibilidade a quantificação é mais adequada para cada produto, diminuindo ainda mais os erros decorrentes da

técnica, dependendo da abundância desses produtos.

Um cuidado de tivemos na aplicação do qRT-PCR, foi o tratamento com DNase seguido de uma nova extração com Trizol da preparação de RNA, de maneira a nos assegurarmos que não havia contaminação com DNA nas amostras que foram à transcrição reversa, e que não houvesse DNA genômico nas reações de RT-PCR. Esse cuidado é importante em nosso modelo de estudo porque não há introns nos seus genes, e qualquer contaminação com DNA genômico poderia interferir na quantificação do mRNA obtida.

De maneira interessante, a avaliação da expressão dos transcritos de cada cópia indicou que o transcrito 5.1AAP3 se apresenta 30 vezes mais abundante do que o transcrito 4.7AAP3. Observamos que essa expressão diferencial ocorria ao longo da curva de crescimento (Figura 45), o que nos levou a propor experimentos para identificar em que situações ocorria uma resposta levando ao controle da expressão de cada uma das cópias do gene. Em eucariotos, a expressão gênica pode ser controlada pela regulação na atividade de regiões promotoras da RNA polimerase II. Essas regiões podem apresentar proteínas ligadas a elas que aumentam ou diminuem a transcrição de determinado gene, em diferentes fases da vida do organismo ou em resposta a diferentes estímulos do meio, com o consequente aumento ou diminuição da proteína codificada pele gene em questão atendendo a diferentes necessidades fisiológicas do organismo (Martins e Maciel Filho 2010). No entanto, Leishmania, como outros tripanosomatídeos, apresentam transcrição policistrônica (Button e col. 1989) e os promotores de RNA polII descritos até o presente não apresentam sequências canônicas e não há indicativo da presença de sítios de ligação de fatores regulatórios de transcrição (Martínez-Calvillo e col. 2004; Monnerat e col. 2004). Assim, os parasitas devem desenvolver outras estratégias para o controle da expressão gênica pós-transcricional, como o

controle do "*trans*-splicing"/poliadenilação ou pela composição de sequências UTR na molécula de mRNA conferindo estabilidade diferencial de acordo com condições fisiológicas (Flinn e Smith 1992). Considerando, então, a diferença de quantidade dos transcritos de cada uma das duas cópias do gene que codifica o transportador, avaliamos sua meia-vida, e verificamos que o transcrito 5.1AAP3 é mais estável do que o transcrito 4.7AAP3. Essa diferença na meia-vida é um forte indicativo da razão de um dos transcritos ser mais abundante do que o outro. (Figura 47). Há relatos na literatura sobre a estabilidade do mRNA poder ser regulada por aminoácidos, o que poderia explicar as diferenças de quantidade do transportador e ainda dar uma função à presença das duas cópias, mas os mecanismos de controle da estabilidade ainda não foram completamente esclarecidos (Gong e col. 1991; Bruhat e col. 1997; Jousse e col. 2004).

A abundância dos transcritos, que é uma decorrência da estabilidade do mRNA, pode ser um fator importante no controle na expressão genética em *Leishmania* (Clayton e Shapira 2007). Neste trabalho mostramos que os transcritos de uma das cópias do gene do transportador de arginina apresenta decaimento de mRNA num padrão comparável a um gene "house-keeping" como GAPDH. O transcrito mais expresso, no entanto, não decai mesmo após 180 minutos de tratamento com actinomicina e sinefungina, inibidores, respectivamente, de transcrição e de "*trans*-splicing" (McNally e Agabian 1992; Archer e col. 2008). Esse fato explica a diferença encontrada entre as quantidades de mRNA das duas cópias. No entanto, observamos que há alteração entre a razão das cópias ao longo da curva de crescimento (Figura 45), e também que somente um dos transcritos tem um aumento da abundância em resposta à privação dos aminoácidos, mas quando os parasitas são tratados por 4 horas na presença do aminoácido, o valor de transporte

91

chega muito abaixo ao valor dos parasitas não tratados, inclusive com valores próximos aos dos parasitas em fase log (Figura 51). Especulamos que a presença de arginina deve, de alguma forma, sinalizar a degradação do mRNA que codifica o seu próprio transportador. Sugerimos que experimentos que avaliem a estabilidade dessas cópias de mRNA durante a privação à arginina, bem como a adição de arginina durante o tratamento com sinefungina e actinomicina, possam esclarecer a diferença de resposta desses mRNA.

Corrobora com nossa hipótese o resultado que obtivemos quando submetemos mutantes nulos de arginase à privação de arginina (Figuras 52 e 53). Supomos que nesses mutantes ocorra um aumento da concentração interna de arginina, e observamos que os mesmos respondem à privação mesmo em fase estacionária, mas sempre com uma taxa basal de transporte inferior à encontrada nos parasitas selvagens (Figura 53). Quando esses mutantes foram geneticamente suplementados com uma cópia funcional do gene de arginase (arg⁻/ARG), eles tendem a recuperar o comportamento observado no parasita selvagem. Mas, quando a complementação genética se dá com uma sequência que contém a ORF da arginase sem o sinal de endereçamento da enzima para o glicossomo (arg/arg∆SKL) e, portanto, a atividade da enzima não é recuperada, o comportamento desse mutante equivale ao observado para o mutante nulo. Os mutantes arg⁻/ARG podem não recuperar completamente o comportamento dos parasitas selvagens porque apresentam somente cerca de 15% da atividade de arginase dos parasitas selvagens (da Silva e col. em preparação). Assim, podemos especular que a disponibilidade de arginina interna nos parasitas deve controlar a expressão dos transportadores do aminoácido e a consequente taxa de transporte de arginina.

Leishmania nocaute nulo para arginase apresentam prejuízo na sua

infectividade *in vivo*, com o desenvolvimento da lesão ocorrendo mais lentamente do que nos parasitas selvagens (Muleme e col. 2009; Reguera e col. 2009; da Silva em preparação). Além do próprio prejuízo causado aos parasitas pela deleção da enzima, pode-se levantar a hipótese de que a alteração no transporte de arginina desses parasitas tenha participação em sua deficiência na infecção. Lembrando que a quantidade de arginina interna dos macrófagos não é suficiente para respostas do tipo Th1 ou Th2 (Yeramian e col. 2006), essa hipótese ganha destaque, já que uma diminuição na tomada de arginina pelo parasita levaria a uma maior disponibilidade do aminoácido ao hospedeiro. Outro fato que corrobora com a hipótese levantada é o fato de que os parasitas em fase estacionária, a fase mais infectiva (Sacks e Perkins 1984), apresentam a expressão do transportador muito acentuada, nem mesmo respondendo à privação, sugerindo há um máximo de expressão do transportador nessa fase. Essa observação não se aplica aos mutantes nulos para arginase.

Ainda não está bem claro como a sinalização para a metaciclogênese ocorre; existe evidência da participação de metabólicos de pteridina (Cunningham e col. 2001), mas parece haver influência da disponibilidade de nutrientes para a sua ocorrência (Sacks e Perkins 1984). Como a quantidade do transportador de arginina aumenta durante o seu desenvolvimento, pode-se sugerir que esse comportamento seja parte da metaciclogênese. Avaliamos a quantidade de meta-1, um marcador de metaciclogênese (Nourbakhsh e col. 1996), nos experimentos de privação ao aminoácido (Figura 50). No entanto, não encontramos diferença entre sua expressão. Isso pode significar que não é só a diminuição de nutrientes o responsável para a metaciclogênese, mas também não podemos descartar a hipótese de que o tempo utilizado nos experimentos não tenha sido suficiente para a metaciclogênese completa. Dessa forma, temos agora instrumentos para avaliar como estímulos do meio podem alterar a estabilidade desses RNAs. Podemos realizar experimentos que forneçam respostas indicando regiões gênicas responsivas aos estímulos que levem ao controle de expressão. Esses estudos podem também indicar situações fisiológicas nas quais ocorra a expressão de uma das cópias do gene do transportador, uma vez que esses parasitas são organismos digenéticos e devem se adaptar a condições diferentes de pH e temperatura (Zilberstein e Shapira 1994), e certamente diferente disponibilidade de nutrientes, na passagem de um hospedeiro para o outro.

Ainda, considerando que a duplicação do gene que codifica o transportador de arginina deva ser funcional, é ressaltada a importância do transporte de arginina no processo evolutivo do parasita. Pode ser um fator crucial para a sobrevivência do parasita em ambos os hospedeiros. Macrófagos podem controlar a infecção por mecanismos de produção de óxido nítrico dependente de arginina. Como o transporte de arginina pelos macrófagos é necessário para a produção de iNOS (Liew e col. 1990), o parasita poderia contornar essa resposta dos macrófagos seguestrando o aminoácido para si.

Nossos resultados mostram que os parasitas são sensíveis à privação do aminoácido, respondendo com um aumento do mRNA que codifica o transportador, que correlaciona com um aumento de tomada do aminoácido em condições de privação (Figura 50). De maneira interessante, os parasitas diminuem a resposta à privação quando estão em fase estacionária (Figura 51). Pode se dizer que essa fase da cultura corresponde ao que ocorre no tubo digestório do inseto quando, como consequência da digestão, os nutrientes diminuem (Sacks e Perkins 1984). Sabe-se que a privação de nutrientes é um sinal que leva à metaciclogênese, diferenciação que leva às formas infectivas para o mamífero. Como nessa mesma fase estacionária ocorre a diminuição de arginina disponível para o promastigota, o mecanismo que descrevemos neste estudo (e que se encontra em forma de manuscrito no Anexo III) poderia constituir em uma preparação do parasita, aumentando a expressão do transportador de arginina, para uma condição de entrada no hospedeiro vertebrado, situação em que o sequestro da arginina, ocorrendo rapidamente, contornaria a explosão respiratória do macrófago e garantiria sua sobrevivência. As informações descritas neste trabalho são importantes tanto para se entender aspectos cruciais da fisiologia da relação parasito-hospedeiro, como para evidenciar possíveis alvos em que a infecção pode ser controlada.

