MARIA CÁRMEN OLIVEIRA PINHO DE SALES

Regulação da expressão do transportador de aminoácidos de
Leishmania (Leishmania) amazonensis

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical de São Paulo da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração:
Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Lucile Maria Floter-Winter

São Paulo
2014

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Sales, Maria Cármen Oliveira Pinho de

Regulação da expressão do transportador de aminoácidos de
Leishmania (Leishmania) amazonensis / Maria Cármen Oliveira Pinho
de Sales. – São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Lucile Maria Floeter-Winter

Descritores: 1. *LEISHMANIA*. 2. PROTEÍNAS DE TRANSPORTE.
3. ARGININA. 4. EFEITOS DA TEMPERATURA.

USP/IMTSP/BIB-06/2014.

Aos meus pais, pelo incentivo e auxílio em tudo na minha vida.

Aos meus irmãos, pela compreensão, carinho, apoio incomparáveis durante este percurso.

Aos meus queridos amigos, com a certeza que sempre estiveram presente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu adquirir os conhecimentos biológicos e humanísticos, que sempre me abençoou e esteve comigo durante essa jornada.

À Lucile Maria Floeter- Winter pela oportunidade e disponibilidade em me orientar na execução deste trabalho e pelos ensinamentos.

À Elenice e ao Camilo, que me permitiram sempre estudar e conhecer o novo, pelo apoio incontestável, amor, força e orações dispensadas em todos os momentos da minha vida.

À Laura Helena e ao Camilo Jr., pelo apoio nas minhas escolhas, por saberem esperar meu retorno a nossa casa para me receber com todo carinho.

À minha família pelo apoio e carinho.

Ao Heloísio, Paulo e amigos pela atenção e suporte intermináveis nesta etapa.

Aos amigos de longa data, Laura, Thabata, Núbia pela presença em todos os momentos de alegria, crises, tristezas, e nas conquistas. Vocês fizeram a diferença!!!!

Aos novos amigos Daniela, Kate, Tássia, Sérgio, Helô, Roseli, Fernanda pela amizade, carinho, e por tornarem meus dias mais alegres durante esta caminhada.

Ao Guga pelo companheirismo e incentivo.

Aos companheiros do laboratório, Amanda, Carol, Juliana, Maria Fernanda, Ricardo, Sandra, pela ajuda nos experimentos, pela paciência, conversas e camaradagem.

À Eliane Araújo, pela atenção, ajuda, e profissionalismo em todos os quesitos da pós-graduação no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Sales, MCOP. Regulação da expressão do transportador de aminoácidos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

Leishmania caracteriza-se por apresentar duas formas morfollogicamente distintas em seu ciclo de vida: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas vivem no tubo digestório do vetor flebotomíneo, sob as condições de pH 7,0 e temperatura ambiente, ao redor de 25°C. As formas amastigotas são encontradas no interior dos fagolisossomos de macrófagos infectados onde encontram um ambiente de pH ácido e temperatura ao redor de 34°C. *Leishmania* utiliza arginina para a síntese de poliaminas, que desempenham papel fundamental no crescimento, diferenciação celular e sucesso da infecção. A tomada de arginina em *L. (L.) amazonensis* é feita pela proteína transportadora de aminoácidos – *amino acid transporter-like 3* (AAP3), codificada por duas cópias do gene (5.1 *aap3* e 4.7 *aap3*) dispostas em *tandem* no genoma. Os transcritos de 5.1 *aap3* e de 4.7 *aap3* apresentam 98% de identidade entre as ORFs, mas diferem nas 5' e 3' UTR. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se os sinais de temperatura, pH e privação de arginina dispararam a regulação da expressão de *aap3* em formas promastigotas e amastigotas. Para isso avaliamos o nível dos transcritos e realizamos ensaios de tomada de arginina em células submetidas à privação ou suplementadas com arginina, nas temperaturas de 25°C ou 34°C em pH 7,0 ou 5,0. Constatou-se em formas promastigotas que o transcrito 5.1 *aap3* apresentou maior abundância em relação a 4.7 *aap3*, e que a privação promoveu o aumento da tomada do aminoácido quando os parasitos eram mantidos em pH 7,0 a 25°C, corroborando dados anteriores do nosso grupo. Demonstramos que a mudança de temperatura foi um fator importante para o aumento do número de