6 Conclusões

- Macrófagos J774, apesar de apresentarem menor taxa de infecção, podem ser utilizados para experimentos que exijam a utilização de grande número de células;
- Na infecção de macrófagos J774 com *L. (L.) amazonensis, u*ma relação de 4 parasitas por hospedeiro é ideal para a obtenção de fagolisossomos menores;
- A infecção por 4 horas, seguida de 10 lavagens, e o prosseguimento da incubação por mais 14 horas leva à diminuição contaminação da preparação de fagolisossomos por promastigotas livres após a lise dos macrófagos;
- O Isolamento de organelas pelo gradiente de sacarose não se mostrou uma boa técnica, com pureza abaixo do necessário para avaliações bioquímicas e fisiológicas;
- Citometria com fluxo pode ser usada com sucesso para a obtenção de organelas purificadas;
- A utilização de marcação fluorescente na membrana dos fagolisossomos permite a observação nas mesmas em microscopia fluorescente e confocal, embora não seja o suficiente para detecção em citômetro de fluxo;
- L. (L.) amazonensis apresenta 2 cópias do gene que codifica o transportador de arginina, com ORFs apresentando identidade de 98%;
- Essas cópias do gene do transportador estão em tandem, separadas por uma região intergênica de 3200 pares de base.
- As duas cópias apresentam regiões 5'UTR e 3'UTR diferentes, que permitem a avaliação diferencial da expressão dos do gene por PCR quantitativo;

- As diferentes cópias apresentam um nível de expressão em até duas ordens de grandeza de diferença na fase promastigota;
- O nível de expressão das cópias se altera ao longo do desenvolvimento dos parasitas em cultura;
- O nível de mRNA da cópia mais abundante se relaciona diretamente com a quantidade de arginina tomada pelos parasitas;
- A privação de arginina leva a um aumento na quantidade de mRNA da cópia mais abundante do transportador, enquanto a outra não se altera;
- A meia vida da cópia mais abundante não pode ser determinada até 180 minutos de parada de transcrição/"trans-splicing";
- Parasitas em fase estacionária respondem menos à privação de arginina, quando comparados com parasitas em fase logarítmica;
- Parasitas nocautes nulos de arginase apresentam nível basal de transporte de arginina inferior aos parasitas selvagens;
- Parasitas nocautes nulo de arginase continuam respondendo à privação de arginina mesmo em fase estacionária;
- A suplementação genética da ORF que codifica arginase nos mutantes nulos de arginase leva à uma recuperação parcial na resposta à privação de arginina, semelhante ao que se observa no parasita selvagem;
- L-arginina apresenta um papel fisiológico fundamental tanto no crescimento do parasita como na regulação da expressão de seu próprio transportador.

7 Resumo

Protozoários do gênero Leishmania são parasitas digenéticos, com uma fase no tubo digestório de um hospedeiro invertebrado (promastigota), e uma fase parasita intracelular de macrófagos (amastigotas). Estudar a demanda de L-arginina no parasita é interessante, uma vez que o aminoácido é indispensável para a sobrevida do parasita e, ao mesmo tempo, serve de substrato para a produção de óxido nítrico, principal composto microbicida dos macrófagos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o transporte de arginina em Leishmania (Leishmania) amazonensis do ponto de vista fisiológico e caracterizar o gene que codifica o transportador do aminoácido, bem como a regulação da sua expressão em resposta a diferentes condições biológicas. Para medir o influxo de L-arginina em fagolisossomos, utilizamos macrófagos J774 infectados com L. (L.) amazonensis e desenvolvemos uma metodologia com citometria de fluxo com "sorting" para a purificação da organela. Validamos microscopicamente a presença do parasita na organela por sua fluorescência, e avaliamos a integridade da membrana externa dessa com marcador de pH ácido. Paralelamente, o gene que codifica o transportador de arginina do parasita foi caracterizado. Foram encontradas duas cópias em tandem que produzem dois transcritos (5.1AAP3 e 4.7AAP3), cujas regiões 5'UTR e 3'UTR são diferentes. Por meio de PCR quantitativo em tempo real, avaliamos a expressão desses transcritos e verificamos que 5.1AAP3 é mais expressa ao longo do desenvolvimento do parasita, com um máximo em fase estacionária. A determinação da meia-vida dos mRNA das duas cópias indicou uma duração de 32,6±5,0min para o mRNA de 4.7AAP3, enquanto que o de 5.1AAP3 não apresentou decaimento até 180min do estudo, evidenciando que a estabilidade maior pode ser a razão de sua maior abundância. A submissão de parasitas à privação de arginina levou a aumento na tomada do aminoácido concomitante ao aumento do transcrito 5.1AAP3. Mutantes nulos de arginase submetidos à privação de arginina respondem com uma taxa de incorporação mais baixa em relação aos parasitas selvagens, e mantém a resposta à privação mesmo com os parasitas em fase estacionária, diferente do observado nos parasitas selvagens. Esse conjunto de resultados nos levou a sugerir que a expressão do transportador pode ser regulada pela estabilidade do mRNA, e que o "pool" de arginina interno ao parasita pode controlar, num mecanismo de retroalimentação negativo, a expressão de seu transportador.
8 Abstract

Protozoan of genus Leishmania are digenetic parasites that present a stage in the life in insect gut (promastigotes) and an intracellular phase (amastigotes) inside vertebrate host macrophages. The study of L-arginine influx consists in an interesting matter, since the amino acid is used on NO production pathway (the main macrophage microbial pathway) but are also important for parasites survival. The aim of this work was to perform a genetic and physiological characterization of the arginine transport in Leishmania (Leishmania) amazonensis. To verify how does the arginine uptake occurs in the phagolisosomes, we used J774 macrophages infected with L. (L.) amazonensis to establish a flow cytometry sorting protocol to purify the organelle. Microscopic validation of organelle integrity was achieved by acidic pH marker treatment and detection of fluorescent parasites. The arginine transporter coding gene was characterized. We found two copies in tandem that produces two transcripts, named 5.1AAP3 and 4.7AAP3, with distinct 5'UTR and 3'UTR. By quantitative real time PCR we found that 5.1AAP3 mRNA expression varies along parasite development. This copy was, also, more abundant than 4.7AAP3 mRNA. This last mRNA showed a half-life of 32.6±5.0 min, while the 5.1AAP3 mRNA did not decay until 180 min. As response to arginine starvation, wild type parasites increase the uptake of arginine, as well as the abundance of 5.1AAP3 mRNA. Arginase null parasites starvation responses showed lower arginine uptake rates compared to wild type responses. Unlike wild type, the null mutants also respond to starvation in stationary phase. This data set allow us to propose that arginine internal pool can downregulate its transporter expression in a feed-back mechanism.

9 Referências Bibliográficas

- Akopyants, N. S., Kimblin, N. e col. (2009). "Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector" <u>Science</u> **324**(5924): 265-268.
- Allen, R. D. e A. K. Fok (1983). "Nonlysosomal vesicles (acidosomes) are involved in phagosome acidification in *Paramecium*" <u>J Cell Biol</u> **97**(2): 566-570.
- Altschul, S. F., Gish, W. e col. (1990). "Basic local alignment search tool" <u>J Mol Biol</u> **215**(3): 403-410.
- Alvar, J., Yactayo, S. e col. (2006). "Leishmaniasis and poverty" <u>Trends Parasitol</u> **22**(12): 552-557.
- Archer, S., Queiroz, R. e col. (2008). "Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways" <u>Methods Enzymol</u> **448**(1): 359-377.
- Assreuy, J., Cunha, F. Q. e col. (1994). "Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*" <u>Eur J Immunol</u> **24**(3): 672-676.
- Balanco, J. M. F., Moreira, M. E. e col. (2001). "Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity" <u>Curr Biol</u> **11**(23): 1870-1873.
- Baldwin, E. (1935). "Problems of nitrogen catabolism in invertebrates. III. Arginase in the invertebrates, with a new method for its determination." <u>Biochem J</u> 29(1): 252-262.
- Boothroyd, J. C. e G. A. Cross (1982). "Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end" <u>Gene</u> **20**(2): 281-289.

Boucher, J. L., Moali, C. e col. (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.

- Boulais, J., Trost, M. e col. (2010). "Molecular characterization of the evolution of phagosomes" Mol Syst Biol **6**(1): 423.
- Bruhat, A., Jousse, C. e col. (1997). "Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels" <u>J Biol Chem</u> **272**(28): 17588-17593.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems" <u>J Mol Endocrinol</u> **29**(1): 23-39.
- Button, L. L., Russell, D. G. e col. (1989). "Genes encoding the *major* surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed" <u>Mol Biochem Parasitol</u> **32**(2-3): 271-283.
- Calegari-Silva, T. C., Pereira, R. M. S. e col. (2009). "NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection" <u>Immunol Lett</u> **127**(1): 19-26.
- Camargo, E. P., Sbravate, C. e col. (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.
- Camargo, E. P. (1999). "*Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit" <u>Adv Parasitol</u> **42**(1): 29-112.
- Chakraborty, P., Sturgill-Koszycki, S. e col. (1994). "Isolation and characterization of pathogen-containing phagosomes" <u>Methods Cell Biol</u> **45**(1): 261-276.
- Charlab, R., Valenzuela, J. G. e col. (1999). "Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*" <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(26): 15155-15160.

Clarke, M. e L. Maddera (2006). "Phagocyte meets prey: uptake, internalization, and

killing of bacteria by *Dictyostelium amoebae*" <u>Eur J Cell Biol</u> **85**(9-10): 1001-1010.

- Clayton, C. e M. Shapira (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias" <u>Mol Biochem Parasitol</u> **156**(2): 93-101.
- Closs, E. I., Boissel, J. e col. (2006). "Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs)" J Membr Biol **213**(2): 67-77.
- Cruz, A., Coburn, C. M. e col. (1991). "Double targeted gene replacement for creating null mutants" Proc Natl Acad Sci U S A 88(16): 7170-7174.
- Cunningham, M. L., Titus, R. G. e col. (2001). "Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin" <u>Science</u> **292**(5515): 285-287.
- da Silva, E. R., Castilho, T. M. e col. (2002). "Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction" Int J Parasitol **32**(6): 727-737.
- da Silva, E. R., da Silva, M. F. L. 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, M. F. L. "Relação entre a localização celular da enzima arginase de Leishmania (Leishmania) amazonensis e seu papel na infecção de macrófagos murinos". Tese (Doutorado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2010.
- Darlyuk, I., Goldman, A. e col. (2009). "Arginine homeostasis and transport in the human pathogen *Leishmania donovani*" J Biol Chem **284**(30): 19800-19807.
- Das, P., Lahiri, A. e col. (2010). "Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator" <u>PLoS Pathog</u> 6(6): e1000899.

- de Andrade Stempliuk, V. e L. M. Floeter-Winter (2002). "Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in *Leishmania*" Int J Parasitol **32**(4): 437-447.
- De Lange, T., Berkvens, T. M. e col. (1984a). "Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species" <u>Nucleic Acids Res</u> 12(11): 4431-4443.
- De Lange, T., Michels, P. A. e col. (1984b). "Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence" <u>Nucleic Acids Res</u> **12**(9): 3777-3790.
- Desjardins, M., Celis, J. E. e col. (1994). "Molecular characterization of phagosomes" J Biol Chem **269**(51): 32194-32200.
- Desjardins, M. e A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan" J Exp Med **185**(12): 2061-2068.
- Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control" <u>Clin Dermatol</u> **14**(5): 417-423.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives" <u>Comp</u> <u>Immunol Microbiol Infect Dis</u> **27**(5): 305-318.
- Flinn, H. M. e D. F. Smith (1992). "Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from *Leishmania major*" <u>Nucleic Acids Res</u> 20(4): 755-762.
- Gaur, U., Roberts, S. C. e col. (2007). "An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis" <u>J Immunol</u> **179**(12): 8446-8453.
- Genestra, M., Cysne-Finkelstein, L. e col. (2003). "Effect of L-arginine analogs and a calcium chelator on nitric oxide (NO) production by *Leishmania* sp" <u>J Enzyme</u> <u>Inhib Med Chem</u> **18**(5): 445-452.
- Genestra, M., Souza, W. J. e col. (2006). "Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms"

Arch Microbiol 185(5): 348-354.

- Geraldo, M. V., Silber, A. M. e col. (2005). "Characterisation of a developmentally regulated amino acid transporter gene from *Leishmania amazonensis*" <u>FEMS</u> <u>Microbiol Lett</u> **242**(2): 275-280.
- Gong, S. S., Guerrini, L. e col. (1991). "Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation" <u>Mol Cell Biol</u> **11**(12): 6059-6066.
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P. e col. (1976). "Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*" <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 73(7): 2510-2514.
- Gruenheid, S., Pinner, E. e col. (1997). "Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome" J Exp Med **185**(4): 717-730.
- Haile, S. e B. Papadopoulou (2007). "Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa" Curr Opin Microbiol **10**(6): 569-577.
- Hall, T. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT" <u>Nucl. Acids. Symp. Ser</u> **41**(1): 95-98.
- Hammermann, R., Dreissig, M. D. e col. (2000). "Nuclear factor-kappaB mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and Up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages" <u>Mol</u> <u>Pharmacol</u> **58**(6): 1294-1302.
- Hanahan, D., Jessee, J. e col. Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning*. Glover, DM. and Hames, BD. (1995). 1-36.
- Hatzoglou, M., Fernandez, J. e col. (2004). "Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter" <u>Annu Rev Nutr</u> **24**(1): 377-399.
- Hibbs, J. B. J., Vavrin, Z. e col. (1987). "L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition

in target cells" <u>J Immunol</u> **138**(2): 550-565.

- Hsiao, L. L., Howard, R. J. e col. (1991). "Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*" <u>Biochem J</u> 274 (1)(1): 121-132.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C. e col. (2001). "The inhibition of arginase by N(omega)hydroxy-l-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages" <u>J Exp</u> <u>Med</u> **193**(6): 777-784.
- Iyengar, R., Stuehr, D. J. e col. (1987). "Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst" <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>SA</u> 84(18): 6369-6373.
- Jousse, C., Averous, J. e col. (2004). "Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms" <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **313**(2): 447-452.
- Kandpal, M., Fouce, R. B. e col. (1995). "Kinetics and molecular characteristics of arginine transport by *Leishmania donovani* promastigotes" <u>Mol Biochem Parasitol</u> **71**(2): 193-201.
- Kapler, G. M., Coburn, C. M. e col. (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.
- Kima, P. E. e W. Dunn (2005). "Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate *Leishmania* parasitophorous vacuoles" <u>Microb Pathog</u> **38**(4): 139-145.
- Kooter, J. M., De Lange, T. e col. (1984). "Discontinuous synthesis of mRNA in trypanosomes" <u>EMBO J</u> **3**(10): 2387-2392.
- Kropf, P., Fuentes, J. M. e col. (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo" <u>FASEB J</u> **19**(8): 1000-1002.

Lainson, R. e J. J. Shaw (1987). Evolution, classification and geographical

distribution. *in* Peters, W. e Killick-Kendrick, R. (eds.) <u>The Leishmaniase in</u> <u>biology and medicine</u>, 1-120.

- Landfear, S. M., McMahon-Pratt, D. e col. (1983). "Tandem arrangement of tubulin genes in the protozoan parasite *Leishmania enriettii*" <u>Mol Cell Biol</u> **3**(6): 1070-1076.
- Liew, F. Y., Millott, S. e col. (1990). "Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine" J Immunol **144**(12): 4794-4797.
- Liew, F. Y., Xu, D. e col. (1999). "Immune effector mechanism in parasitic infections" <u>Immunol Lett</u> **65**(1-2): 101-104.
- Marletta, M. A., Yoon, P. S. e col. (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate" <u>Biochemistry</u> **27**(24): 8706-8711.
- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D. e col. (2004). "Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3" <u>Eukaryot Cell</u> **3**(2): 506-517.
- Martinez, F. O., Helming, L. e col. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective" <u>Annu Rev Immunol</u> **27**(1): 451-483.
- Martins, E. A. C. e P. R. Maciel Filho (2010). "Mecanismos de expressão gênica em eucariotos" <u>Revista da Biologia</u> **4**(1): 1-5.
- Mayer, M. G. e L. M. Floeter-Winter (2005). "Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity" <u>Mem Inst Oswaldo</u> <u>Cruz</u> **100**(5): 501-513.
- McConville, M. J., de Souza, D. e col. (2007). "Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes" <u>Trends Parasitol</u> **23**(8): 368-375.
- McNally, K. P. e N. Agabian (1992). "*Trypanosoma brucei* spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo" <u>Mol Cell Biol</u> **12**(11): 4844-4851.

Menezes, M. J., Costa, D. J. e col. (2008). "Immunomodulation of human monocytes

following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva" <u>BMC Immunol</u> **9**(1): 12.

- Monnerat, S., Martinez-Calvillo, S. e col. (2004). "Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*" <u>Mol Biochem Parasitol</u> **134**(2): 233-243.
- Muleme, H. M., Reguera, R. M. e col. (2009). "Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokineindependent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis" <u>J Immunol</u> **183**(12): 8068-8076.
- Murray, H. W. (1982). "Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis II Oxygen- dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes" Journal of Immunology **129**(1): 351-357.
- Murray, H. W. e D. M. Cartelli (1983). "Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity" <u>J Clin Invest</u> **72**(1): 32-44.
- Murray, H. W., Szuro-Sudol, A. e col. (1989). "Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages" Infect Immun **57**(3): 845-849.
- Murray, H. W. e C. F. Nathan (1999). "Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*" J Exp Med **189**(4): 741-746.
- Myler, P. J., Audleman, L. e col. (1999). "Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes" Proc Natl Acad Sci U S A.
 96(6): 2902-2906.
- Naderer, T. e M. J. McConville (2008). "The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective" <u>Cell Microbiol</u> **10**(2): 301-308.

Niedbala, W., Wei, X. Q. e col. (1999). "Effects of nitric oxide on the induction and

differentiation of Th1 cells" <u>Eur J Immunol</u> **29**(8): 2498-2505.

- Nourbakhsh, F., Uliana, S. R. e col. (1996). "Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*" <u>Mol Biochem Parasitol</u> **76**(1-2): 201-213.
- Peters, N. C., Egen, J. G. e col. (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies" <u>Science</u> **321**(5891): 970-974.
- Qi, H., Ji, J. e col. (2004). "Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis" <u>Infect Immun</u> **72**(2): 988-995.
- Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R. e col. (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.
- Rey, L. (2002). <u>Bases da Parasitologia Médica</u>. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Rogers, M., Kropf, P. e col. (2009). "Proteophosophoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival" <u>PLoS Pathog</u> **5**(8): e1000555.
- Ross, R. (1903). "Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan" Br Med J 2(2237): 1261-1262.
- Ryan, K. A., Dasgupta, S. e col. (1993). "Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*" <u>Gene</u> **131**(1): 145-150.
- Sacks, D. L. e P. V. Perkins (1984). "Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes" <u>Science</u> **223**(4643): 1417-1419.
- Sacks, D. e C. Anderson (2004). "Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice" <u>Immunol Rev</u> 201(1): 225-238.

- Saiki, R. K., Bugawan, T. L. e col. (1986). "Analysis of enzymatically amplified betaglobin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes" <u>Nature</u> **324**(6093): 163-166.
- Sambrook, J. e D. W. Russell (2001). <u>Molecular cloning: a laboratory manual</u>. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. e col. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Shaked-Mishan, P., Suter-Grotemeyer, M. e col. (2006). "A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*" <u>Mol</u> <u>Microbiol</u> **60**(1): 30-38.
- Shaw, J. J. (1994). "Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications" <u>Mem Inst Oswaldo Cruz</u> **89**(3): 471-478.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. e col. (1990). "A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas,* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences" <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(7): 2414-2418.
- Titus, R. G. e J. M. Ribeiro (1988). "Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity" <u>Science</u> **239**(4845): 1306-1308.
- Tschudi, C. e E. Ullu (1988). "Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes" <u>EMBO J</u> **7**(2): 455-463.
- Tuon, F. F., Amato, V. S. e col. (2008). "Toll-like receptors and leishmaniasis" Infect Immun **76**(3): 866-872.
- Uliana, S. R., Affonso, M. H. e col. (1991). "Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence" <u>Exp Parasitol</u> 72(2): 157-163.

- van den Hoff, M. J., Christoffels, V. M. e col. (1995). "Electrotransfection with "intracellular" buffer" Methods Mol Biol **48**(1): 185-197.
- van Zandbergen, G., Klinger, M. e col. (2004). "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages" <u>J Immunol</u> **173**(11): 6521-6525.
- van Zandbergen, G., Bollinger, A. e col. (2006). "*Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum" <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(37): 13837-13842.
- Visigalli, R., Bussolati, O. e col. (2004). "The stimulation of arginine transport by TNFalpha in human endothelial cells depends on NF-kappaB activation" <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> **1664**(1): 45-52.
- Wanasen, N., MacLeod, C. L. e col. (2007). "L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages" <u>Infect Immun</u> **75**(6): 2802-2810.
- Wanasen, N. e L. Soong (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection" <u>Immunol Res</u> **41**(1): 15-25.
- Wanderley, J. L. M., Pinto da Silva, L. H. e col. (2009). "Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis" <u>PLoS ONE</u> **4**(5): e5733.
- Weil, L. e M. A. Russell (1934). "A manometric micromethod for arginase determination enzymatic study of blood arginase in rats" **106**(2): 505-513.
- Yeramian, A., Martin, L. e col. (2006). "Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation" <u>Eur J</u> <u>Immunol</u> **36**(6): 1516-1526.
- Zilberstein, D. e M. Shapira (1994). "The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites" <u>Annu Rev Microbiol</u> **48**(1): 449-470.