cópias de 5.1 *aap3* em promastigotas privadas, principalmente quando associadas com o pH 5,0. Além disso, o aumento da temperatura favoreceu a tomada de arginina, corroborando com a elevação do número de cópias observada para o transcrito 5.1 *aap3*. Em amastigotas-like, mantidas a 25°C e pH 7,0 a privação reverteu a expressão de 5.1 *aap3* para o mesmo perfil observado para promastigotas. Contudo, não observamos um favorecimento na tomada de arginina. Ainda em amastigotas, o tratamento a 34°C e pH 7,0 favoreceu a tomada de arginina, porém não observamos um aumento correspondente na quantificação do transcrito. O transcrito 4.7 *aap3* não apresentou alteração significativa em qualquer tratamento em promastigotas e amastigotas. Os nossos resultados indicam que a variação de temperatura e do pH, além da privação de arginina, podem ser sinais importantes para regulação da expressão diferencial de *aap3*, principalmente a cópia 5.1 *aap3*, de forma a assegurar a oferta de arginina em formas promastigotas previamente à entrada no hospedeiro mamífero e em formas amastigotas, na passagem para o vetor, assegurando o sucesso da infecção.

Descritores: *Leishmania*. Proteínas de transporte. Arginina. Efeitos da temperatura.

ABSTRACT

Sales, MCOP. Regulation of expression of the amino acid transporter of *Leishmania (Leishmania.) amazonensis* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

Leishmania presents two morphologically distinct forms in its life cycle: promastigote and amastigote. The promastigotes live in the midgut of the sand fly vector under the conditions of pH 7.0 and room temperature, around 25°C. The amastigote forms are found inside the phagolysosomes of infected macrophages where they encounter an environment of acidic pH and temperature around 34°C. *Leishmania* uses the arginine to synthesize polyamines which play an important role in cell growth, differentiation and in the successful of infection. The arginine uptake in *Leishmania (L.) amazonensis* is made by an amino acid porter 3-like protein (AAP3), coded by a two copies gene (5.1 *aap3* e 4.7 *aap3*) arranged in *tandem* in the genome. The transcripts, 5.1 *aap3* and 4.7 *aap3*, present 98% of ORFs identity, but differ in the 5' and 3' UTR. The aim of this work was to evaluate if changes in temperature, pH and arginine deprivation represent signals to trigger the regulation expression of *aap3* in promastigotes and amastigotes. For this, we evaluated the transcripts level and performed assays of arginine uptake in parasites subjected to arginine starvation or supplemented with arginine, at temperatures of 25°C or 34°C and pH 7.0 or 5.0. In promastigotes we verified that the transcript 5.1 *aap3* showed higher abundance in relation to 4.7 *aap3*, and that the arginine starvation promoted an increase in the amino acid uptake when the parasites were maintained at pH 7.0 and 25°C, confirming previous data from our group. The change of temperature was an important factor to the increase of 5.1 *aap3* transcripts - in starved promastigotes, particularly when associated with pH 5.0. In addition, the increase of the temperature

led to an increase of the arginine uptake, correlated to the increase of *5.1 aap3* transcript. The amastigotes-like maintained at 25°C and pH 7.0 and submitted to the amino acid starvation reverted *5.1 aap3* expression profile to the same observed for promastigotes. However, those conditions did not favor an increase in arginine uptake. The treatment of amastigotes at 34°C and pH 7.0 facilitated the increased of arginine uptake, but did not correlated with the transcripts level. The *4.7 aap3* transcript did not change significantly in any promastigotes and amastigotes treatments. Our results indicate that variation in temperature and pH, in addition to arginine starvation may be important signals for regulating the *aap3* expression, mainly the copy *5.1 aap3*, in order to ensure the correct supply of arginine in the previous period in relation to the entry of the promastigotes into the mammalian host or to the amastigotes transition in the vector, ensuring the success of the infection.

Descriptors: *Leishmania*. Carrier proteins. Arginine. Effects of temperature.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP3	aminoácido permease (<i>amino acid porter 3-like</i>)
<i>aap3</i>	gene que codifica a aminoácido permease
cDNA	DNA complementar
Ci	Curie
cm ²	centímetro quadrado
cpm	cintilação por minuto
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
dNTPs	trifosfatos de desoxirribonucleotídeo
DO	densidade óptica
EBSS	Solução Salina Balanceada de Earle
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
<i>xg</i>	aceleração da gravidade ($\sim 9,8 \text{ m/s}^2$)
g	grama
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N-2- ácido etanosulfônico
IPTG	isopropil β -D-tiogalactosídeo
kb	kilobase
L	litro
m	massa
M	molar
mg	miligrama
mmol	milimol
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ORF	fase aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)

ng	nanograma
nm	nanômetro
mCi	milicurie
pb	par de base
ppm	partes por milhão
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
RPM	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
T'm	temperatura de associação
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade
UTR	região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
v	volume
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranoside
μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micromêtro
°C	grau Celsius

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Representação esquemática do ensaio de privação em diferentes condições de temperatura e pH.

Figura 2 – Curva de calibração em qPCR do fragmento que codifica o gene normalizador *gapdh*.

Figura 3 - Curva de calibração em qPCR do fragmento que codifica a cópia do gene *5.1 aap3*.

Figura 4 - Curva de calibração em qPCR do fragmento que codifica a cópia do gene *4.7 aap3*.

Figura 5 - Mudança de pH 7,0 para pH 5,0 a 25°C não modula o transportador de arginina *5.1 aap3* em *L. (L.) amazonensis*.

Figura 6 - Mudança de temperatura de 25°C para 34°C modula a expressão da cópia *5.1 aap3* em ambos pH's durante a privação de aminoácido.

Figura 7 - Comparação da expressão relativa do número de cópias do transcrito *5.1 aap3* em promastigotas em diferentes condições de pH e temperatura, submetido ou não à privação de arginina.

Figura 8 - Transportador de arginina *4.7 aap3* de *L. (L.) amazonensis* é pouco modulado em diferentes condições de pH a 25°C.

Figura 9 - Transportador de arginina *4.7 aap3* de *L. (L.) amazonensis* não é modulado em diferentes condições de temperatura pH a 34°C.

Figura 10 – Expressão relativa do número de cópias do transcrito *4.7 aap3* em promastigotas mantidas em pH 7,0 ou pH 5,0 a 25°C ou 34°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina.

Figura 11 – Detecção por PCR convencional de mRNA que codifica amastina para validação de diferenciação de “amastigotas-like” de *L. (L.) amazonensis*.

Figure 12 – Privação de arginina em pH 7,0 a 25°C modula o transcrito *5.1 aap3* do transportador de arginina em formas amastigotas-like de *L. (L.) amazonensis*.

Figura 13 – Mudança do pH 5,0 para 7,0 a 34°C não favorece aumento do número de cópias de *5.1 aap3*.

Figura 14 – Comparação da expressão relativa do número de cópias do transcrito 5.1 *aap3* em amastigotas-like submetidos a todos os tratamentos.

Figura 15 – Expressão do mRNA 4.7 *aap3* em formas amastigotas-like é pouco modulado nas condições de pH 5,0 ou pH 7,0 a 25°C.