Anexo I

Alinhamento das regiões 3'UTR das cópias 5.1AAP3 e 4.7AAP3 do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis*





Anexo II

Contig da região intergênica entre as cópias 5.1AAP3 e 4.7AAP3 do transportador de arginina de *L. (L.) amazonensis.*

	5.1AAP3			3'UTR 5.1AAP3	
		20	40		80 100.
contig	TGTGTCATTGCAGTTGT	CTTTGGCACCATTACGAC	GATCTACTACAGCTTCTTCG	TGTGATATTCATCCACGTAA	AGGGAGGGCACTGTGGCTCATGCGT
	3'UTR 5.1AAP3				
		.120	140	160.	180 200
contig	GTGTTGAGACACGAAGG	GTCTGCCGTCCGGAGTGC	TGCTGCGTTGAAGGACGATC	TGCTCATATTGCTGAGACGG	ATATGGGAACGTGAGAGGATAGTGG
	3'UTR 5.1AAP3				
		220	240	260	280 300.
contig	TGTTTAACAACGCTTGA	GGCATAGGATTGTGTGTT	TTTCTTTCCCCCTTGTCAGT	CTTTTCACCACAGTGCGGCG	TGTGTTGCGGCTCTTTAAGTAGAAG
	3'UTR 5.1AAP3				
		320	340	360	380 400
contig	GACTTGCAGGCTGTCGC	TCGTGTCCCCCCCCCCC	ACATCACCTCATGAGACGAG	AAGCTCCCTGTCCCGCTGTC	CTGAAAACACGGAGAGGGTATAACGC
	3'UTR 5.1AAP3				
		420	440	460	490 500
contig	TGCCTTTATCCCTCGCC	TGTGCTCATTTTCTTTT	TATTTTTGTGTTTTCCTTCG	GGAACGAGCAACTAAAAAAA	GGATTGGGCGGTGTGGGGGAGACGTC
	3'UTR 5.1AAP3				
		520	-540	.560	580 600
contig	TGTCTTGGCTAAATTGC	TAACCCGCATGCTCGCTC	TCTCGTTTCCTTTTTCGTTT	TACCCTCCTCCTCTTCCCCC	CCTTCCCCGCGCCTCTCTTTCTAC
	3'UTR 5.1AAP3		Hindl		
		620	640 Fillitur	<i>11</i> 650	680 700
contig	TCCTGTGTGGNTTTCTC	CGTTCTCTTATTTTTTT	TTCACGGGGCACCGCCAAGC	TTTGTTGNCTTTCCGTACTT	TGCCGNGCTCACCTAGCTTGGGTTT
	3'UTR 5.1AAP3				
		720	740	760	7808008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008008000_800_8000_8000_8000_80000_8000000
contig	CCTCATACAANGNGTTT	CTGCCTTGGNTGTCTTGT	TTCGCTGTACCTCCCTCATC	TCTCCCGGTGGGTGTTCGAC	CATTTTGCCCCCTCCCCCCCTACCC
	3'UTR 5.1AAP3				
		820	840	860	880
contig	CCTCCCCTCCCCATTCA	CCCGCTTTTTCATAGATG	GGGACGGACCAGAGAGCTTG	TCGGATAGGCACGTCAATTT	GTGCCCGCTGGGCACACTATGTTGG
	3'UTR 5.1AAP3				
		920	940	960	980 1.000
contig	TGTCGCCACTGCCCTAC	CAGCACAGCCTACTCGTC	CTTTTTTTACGTTGCCGCGC	ACCTCCCTCCTTTTTCACAT	GATAAATCCATTTGTGCTCTCCTTG
	3'UTR 5.1AAP3				
		1.020	1.040	1.060	1.080 1.100
contig	CCGAGGCACGTCTTTTC	CTTATCTTCCTCGCTGAG	ACTTCTCTTCGCGAACGCTG	CAATGAAATCGATGAAGTGT	TTCCGTGCGTGTGCGTGTGTGTGTG
	3'UTR 5.1AAP3				
		1 120	1 140	1.160	1180 1200
contig	AGTGTGTCTCACAGGAT	GTTCGTGCACGTGATAAC	CAAATCACACCGAGTCTCTG	AGTGATGATTTTTATCTTTA	TCTTTCCAGCGCCACCACTTTCCCC
	3'UTR 5.1AAP3				
		1.220	1 240	1,260	1.280 1.300
contig	CTTCCATGTTCTCCCTC	GTCCTCCGCTTTTCTGTT	CTCTGNTTTTGNTTCGNGNG	NATGNTTTCTTGNGNAGGGC	ACCCGCGCAGGCTTGAATGTCTTCC
	3'UTR 5.1AAP3			Small	
		1.320	1.340	1360	1.380 1.400
contig	CCCCTCTCCCTCCCCAN	GTCTTCTCTCGANGTCTG	NCCTTCCAGAACCTCTTTGG	NGGCTGNCCCGGGGNAAGGA	TGAGNANCGANATNCNCNANAGNAN

3'UTR 5.1AAP3

		1420	1.440	1.46	148	1.500
contig	TCATGANGCCNAACA	AANNCGGGGNGGAN	TCCCGGTGGTGGACTCCCTGC	AAGGGCAAAGAAACATATAT	GTACATATATAGGCAAAAT	GCAAGGAGAGG
	3'UTR 5.1AAP3	4 500	1.540	1 500	1 500	1.000
eestis	64664444464666			ACAACCCCATCCTACCCCTT		COCATACCOC
conug	CAGGAAAAAGAGCG	AGCGACAGAAAGGA	AGGGCGGCAGTACAACCAGCG	AGAACCCCATCCTACGGGTT		CCCATACCCCC
	311TD 5 144D3					
	S OTR S.TAAPS	1.620	1.640	1.660	1.690	1 700
contig	TCCTACCTTTTTTAG	GGAGGGGGCGTGGG	CGTTGCGTCTCCCTATCTGCT	TTTCCGCCATCTCGGTTCTC	ACGTTTGTATCCCAGTGTG	CTTTTTTCTCC
	3'UTR 5.1AAP3					
		1.720	1.740	1.760	1.790	1.800
contig	CGCTCCCCCTCCCCG	ттөтссөтттөттт	TTCTTTTTCTGCATCGCGGGC	AACTGACCCACTTTATGAGT	тствссвссттстстссв	CCACCCTTACC
	3'UTR 5.1AAP3					
		1.820	1.840	1.860	1.880	1.900
contig	CCTCTCTTCCCTCTG	CCACCCCCTTCCCA	GGAAGCCACACCGGCCGATGT	GGAGGGAAGAAAAGGGGAA	GTGTCGGGCACATGTAACG	GATATAATGCCC
	3'UTR 5.1AAP3	1020	1.040	1.050	1 0 80	EcoRV and
	TTTTTTTTTTTT	COACACTTA AACAC		COTOCACACITOACACCECTO		TOCATATOOOC
conug		CCACACITAAAGAG	AAGTAACACATITCIGITTIA	CUTGUALAUTIGALAUGIGI	GATCATACGCCGTGCTCGA	ATCOLL
	21170 5 4 4 4 02					
	3 UTR 5.TAAP3	2.020	2 040	2.060	2.080	BamHI
contia	GTGGGGCAACGTCAG	TTATCATGGTTTGC	GTGGGTCTCAGCCTCCCGTAC	ATGCGACGCGCATGGCCGCT	ACCGCTGCTCTCCCTCGTA	GACCATGGGAT
5						
	3'UTR 5.1AAP3					
		2 120	2 140	2.160	2 190	2.200
contig	CACGACGTCGTCCT	CCCTCTTCAGTGTC	GATGCTTTCTCCGCTCTTCTT	CAGGAGATGGACACCAAGCT	GGAAAGATGCCCAGTAAGC	GACAAAAAAAT
	A			Xho	ล	
		2.220 I	2.240	2.260	2.280 I	2.300
contig	ACTAAACAACCCCCAA.	AGCGGGAGAGCTGT	TATCTGGCCGGGGGGCGTCCCTT	AAACACACGGTTACGCGC		GGTGCGAAACA
		2.320	2.340	2.360	2.380	2.400
contig	TCAGCTGTGTCCTCC	TACGAGCGGGTCAG	CGGTCTGGCTCCACAGTTGCA	TCCACACCAAACTCCCCACC	тсстсттстбадстатсса	ACTTAACAGCC
		2.420 I	2.440 I	2.460 I	2.480 I	2.500 I
contig	CACCTTGGCACACTA	CCGTGCATGCGGCA	CTGCAAAGGCGGCCCCTATGC	TCGATTTGATTTTGGTTCTC	TTTGTTTTTGCCTCCACCA	CCCTCTATACA
		2.520	2.540	2.560	2.580	2.600
contig	GTTCACCGTCCGTGA	CACCTCTTCATCCC	GCTCACCACCTCATGCGCGTC	ACCATACCGCCGTCGGGCTT	GTGCAGAGATTTCGTTCTG	AAATCGAGACA
		2.620 I	2.640 I	2.660 I	2.680 I	2.700 I
contig	GGGGCGGAAAGCAAG	ACGAGTCTTTAACA	GCGTACCGCGGGTAAGCGCAA	GCTATGGCGTTTCGCATGCT	GCACACAGGCTGTCCCACT	CTCTGCACCTT
		2.720	2.740	2,760	2,780	2.800
contia	CGCATCATTGCTCAT	CAGCCGTAGTCTCC	TACCCGAGTGTATCACCTCAA	CCCGGTTGCCGGCGGTCGAG	ATCAAGACATTGGCGAAGG	GCCGCTTGTGC
3						
		2.820	2.840	2.860	2.880	2.900
contig	GCGGCTCCGCGTGAT	GGACAGCTGGGAAA	ACGGCGTGCTGGGCGATCTCT	GAAACAGTGAAGTTGTCCTC	TCAGTCACCGATGGCGCCA	CAGCGAAGGAC
		2.020	2.940	2.060	2 0 00	3.000
contia	CACTTOCCCCCCTCCC					ATCGGACTCCT
conug			AGT TOCACT AGECT CAGTE AG	CONGRAGACOU ACCAGGGUG	A I DOUD I DA COACOGO I GO	A TOGACTOUT
		3.020	3.040	3.060	3.080	3.100
contig	CCACCTGGGGCACCT	CCATCACGCAGGTA	CTTCATTATGAACGACTTTCC	GACTTCTGAGAGGATATTCG	GGTCACCTGCGGCAAGGTG	GTCCCTACAGT
		3.120 I	3.140 1	3.160 I	3.180 I	3.200 I
contig	GGTGAGCGTCAGCGT	TTTCTGGGTGCCGT	TGGTGTTTGACACATCGCGGT	CTCGCTTTCGATCTTTTTT	TCGTCGTCGCACGCTTGCT	CTCGGCAGCGC
		3.220	3.240	3.260	3.280	Sall 3.300
contig	TGCTTCCCCTTGCTG	GCAGAGAACTTGG	TGGAACACGTAAACTGGCGTT	GACACTTTCTTGTTGTGTGT	GCTAGCGACAAGCTCGTCC	AGTCGACACTG
2						