Figura 16 – Número de cópias do transcrito 4.7 *aap3* é pouco modulado nas diferentes condições de pH e temperatura a 34°C.

Figura 17 – Expressão relativa do mRNA 4.7 *aap3* mostram pequena variação entre os tratamentos em diferentes pH s e temperaturas.

Figura 18 – A velocidade de tomada de arginina a 25°C e pH 7,0 é maior em promastigotas privados do aminoácido por 4 horas.

Figura 19– Privação de arginina promoveu o aumento da tomada de arginina em promastigotas mantidos a 25°C e pH 5,0.

Figura 20 – Elevação da temperatura favoreceu o aumento da tomada de arginina em formas promastigotas a 34°C e pH 7,0 e a privação de arginina não promoveu o aumento da tomada do aminoácido.

Figura 21 – Variação do pH de 7,0 para 5,0 a 34°C não promoveu o aumento da tomada de arginina em promastigotas privados ou suplementados com arginina.

Figura 22 – Efeito da variação de pH e temperatura na velocidade de transporte de arginina em promastigotas.

Figura 23 – Amastigotas mantidas a condições de pH e temperatura de formas promastigotas retomam maior tomada de arginina quando associada à privação do aminoácido.

Figura 24 – Mudança do pH para 5,0 a 25°C aumenta a tomada de arginina em amastigotas-like independentemente da privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) com arginina.

Figura 25 – Aumento da temperatura para 34°C não modifica o perfil de tomada de arginina em amastigotas-like privadas ou não do aminoácido.

Figura 26 – Mudança de pH para 5,0 a 34°C, não promoveu aumento da atividade do transportador em amastigotas-like submetidas a privação em comparação as amastigotas-like suplementadas com o aminoácido.

Figura 27 – Mudança da temperatura e pH não alteram a velocidade de tomada de arginina em 10⁷ amastigotas-like privadas (-ARG) ou suplementadas (+ARG) por

4 horas entre os tratamentos em pH 7,0 ou 5,0 associadas a temperatura de 25°C ou 34°C.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados para reações de PCR convencional, qPCR e sequenciamento

Tabela 2 - Condições de PCR para os oligonucleotídeos usados

Tabelas 3 - Componentes do Meio EBSS usado em ensaios de privação e transporte de arginina

Tabela 4 – Composição de arginina em meios de cultura usados para diferenciação e manutenção de formas amastigotas-like de *L.(L.) amazonensis*

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Leishmania spp.....	19
1.2	Ciclo de vida	20
1.3	Microambientes e sinalização	21
1.4	Regulação da expressão gênica.....	22
1.5	Arginina.....	25
1.6	Tomada de arginina.....	25
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral.....	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Organismos	33
3.1.1	Cultivo de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> (MHOM/BR/1973/M2269).....	33
3.1.2	Cultivo de formas amastigotas-like de <i>L. (L.) amazonensis</i>	33
3.1.3	Diferenciação de amastigotas-like de <i>L. (L.) amazonensis</i>	34
3.1.4	Cultivo de bactérias <i>E. coli</i> SURE	34
3.1.5	Vetor de clonagem	35
3.2	Manipulação de ácidos nucleicos	35
3.2.1	Extração de DNA genômico de promastigotas de <i>Leishmania</i>	35
3.2.2	Extração de RNA total	36
3.2.3	Transcrição reversa	37
3.2.4	Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	38
3.2.5	Oligonucleotídeos	38
3.2.6	Eletroforese de DNA.....	39
3.2.7	Eluição de DNA de gel de agarose	40
3.3	Clonagem molecular e preparo de curva padrão para qPCR	41
3.3.1	Preparação de bactérias competentes e transformação	41