3520 3.540 3.560 3.590 contig GCACACCGCTGCACGGTGGCTGGCTGCTTTTAACTTTGTTTTTTTT	3,600 CAACGTCAT 3,700 AGTGTACAT
3.520 Contig CGGTCGGGCTACATTCCTTGGAGGGGGGGGGGGGGGGGG	3.700 I AGTGTACAT
contig CGGTCGGGCTACATTCCTTGTAGCGAGCGAATTCGAAAACTTGTCTTACTGCTGTCTCTGGCTGACAGCCATCCTCCTTCCCAATAGC	AGTGTACAT
contig GGTGATTGGCAACCTTGCTGGTGTGGGCTACGTACAGGAGGCTTTGCGAGACACTTGATCTACCCTGTATGGTGGCGGTGTCTTAGGATAACG	3.800
2870 2.840 2.880 2.880	CACCTGTTC
contig AGAGCGCCGTAGATTGCGATGGTCTTCTCCATTGGCCTGGTACTTCTTGTGGCTCTCATGTCGTGTCGTGACGCCGCTTACCGATGCCTTT	CAGTGGGAC
3920 3940 3980 3980 I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	4.000 I CAACCGTCA
contig GTGGGTTACTGCAGAGGAGACAAGTTCTCGTTGCTTCCTTC	4.100 I ACGCGGTTG
4.120 L contig CTTCGGGGTGAAACGTATCGACGTCTTCGAGTGTCTGGCCGCCGCTTACTTA	4200 I AACGTCTTT
4 220 4 240 4 260 4 260 4 280 I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	4.300 I TCCAGTGAG
4.320 4.340 4.380 4.380 1 1 1 1 1	4.400 I
contig GAACCGGAAAGGGACCTCTCTCTCTGTGGTTGTGGCAGCTCAGCAACATCAAATCTGAGATGCTCTCTCGCTGAGCGCCCAACCGTACGT	4.500
contig CTGTCGCGAACGAAGATGTTGTCGTTGGCGTGTGCTAGTGTCGTGAAATATATGTTTTCTTGTGGGCTTCCCGACCTATCGCTGCCTCCGG	AACAGCGCT 4.600
contig TCGGAGAGCAGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	ACGCATATA
contig CATGCTTATGTCTGCTCGCTTTTTTTTTGCATGCTTGTCTCACCGTCCGGCAGGTAGCCGAGGACGTGGAAGACGTAGAGGGCAG	TGCTCCGCC
contig TGTGGTTCTCCCCCCCNAGTCCACCTCGATCTTTGTGCGGCCCTTCCCCCTGGTGAAGTGCCGCAGTGTCTTTTTCCTCTTATACTT	4.800 I TGTTTCGAT
4.820 4.840 4.860 4.880 contig TTTCGTACCTGTCCCTCCTGTGTGCGTGCGGGGGGGCCCTCCACCTCTGCGGGCTCTGCGCGCGGCGCGCGC	4.900 I TTTTCCCTC
4920 I contig TGTCTGTCTGTGTTACCTTTTCCCTAACTGCTCGGTAGTTCCGCCTTTCCTAGGACGTGGTGTTCGTCGTATTCTTCGGTGTCCGGCGCGCGG	5.000 I GCACAGCCC
	5.100 I ACAAAAAAG
	5200 I
5220 5.240 5.260 5.280 I I I I I I I	5.300
contig TGCGCAACCGCGTAGCAAAGAGGTGGCCGTTGCCTGCTCCTCCCTGCGTGTCCCCCCGGTGCTTCAACATATTCTGCTGCCTGTCTT	TCACCACCC
5320 5.340 5.360 5.380 I contig ATGCCTCGCCTCATCTGCTCCTCACACCTCTTCACAACACTCTTCTGATACAATCGCACCTAACGCTCTTCAGAGT	ACCATTGTG
5'UTR 4.7AAP3 5440 5460 5460 5480	5 500
contig GGTTAGTTCTACCTCCCCGGGGTGCCTCTGTACACAGGTTTCTTCGCTCGC	CGCATTTCT
	CCCCCTCCA
5'UTR 4.7AAP3	

contig CTGCTAGCGATCTTG

Anexo III

1 2	
5 4 5 6 7 8	Arginine Uptake and Arginine Transporter mRNA Level Respond to Extra- and Intracellular Arginine Availability in <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
9 10 11 12 13 14	Emerson A. Castilho-Martins, Maria Fernanda Laranjeira da Silva, Marcos G. dos Santos, Sandra M. Muxel and Lucile M. Floeter- Winter [*]
15 16	Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo
17 18 19 20 21 22	[*] Corresponding author Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo R. do Matão, Travessa 14, 101, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brazil E-mail: lucile@ib.usp.br
23 24 25	Abstract
26 27	Leishmania (L.) amazonensis uses arginine to synthesize polyamines to support
28 29 30	its growth and survival. Here we describe the presence of two gene copies,
31 32	arranged in tandem, that code for the arginine transporter. Both copies show
33 34	similar Open Reading Frames (ORFs), which are 93% similar to the L. (L.)
35 36 37	donovani AAP3 gene, but their 5' and 3' UTR's have distinct regions. According
38 39	to quantitative RT-PCR, the 5.1 AAP3 mRNA amount was increased more than 3
40 41 42	times that of the 4.7 AAP3 mRNA along the promastigote growth curve. Nutrient
43 44	deprivation for 4 hours and then supplemented or not with arginine (400 $\mu\text{M})$
45 46	resulted in similar 4.7 AAP3 mRNA copy-numbers compared to the starved and
47 48 49	control parasites. Conversely, the 5.1 AAP3 mRNA copy-numbers increased in
50 51	the starved parasites but not in ones supplemented with arginine (p < 0.05).
52 53 54	These results correlate with increases in amino acid uptake. Both Meta1 and
55 56	arginase mRNAs remained constant with or without supplementation. The same
57 58 59	starvation experiment was performed using a L. (L.) amazonensis null knockout
60 61 62 63 64 65	

for arginase (arg⁻) and two other mutants containing the arginase ORF with (arg⁻/ARG) or without the glycosomal addressing signal (arg⁻/arg Δ SKL). The arg⁻ and the arg⁻/arg Δ SKL mutants did not show the same behavior as the wild-type (WT) parasite or the arg⁻/ARG mutant. This can be an indicative that the internal pool of arginine is also important for controlling transporter expression and function. By inhibiting mRNA transcription or/and mRNA maturation, we showed that the 5.1 AAP3 mRNA did not decay after 180 min, but the 4.7 AAP3 mRNA presented a half-life decay of 32.6 +/- 5.0 min. In conclusion, parasites can regulate amino acid uptake by increasing the amount of transporter-coding mRNA, possibly by regulating the mRNA half-life in an environment where the amino acid is not present or is in low amounts.

Introduction

Leishmaniasis is a complex parasitic disease that currently affects about 12 million people and an estimated 2 million new cases per year [1]. It is caused by protozoa in the *Leishmania* genus, which has two distinct phases in its life cycle: the promastigote, an extracellular flagellate present at the gut of sand flies, and the amastigote that lives inside mononuclear phagocytes, mainly macrophages, in a vertebrate host.

Arginine is a key amino acid for macrophages because, being the substrate for inducible nitric oxide synthase (iNOS) to produce nitric oxide (NO), it is involved in the macrophage-defense response against pathogen infections. [2-8]. This amino acid is also a substrate for arginase, which catalyzes the production of urea and ornithine, a product important for polyamine pathway.

This pathway is used by Leishmania to replicate and is essential for the parasite to establish infection [9-12]. It has largely been reported that macrophage or Leishmania modulation of arginine is responsible for parasite survival or its killing in the mammal host [5,13-19].

Arginine uptake is controlled by membrane transporters present in both Leishmania and macrophages [20-24]. To sustain NO production, macrophages increase their expression of the main arginine transporter (CAT2B), which is indicative that the internal pool of arginine is not sufficient to supply arginine to iNOS [25-27]. On the other hand, a high-affinity arginine transporter has been described in L. (L.) donovani. This transporter is LdAAP3, and it has 480 amino acids and 11 predicted trans-membrane domains [22]. With this transporter, Leishmania seems to have mechanisms of sensing arginine decreases and responding with increased arginine uptake [28]. Therefore, the arginine-uptake control appears to be an important limiting factor to parasite survival inside macrophages [17,29].

Leishmania has a polycistronic transcription, and the control of gene expression is mainly performed through protein levels and mRNA stability [30]. In this study, we evaluated the importance of arginine transporter mRNA levels on the physiology of arginine uptake in L. (L.) amazonensis. Our data indicated that the arginine transporter expression in these organisms is controlled by regulating the transporter-coding mRNA levels. We also showed that the level of arginine transporter mRNA varies in promastigote development, and, using arginase-

deficient mutants, we showed that possible changes in the internal arginine pool could be responsible for altering the transporter-coding mRNA levels.

Results

Characterization of the L. (L.) amazonensis arginine transporter

A DNA probe based on the AAP3 ORF sequence of L. donovani [22] was used to screen a L. (L.) amazonensis genomic-cosmid DNA library [31]. The partial DNA sequence of the selected cosmid revealed the presence of two copies in tandem from a putative homologous gene. The ORF regions of the two copies showed 93% similarity to the AAP3 ORF in L. donovani (not shown). A northern blot analysis showed the presence of two distinct mRNAs for the gene (5.1 kb and 4.7 kb) (not shown). We named these transcripts 4.7 AAP3 mRNA and 5.1 AAP3 mRNA. The mRNA identities were confirmed by sequencing RT-PCR products that were obtained using oligo-dT reverse transcription and primers based on the cosmid sequence. These sequences were deposited in GenBank with accession numbers of HQ912026 (5.1 AAP3) and HQ912027 (4.7 AAP3). The two transcribed copies of the gene presented different 5' untranslated regions (5'UTRs). This allowed for the design of specific primers to differentially quantify each copy by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). The alignment of the 5'UTRs from the two copies, their differences and primers positions are shown in Figure S1.

Arginine uptake correlates with the transporter's mRNA level

It is known that *L. donovani* promastigotes are sensitive to arginine starvation, and they respond with an increase in both arginine transporter

expression and transport rate [28]. However, it is not completely clear at which level of protein-expression regulation this control occurs. We performed an arginine starvation on mid-log and stationary L. (L.) amazonensis promastigotes for 4 h at 25°C and then evaluated arginine uptake. Initially, we could note that at time 0 that means the physiological condition in each phase the arginine uptake in mid-log phase parasites is lower than the one detected in the stationary phase parasites. When starved, the mid-log phase parasites showed an increase in the arginine uptake compared to the control parasites at time 0 (p<0.05). As this behavior was not detected in starved stationary phase parasites, we can conclude that stationary phase parasites do not respond to starvation (Figure 1A). However, the increase in arginine uptake was not observed when the midlog phase parasites were incubated for the same time in the presence of arginine (400 μ M) (Figure 1A), but the arginine uptake of the stationary phase parasites decrease, in relation to time 0, when incubated in the presence of arginine (Figure 1A). We also evaluated mRNA level at mid-log parasites, and the increase of arginine uptake correlated with an increase in the relative copynumber of the 5.1 AAP3 mRNA (Figure 1B, p < 0.05), suggesting the existence of at least one pre-translational mechanism for controlling protein expression. Moreover, only the 5.1 AAP3 mRNA was sensitive to the amino acid starvation. No differences were observed in the 4.7 AAP3 mRNA copy-number or the mRNAs coding for arginase and Meta1, all normalized by the GAPDH mRNA copy-number (Figure 1B).

The arginine transporter mRNA level increases with the parasite's growth curve

To evaluate differences in the amino acid-starvation response between mid-log and stationary parasites, we analyzed mRNA expressions during their development between the 1st and 10th day of culture growth. We compared the mRNA expression amounts from the 5.1 AAP3 mRNA and the 4.7 AAP3 mRNA normalized to GAPDH mRNA. The arginine transporter mRNA was increased more than 10 times in the stationary parasites compared to the log-phase parasites (Figure 2). Interestingly, both copies increased the mRNA level in the stationary phase, although the 5.1 AAP3 mRNA was at least 30 fold more abundant than the 4.7 AAP3 mRNA at the log-phase, reaching 100 fold in the stationary phase.

Differences in transporter mRNA quantities are a consequence of distinct halflives

Treatment with actinomycin and sinefungin induces an inhibition of transcription and trans-splicing mRNA-maturation processes in the parasites [32,33]. At different treatment times, total RNA from promastigotes in the mid-log phase were obtained, and cDNA was prepared to evaluate mRNA quantity (Figure 3). The qRT-PCR data were normalized by SSUrRNA copy-number, a RNA that is not sensitive to the inhibitor drugs (Figure 3D). mRNA decays were observed for both 4.7 AAP3 mRNA (half life of 32.6 ± 5.0 min) and GAPDH (half life of 29.2 ± 8.8 min) (Figure 3B and 3C); however, the 5.1 AAP3 mRNA did not decay after 180 min of treatment (Figure 3A).

Differences in arginase expression alter arginine uptake

To evaluate the influence of the internal pool of arginine on its uptake, we used a L. (L.) amazonensis arginase-null mutant, arg⁻ (Laranjeira da Silva, in preparation), which does not use arginine to produce ornithine requiring polyamines supplementation. We compared arginine uptake in this mutant to the wild-type (WT) parasite, assuming an increase in the arginine internal pool in the mutant. The initial stationary phase of the mutant and WT parasites (5x10⁷/mL) was amino acid starved, and arginine uptake was evaluated. Although both parasites responded to amino acid starvation, the WT parasites presented greater arginine uptake than the arg⁻ (Figure 4). We performed the same assay using a knockout mutant that is genetically complemented with the arginase ORF (arg⁻/ARG) showing a partial recovery in arginase activity (Laranjeira da Silva in preparation). Interestingly, this mutant also presented a partial recovery in arginine uptake, compared to the WT. The complemented mutant that contained the arginase ORF without the correct glycosomal compartmentalization signal (arg⁻/arg∆SKL) and did not present any arginase activity (Laranjeira da Silva, in preparation), showed arginine uptake similar to the arg⁻ mutant (Figure 4).

Discussion

The data presented in this study show that *L. (L.) amazonensis* can control arginine uptake when parasites are amino acid starved. These observations are similar to those made in *L. donovani* [28]. Adding to that data, we showed that the higher concentration of one of the *AAP3* transcripts is due to a stabilization process in the mature mRNA and not to an increase in the transcriptional rate or mRNA *trans*-splicing maturation. Most eukaryotes

generally control their gene expression at the transcriptional level; however, *Leishmania* lacks this control mechanism because its transcription is polycistronic [34]. Besides, there are no known RNA polymerase II promoter regions that have binding sites for transcriptional regulatory factors. However, these organisms can control gene expression at the mRNA maturation level (poly-adenylation/*trans*-splicing coupled processes) or by changing mRNA halflives in different conditions [30]. This digenetic organism experiences different environmental conditions, such as pH, temperature and nutrient availability, when it cycles between invertebrate and mammalian hosts [35]. Our findings may suggest a possible mechanism for the parasite to overcome the different requirements due to these environmental changes. A possible physiological explanation for the presence of two copies of the AAP3 gene is that each copy could be differentially regulated according to the environmental conditions of the parasite's differentiated stage. It is interesting that one of the arginine transporter mRNAs (4.7 AAP3 mRNA) presented the same typical decay behavior observed for GAPDH mRNA when promastigotes were treated with actinomycin and sinefungin. The other transcript (5.1 AAP3 mRNA) did not show any degradation up to 180 min after blocking of transcription and *trans*-splicing. This could explain the reason why this copy presents at least 30-fold more copies than the 4.7 AAP3 mRNA. Previous reports show that the mRNA stability in these organisms is altered by amino acid availability, but the molecular mechanisms by which this occurs are still unclear [36-38]. We may speculate that, in some way, the amino acid concentrations in

extra- or intracellular medium could act as sensors to regulate mRNA decay. Because arginase is an enzyme that uses arginine as a substrate, we used null or supplemented arginase mutants to test the influence of the arginine internal pool on the level of transporter mRNA. Our data indicated that, in the absence of arginase activity, which probably leads to an increase in the internal concentration of arginine, the parasites reduced their amino acid uptake.

Arginine is an essential substrate for macrophages to kill *Leishmania*, as it is used in the iNOS pathway to produce NO [19]. However, a macrophage's internal arginine pool is not enough to provide substrate for either Th1 or Th2 responses [39]. This highlights the importance of arginine uptake control. Arginine influx into macrophages may be buffered if recently phagocytized *Leishmania* promastigotes increase arginine transport and sequester arginine from the macrophages. This is especially true when considering that macrophage CAT2 has no sensitivity to arginine concentrations [40].

L. (L.) major arginase-null mutants show a delay in starting lesions in *in vivo* infections [41]. The *L. (L.) amazonensis* arginase-null mutants also presented a delay in *in vivo* infectivity (Laranjeira da Silva, in preparation). Under arginine starvation, the arginine uptake in the arg⁻ mutants was less pronounced than in the WT parasites. This infective-capacity impairment may be attributed to both arginine uptake and/or arginase activity. The uptake pattern of arg⁻ tended to be reverted in the mutant that was genetically complemented with the WT arginase ORF, but the pattern did not revert when the genetic complementation was done with an arginase ORF without the correct glycosomal addressing

signal. This supports the idea that arginase exerts some control on arginine uptake, and arginine uptake is crucial to parasite survival inside macrophages. In addition, the lower arginine uptake that occurred in response to starvation in the null mutants indicates a mechanism to increase arginine transporter mRNA. This may occur through detecting possible changes in the internal arginine pool because the disruption of one arginine pathway decreases responses to amino acid starvation, which is also described in *L. donovani* ornithine decarboxylase or spermidine synthase-null mutants [28].

Stationary phase WT parasites have an increased expression of the arginine transporter, in relation to mid-log phase parasites, but did not respond to amino acid starvation. On the other hand, stationary phase arg⁻ mutant responds to arginine starvation like mid-log phase WT parasites (Figure 1A and Figure 4). A possible explanation is that the mutant uses less arginine present in the culture media, keeping a higher concentration compared to the WT growing media. The data suggests that the maximum expression of the transporter may have been already reached at WT stationary phase. Achieving maximum transporter expression may be a response to decreases in nutrient concentrations in the culture medium over time, and it may represent an adaptation to the low-nutrient availability found inside the fly mid-gut after blood digestion was completed. Another mechanism could be that nutrient depletion drives the modifications in promastigote parasites that induce differentiation in the infective stage [42]. Thus, arginine depletion may represent a signal to metacyclogenesis, although we did

not observe changes in Meta1 mRNA due to amino acid starvation. This is possibly because we only observed them for 4 hours.

The results presented in this study lead us to conclude that arginine uptake is controlled by transporter-coding mRNA levels in *L. (L.) amazonensis.* They also suggest a mechanism that senses internal arginine concentrations and controls arginine uptake by increasing arginine transporter expression. This may represent a part of metacyclogenesis for achieving the infective stage.

Materials and Methods

Organisms

Wild-type (WT) promastigotes from the *L. (L.) amazonensis* strain MHOM/BR/1973/M2269 and three arginase mutants (arg⁻, arg⁻/ARG and arg⁻/arg Δ SKL (Laranjeira da Silva, in preparation)) were maintained at 25°C by inoculating 5 x 10⁶ parasites in M199 medium (10 mL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS - Invitrogen - Carlsbad, USA) in 25 cm² tissue culture flasks. The supplemented media was changed every 7 days. Arginase-null mutants were also supplemented with putrescine (50 μ M).

mRNA expression and arginine uptake were evaluated along the growth curve by maintaining the parasites at log phase by sub-culturing them every 24 h with the same initial cell ratio (5 x 10^5 parasites/mL), as previously described [43].

AAP3 gene cloning

Based on sequences described by Shaked-Mishan et al. [22], we amplified the *L. (L.) donovani* AAP3 ORF from genomic DNA, purified as described previously [44]. We used this amplicon as a template to construct a

radioactive probe (0.1 mCi). This probe was constructed using α³²P-dCTP (10 mCi/mL; 3,000 Ci/mmol; GE Healthcare, UK) and Amersham Megaprime DNA Labeling Systems (GE Healthcare, UK) following manufacturer's standard protocol. This probe was used to screen a *L. (L.) amazonensis* cosmid library [31] (kindly provided by S.R. Uliana, ICB-USP), and cosmid DNA was printed from bacterial-containing plates onto a nylon membrane [45]. Hybridization was performed at 42°C overnight followed by two separate, 20-min washes at ambient temperature and 50°C with SSC 2X SDS (0.1%). The nylon membrane was exposed to X-ray film (Kodak) and developed according the manufacturer's protocol. Selected clones were recovered in SOB growth media, and cosmid DNA was isolated by alkaline lysis [45]. Sequencing of the cosmid DNA was performed by the Sanger dideoxy protocol as described previously [46].

RNA purification, cDNA synthesis and qRT-PCR

RNA was extracted with Trizol Reagent (Invitrogen) using the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed with a random primer protocol (Fermentas, M-MuLV RT) using total RNA (2 μ g). The obtained cDNA was diluted in water and used in quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) with primers (Table I) designed to differentially amplify the 5'UTR region of the two copies of the *AAP3* gene. The expected products were cloned and sequenced to validate the PCR. Known amounts of the cloned-DNA products were calculated (number of molecules), and they were used in the qRT-PCR to produce the standard curve. The following protocol was used in the qRT-PCR: 50 total cycles encompassing an association/fragment extension step at 61°C for 50

s and a denaturation step for 20 s at 94°C. A 7300 System (Applied Biosystems, USA) was used to run the qRT-PCR. The primers used to amplify GAPDH (internal control), arginase and SSUrRNA are described elsewhere [43].

Uptake assays

We adapted a protocol from dos Santos et al. [47] for the uptake assays. Briefly, promastigotes in the mid-log phase (2×10^7 parasites/mL) or in the initial stationary phase (4.5×10^7) were washed twice with cold Earle's Based Salt Solution (EBSS) (LGC Biotecnologia, SP, Brazil) and resuspended at 2×10^8 parasites/mL. We combined 50 µL of this mixture (10^7 parasites) with 50 µL of ³H-Arginine (40μ M; 1μ Ci/mL; GE Healthcare, UK) at 25°C. Uptake was stopped at different times by adding 50-mM ice-cold arginine (Ajinomoto, Tokio, Japan) (200 µL). Parasites were then washed twice with EBSS (200μ L), and radioactivity was measured by liquid scintillation spectrometry in a 2100TR Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer, USA).

Starvation assay

We used a protocol described by Daslyuk et al. [28] to starve the promastigotes, with one difference: the parasites were kept for 4 h at 25°C. Controls were performed at time 0 by putting the parasites on ice or incubating the parasites in the presence of arginine (400 µM).

Actinomycin and Sinefungin treatments

RNA half-lives were determined using actinomycin D (Sigma-Aldrich, MO, USA) (10 μ g/mL) and sinefungin (Sigma-Aldrich, MO, USA) (2 μ g/mL) as

1	
2	
3	
4	described by Stewart & Clayton [32] At different times the parasites were placed
5	
6	in ERSS, and the treatments were standed by lyging the percepted with Trizel
7	in ED33, and the treatments were stopped by lysing the parasites with thizor
8	
9	Reagent (Invitrogen, USA) for RNA extraction.
11	
12	
13	Statistical data analysis
14	
15	Statistical significance was determined by Student's t test ($n < 0.05$)
16	Statistical significance was determined by Student's trest $(p < 0.05)$.
17	Pataranaaa
18	Reierences
19	
20	1. Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives.
21	Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27: 305-318.
22	2 Murray HW (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral
23	leishmaniasis - II Ovygen- dependent killing of intracellular Leishmania
24	denoveni emeetigetee, lournel of Immunelogu 100: 251, 257
26	donovani amasiigoles, Journal of Immunology 129, 351-357.
27	3. Murray HW, Cartelli DM (1983) Killing of Intracellular Leisnmania donovani by
28	human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -
29	independent leishmanicidal activity. J Clin Invest 72: 32-44.
30	4. Murray HW, Szuro-Sudol A, Wellner D, Oca MJ, Granger AM, et al. (1989)
31	Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent
32	antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human
33	macrophages. Infect Immun 57: 8/5-8/9
34	5 Liow EV Millett & Darkinson C. Dalmar DM, Manada S (1990) Maaranbaga
35	5. Liew FY, Millou S, Parkinson C, Paimer Rivi, Moncada S (1990) Macrophage
30 27	killing of Leisnmania parasite in vivo is mediated by hitric oxide from L-
38	arginine. J Immunol 144: 4794-4797.
39	6. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, et al.
40	(1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated
41	macrophages and killing of Leishmania major. Eur J Immunol 24: 672-676.
42	7. Liew FY, Xu D, Chan WI (1999) Immune effector mechanism in parasitic
43	infections Immunol Lett 65: 101-104
44	8 Murray HW, Nathan CE (1999) Macrophage microbicidal mechanisms in vivo:
45	o. Multiay Two, Nathan Or (1000) Macrophage Inicrobicidal mechanisms in two.
46	reactive hitrogen versus oxygen merneolates in the kining of milacenular
47	visceral Leisnmania donovani. J Exp Med 189: 741-746.
40	9. Mukhopadhyay R, Madhubala R (1995) Leishmania donovani: cellular control
50	of ornithine decarboxylase in promastigotes. Int J Biochem Cell Biol 27:
51	947-952.
52	10. Fairlamb AH, Cerami A (1992) Metabolism and functions of trypanothione in
53	the Kinetoplastida, Annu Rev Microbiol 46: 695-729.
54	11. Yoshida N. Camargo FP (1978) Ureotelism and ammonotelism in
55	trypanosomatids I Bacteriol 136: 1184-1186
56	12 Camaraa ED, Caalba IA, Maraas G, Eiguairada EN (1978) Trupapasama
57	12. Califaryo EF, Coelifo JA, Moraes G, Figuelledo EN (1970) Trypanosonia
50	spp., Leisnmania spp. and Leptomonas spp.: enzymes of ornithine-
60	arginine metabolism. Exp Parasitol 46: 141-144.
61	
62	
63	
64	
65	

1	
2	
3	
4	13 Boach TL Kiderlen AF, Blackwell JM (1991) Bole of inorganic nitrogen oxides
5	and tumor percent is factor alpha in killing Laishmania depayani
6	and tumor necrosis factor alpha in killing Leisnmania donovani
7	amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated
8	macrophages from I shs and I shr congenic mouse strains. Infect Immun
9	
10	33. 3333-3344.
11	14. Evans TG, Reed SS, Hibbs JB, Jr. (1996) Nitric oxide production in murine
10	leishmaniasis: correlation of progressive infection with increasing systemic
12	synthesis of nitric oxide Am I Trop Med Hyg 54: 486-489
13	15 Line IV Wei VO Berefe the (1007) Other Higg 54, 400-400.
14	15. LIEW FY, Wel XQ, Proudfoot L (1997) Cytokines and hitric oxide as effector
15	molecules against parasitic infections. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci
16	352: 1311-1315.
17	16 Injecte V. Company Niete I.C. Correlize I (2001) The inhibition of arginase by
18	To: mesta v, Gomez-Nielo LC, Conaliza (2007) The milibilion of arginase by
19	N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of Leishmania inside
20	macrophages. J Exp Med 193: 777-784.
21	17 Kroof P. Eventes, IM. Eaborich F. Arna I. Herath S. et al. (2005) Arginase
22	and networks of the second sec
23	and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental
24	leishmaniasis in vivo. Faseb J 19: 1000-1002.
25	18. Gaur U. Roberts SC. Dalvi RP. Corraliza I. Ullman B. et al. (2007) An effect
26	of parasite-encoded arginase on the outcome of murine outaneous
27	biparasie-encoded aiginase of the outcome of multime cularieous
28	leisnmaniasis. J Immunoi 179: 8446-8453.
29	19. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr., Nacy CA (1990) Activated
30	macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-
31	arcining dependent killing medenalism. Limmunol 144:279 293
32	arginine-dependent kinng mechanism. 5 minunoi 144. 276-265.
33	20. Deves R, Boyd CA (1998) Transporters for cationic amino acids in animal
31	cells: discovery, structure, and function. Physiol Rev 78: 487-545.
25	21. Closs EL I vons CR. Kelly C. Cunningham JM (1993) Characterization of the
30	third member of the MCAT family of extinctic emine acid transportation
20	tilled member of the MCAT failing of cationic animo acid transporters.
37	Identification of a domain that determines the transport properties of the
38	MCAT proteins. J Biol Chem 268: 20796-20800.
39	22 Shaked-Mishan P. Suter-Grotemeyer M. Yoel-Almagor T. Holland N
40	Zilberstein P, et al. (2006) A payed bigh officity argining transporter from
41	Zilberstein D, et al. (2006) A novel nigh-aminity arginine transporter from
42	the human parasitic protozoan Leishmania donovani. Mol Microbiol 60:
43	30-38.
44	23 Geraldo MV Silber AM Pereira CA Illiana SR (2005) Characterisation of a
45	
46	developmentally regulated amino acid transporter gene from Leisnmania
47	amazonensis. FEMS Microbiol Lett 242: 275-280.
48	24 Akerman M. Shaked-Mishan P. Mazareb S. Volpin H. Zilberstein D (2004)
49	Novel motifs in amino acid permease genes from Loishmania. Bioshom
50	Novel hours in animo acid permease genes nom Leisnmania. Diochem
51	Biopnys Res Commun 325: 353-366.
52	25. Nicholson B, Manner CK, Kleeman J, MacLeod CL (2001) Sustained nitric
53	oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2
54	Dial Cham 276 (1593) 1595
55	J BIOI Chemi 276, 15881-15885.
56	26. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U (2000) Substrate supply for
57	nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic
58	amino acid transporters. Mol Pharmacol 57: 68-74
50	
59 60	
61	
01	
02	
63	
64	
00	

 Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Moncada S, Mann GE (1992) L- arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. Biochem J 284 (Pt 1): 15-18. Dartyuk K, Goldman A, Roberts SC, Ullman B, Rentsch D, et al. (2009) Arginine homeostasis and transport in the human pathogen Leishmania donovani. J Biol Chem 284: 19800-19807. Naderer T, McConville MJ (2008) The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol 10: 301-308. Flinn HM, Smith DF (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids Res 20: 755-762. Ullana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in TRNA tumover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of GHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase g	1 2	
 27. Obge RG, baydolf AF, jedeslof CJ, Moncada S, Mann GE (1992) L²⁵ arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. Biochem J 284 (Pt 1): 15-18. 28. Darlyuk I, Goldman A, Roberts SC, Ullman B, Rentsch D, et al. (2009) Arginine homeostasis and transport in the human pathogen Leishmania donovani. J Biol Chem 284: 19800-19807. 29. Naderer T, McConville MJ (2008) The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol 10: 301-308. 30. Flinn HM, Smith DF (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids Res 20: 755-762. 31. Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. 32. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein O, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basili	3 4	27 Regio RG, Raydoun AR, Roarson JD, Managda S, Mann GE (1992) I
 28. Darlyuk I, Goldman A, Roberts SC, Ullman B, Rentsch D, et al. (2009) Arginine homeostasis and transport in the human pathogen Leishmania donovani. J Biol Chem 284: 19800-19807. 29. Naderer T, McConville MJ (2008) The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol 10: 301-308. 30. Flinn HM, Smith DF (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids Res 20: 755-762. 31. Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. 32. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-ielated gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier	5 6	arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. Biochem J 284 (Pt 1): 15-18
 Arginine homeostasis and transport in the human pathogen Leishmania donovani. J Biol Chem 284: 19800-19807. Naderer T, McConville MJ (2008) The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol 10: 301-308. Flinn HM, Smith DF (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids Res 20: 755-762. Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosome succei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 3	8	28. Darlyuk I, Goldman A, Roberts SC, Ullman B, Rentsch D, et al. (2009)
 Baldiovali, Subic Generative Action 2001 1900 (1): 301-308. Pilon HM, Smith DF (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids Res 20: 755-762. Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844-4851. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. Jusol Chem 272: 17588-17593. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2004) Amino acid tarinsport ya cationic anino acid transport 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5914-5924. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (9 10	Arginine homeostasis and transport in the human pathogen Leishmania
 metabolic perspective. Cell Microbiol 10: 301-308. 30. Flinn HM, Smith DF (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids Res 20: 755-762. 31. Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. 32. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844-4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Burthat A, Cararo V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Botran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. E	11 12	29. Naderer T, McConville MJ (2008) The Leishmania-macrophage interaction: a
 30. Finith FM, Smith DF (1992) Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids Res 20: 755-762. 31. Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. 32. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844-4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development to Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averouz J, Burthat A, Cararo V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Yapa L, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Lei J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Sertan	13	metabolic perspective. Cell Microbiol 10: 301-308.
 Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activat	14 15 16	differentially-regulated gene family from Leishmania major. Nucleic Acids
 overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191. 32. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoptein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immuno	17 18	31. Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF (1999) Leishmania:
 32. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways. in "RNA turnover in eukaryotes: nucleases, pathways and analysis of mRNA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-d	19 20	overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. Exp Parasitol 92: 183-191.
 a becay pathways. In FINA decay", ed Maquat LE, Kiledjian M. Methods Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. 44. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Bottra J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	21 22	32. Stewart M, Clayton C (2008) Trypanosomes as a model to investigate mRNA
 Enzymol 448: 359-377. 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	23 24	and analysis of mRNA decay", ed Maguat LE, Kiledjian M. Methods
 33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. Mol Cell Biol 12: 4844- 4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	25	Enzymol 448: 359-377.
 a the injections are required for trains splicing in vivo. Not Centrol 12: 4044- 4851. 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	26 27	33. McNally KP, Agabian N (1992) Trypanosoma brucei spliced-leader RNA
 34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989) Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	28	
 Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	30	34. Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, et al. (1989)
 transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283. 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	31 32	Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are
 35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	33	tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. Mol Biochem Parasitol 32: 271-283
 development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48: 449-470. 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	34 35	35. Zilberstein D, Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the
 38 36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	36 37	development of Leishmania parasites. Annual Reviews in Microbiology 48:
 limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	38	36. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, et al. (1997) Amino acid
 protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. J Biol Chem 272: 17588-17593. 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	39 40	limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding
 37. Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066. 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	41	protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels.
 definition of the standard sta	43	37. Gong SS. Guerrini L. Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase
 38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	44	gene expression by amino acid starvation. Mol Cell Biol 11: 6059-6066.
 acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452. 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	46	38. Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, et al. (2004) Amino
 39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	47 48	acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 313: 447-452
 require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	49	39. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, et al. (2006) Macrophages
 and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	50 51	require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation
 40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	52	and for activation. Eur J Immunol 36: 1516-1526.
 role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176: 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	53 54	40. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, et al. (2006) Arginine
 59 5918-5924. 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- 	55	role in classical or alternative activation of macrophages. J Immunol 176:
 41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- a 	56 57	5918-5924.
with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number- ender- with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number-	58	41. Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, et al. (2009) Infection
61 62 63 64 65	59 60	with arginase-deficient Leishmania major reveals a parasite number-
63 64 65	61	
64 65	63	
	64	
	00	
1		
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	
1		
2		
3		
4	dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase	
5	activity and disconsing the second and the second second at a grades	
6	activity and disease pathogenesis. J minution 183, 8068-8076.	
7	42. Sacks DL, Perkins PV (1985) Development of infective stage Leishmania	
8	promastigates within phlebotomine sand flies. Am J Trop Med Hvg 34	
9		
10	456-459.	
10	43. dos Santos MG, da Silva MFL, Zampieri RA, Lafraia RM, Floeter-Winter LM	
11	(in press) Correlation of meta 1 expression with culture stage, cell	
12		
13	morphology and meetivity in Leisnmania (Leisnmania) amazonensis	
14	promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz.	
15	44. Uliana SR. Affonso MH. Camargo FP. Floeter-Winter I M (1991) Leishmania:	
16	gonus identification based on a specific sequence of the 19S ribesemal	
17	genus identification based on a specific sequence of the 185 hbosonial	
18	RNA sequence. Exp Parasitol 72: 157-163.	
19	45. Sambrook J. Russell DW (2001) Molecular cloning : a laboratory manual.	
20	Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3.V. p.	
21	40 Concert E Nickers 0, Could opting harbor Laboratory (1655, 0.9, p.	
22	40. Sanger F, NICKIEN S, Coulson A (1977) DINA sequencing with chain-	
23	terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 5463.	
2.0	47. dos Santos MG. Paes I S. Zampieri RA da Silva MF. Silber AM et al. (2009)	
24	Disaboritad beresterization of aging transport in Leichmania	
25	Biochemical characterization of senne transport in Leisnmania	
26	(Leishmania) amazonensis. Mol Biochem Parasitol 163: 107-113.	
27		
28		
29	Figure Legende	
30	Figure Legends	
31		
32	Figure 1. Amino acid starvation regulates the arginine transporter rate and	
33	Fight AADO - DNA lovel in (()) and an of a AAntining statute of middle of	
34	5.1 KD AAP3 MRNA level in L. (L.) amazonensis. A. Arginine uptake of mid-log	
34 35	and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h	
34 35 36	and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> . A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 µM arginine parasites (gray). B.	
34 35 36 37	5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L.</i> (<i>L.</i>) <i>amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L.</i> (<i>L.</i>) <i>amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total BNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h	
34 35 36 37 38	5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h	
34 35 36 37 38 39	5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA,	
34 35 36 37 38 39 40	5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used	
34 35 36 37 38 39 40 41	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in gRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine	
34 35 36 37 38 39 40 41	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta 1. All determinations were normalized by GAPDH	
34 35 36 37 38 39 40 41 42	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH.	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43	5.1 KD AAP's mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E.	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44	5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 43	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49	 5.1 kb AAP's mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1). 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 43 44 45 46 47 48 49 50	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54	5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis.</i> A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i> . A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4).	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56	 5.1 Kb AAP's mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copy- 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57	 5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58	 5.1 Kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A. B and C were normalized by SSUrRNA. 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59	 5.1 kb AAP3 mRNA level in L. (L.) amazonensis. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase L. (L.) amazonensis in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA of both arginine transporters in L. (L.) amazonensis were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of L. (L.) amazonensis total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the parasites total sporter, C. 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60	 5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the exponential decay fit of actionmycin-treated complex. The discenting the exponential decay fit of actionmycin-treated complex. 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61	 5.1 Kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 µM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 µM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the exponential decay fit of actinomycin-treated samples. The discontinuous line represents the exponential decay fit of 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62	 5.1 KD AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites 'growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the exponential decay fit of ation/cin-treated samples. The discontinuous line represents the exponential decay fit of 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63	 5.1 Kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites 'growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the exponential decay fit of actinomycin-treated samples. The discontinuous line represents the exponential decay fit of 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63	 5.1 KO AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i>. A Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites 'growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the exponential decay fit of actinomycin-treated samples. The discontinuous line represents the exponential decay fit of 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64	 5.1 KO AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 µM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 µM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites 'growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the exponential decay fit of actinomycin-treated samples. The discontinuous line represents the exponential decay fit of 	
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65	5.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i> . A. Arginine uptake of mid-log and stationary phase <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites 'growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copy-numbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSUrRNA. A, B and C were normalized by SSUrRNA. The black line represents the exponential decay fit of actinomycin-treated samples. The discontinuous line represents the exponential decay fit of actinomycin-treated samples.	
$\begin{array}{c} 34\\ 35\\ 36\\ 37\\ 38\\ 39\\ 40\\ 41\\ 42\\ 43\\ 44\\ 45\\ 46\\ 47\\ 48\\ 49\\ 50\\ 51\\ 52\\ 53\\ 54\\ 55\\ 56\\ 57\\ 58\\ 59\\ 60\\ 61\\ 62\\ 63\\ 64\\ 65\\ \end{array}$	 b.1 kb AAP3 mRNA level in <i>L. (L.) amazonensis</i> in non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). B. Total RNA of non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μM arginine parasites (gray). RNA was used to prepare the cDNA, as described in Material and Methods. Equal amounts of cDNA were then used in qRT-PCR to determine the copy-number of both copies of the arginine transporter, arginase and Meta1. All determinations were normalized by GAPDH. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=3). Figure 2. mRNA quantification from the parasite culture-growth curve. Total RNA from each day on the culture growth curve was used to obtain the cDNA. mRNA of both arginine transporters in <i>L. (L.) amazonensis</i> were determined (5.1 AAP3 mRNA in black; 4.7 AAP3 mRNA in white), and both were normalized to GAPDH mRNA. The black line represents the parasites' growth curve. The results of a representative experiment. Data are shown as the mean ± S.E. (n=4). Figure 3. mRNA decay of <i>L. (L.) amazonensis</i> total mRNA. Relative copynumbers of: A. 5.1 AAP3 mRNA transporter, B. 4.7 AAP3 mRNA transporter, C. GAPDH mRNA and D. SSURNA. A, B and C were normalized by SSURNA. The black line represents the exponential decay fit of actinomycin-treated samples. The discontinuous line represents the exponential decay fit of 	

actinomycin + sinefungin-treated samples. Fit lines for B and C have $R^2 > 0.90$. Results of a representative experiment. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=3).

Figure 4. Arginine uptake in *L. (L.) amazonensis.* Promastigotes from wildtype (WT), arginase knockout mutant (arg⁻), arginase genetically-complemented mutant with glycosomal addressing signal (arg⁻/ARG) and arginasecomplemented mutant without the glycosomal addressing signal (arg⁻/arg Δ SKL) were treated with labeled arginine for 5 min to determine the arginine uptake, as described in the Material and Methods. Bars represent non-starved parasites (black), 4-h starved parasites (white) and 4-h starved + 400 μ M arginine parasites (gray). Results of a representative experiment. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=3).

Figure S1. Sequence alignment of the 5'UTRs from 5.1 AAP3 mRNA and 4.7 AAP3 mRNA. Cyan-colored box represents the *Spliced-Leader* RNA sequence. Gray box represents the ORF beginning. Blue boxes show the primers for amplifying the 5.1 AAP3 mRNA, and the green boxes show the primers for amplifying the 4.7 AAP3 mRNA.

Tables

Table 1. Primer sequences used in PCR reactions and the amplified products

Name	Sequence (5'-3')	Used to:
TArg5U1KF	GGT CCC CGA TAC ACA CAT TC	Amplify 5'UTR of 5.1 mRNA
TArg5U1KR	GTC TCC CGT TTT GCA AGA GA	
TArg5u500bF	ACC ATT GTG GGT TAG TTA TAC ATC C	Amplify 5'UTR of 4.7 mRNA
TArg5u500bR	CAA GAT CGC TAG CAG TGG AG	

Figure 1 Click here to download Figure: Castilho_Martins Figure1.eps











Figure 4 Click here to download Figure: Castilho_Martins Figure4.eps



10

Supporting Information Click here to download Supporting Information: Castilho_Martins FigureS1.tif Other manuscript in press Click here to download Other: MIOC in press.pdf