3.3.2	Ligação de fragmentos de DNA em pGEM®-T Easy	42
3.3.3	Extração de DNA plasmídeo.....	42
3.3.4	Clivagem de DNA com endonucleases.....	43
3.3.5	Determinação da sequência de nucleotídeos de DNA	43
3.3.6	Curva padrão qPCR	44
3.3.7	Reação de qPCR.....	44
3.4	Ensaio de privação de arginina	44
3.5	Tomada de arginina	46
3.6	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	49
4.1	Padronização das curvas de quantificação de PCR em tempo real.....	49
4.2	Expressão dos transcritos de <i>aap3</i> em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	52
4.2.1	Obtenção de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> para quantificação dos transcritos de <i>aap3</i>	52
4.2.2	Análise dos transcritos 5.1 <i>aap3</i> de promastigotas em relação à mudança de pH.....	52
4.2.3	Análise dos transcritos 5.1 <i>aap3</i> em promastigotas em relação à mudança de temperatura.....	54
4.2.4	Análise da expressão do transcrito 4.7 <i>aap3</i> em promastigotas em relação a diminuição do pH.....	57
4.2.5	Análise dos transcritos 4.7 <i>aap3</i> em promastigotas em relação à mudança de temperatura.....	58
4.3	Expressão dos transcritos de <i>aap3</i> em formas amastigotas-like de <i>L. (L.) amazonensis</i>	60
4.3.1	Obtenção de amastigotas-like em cultura.....	60
4.3.2	Análise da expressão do transcrito 5.1 <i>aap3</i> em amastigotas-like.....	63
4.3.3	Análise da expressão do transcrito 4.7 <i>aap3</i> em amastigotas-like.....	67
4.4	Regulação da tomada de arginina em <i>L. (L.) amazonensis</i>	71
4.4.1	Análise da tomada de arginina em formas promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i>	71

4.4.2	Análise da tomada de arginina em formas amastigotas-like em <i>L.(L.) amazonensis</i>	76
5.	DISCUSSÃO	82
6.	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS.....	95

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* spp.

Leishmaniose é o nome genérico dado a uma série de quadros clínicos que acomete cerca de 350 milhões de pessoas no mundo (Kaye and Aebischer 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014), há uma população sob o risco de contrair leishmaniose, vivendo em áreas de transmissão em 88 países da África, Ásia, América e Europa, com a possibilidade de 1,3 milhão de novos casos anualmente e com 20.000 a 30.000 óbitos anuais. Dependendo da espécie do parasito e de fatores biológicos do hospedeiro, como a resposta imune, há o desenvolvimento de quadros clínicos na forma cutânea, mucocutânea ou visceral (McConville and Naderer 2011).

Os protozoários do gênero *Leishmania*, identificados primeiramente por Ross (Ross 1903) são parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São subdivididos em dois subgêneros, de acordo com o comportamento observado dentro do trato digestório do inseto vetor. Os protozoários que se desenvolvem obrigatoriamente na porção posterior do tubo digestório foram agrupados no subgênero *Leishmania* (*Viannia*), correspondendo, entre outras, às espécies *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) shawi*. As espécies cujo desenvolvimento ocorre ao longo das porções média e anterior do trato digestório do vetor foram agrupadas no subgênero *Leishmania* (*Leishmania*), sendo exemplo as espécies: *L. (L.) mexicana*; *L. (L.) donovani*; *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* (Lainson 2010). Os organismos dos subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* parasitam exclusivamente mamíferos. Há

um terceiro subgênero que compreende parasitos de lagartos, *Leishmania* (*Sauroleishmania*).

1.2 Ciclo de vida

O parasito apresenta-se em duas formas no seu ciclo de vida: a forma amastigota, que se desenvolve no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado, apresenta uma morfologia ovalada, sem flagelo aparente, de tamanho entre 2 e 6 μm de extensão e 1,5 e 3 μm de largura; e a forma promastigota, que tem como características um flagelo bem visível, um corpo fusiforme de cerca de 1,5 μm de largura e 20 μm de comprimento e é encontrada, livre, no tubo digestório do inseto vetor (Rey 1992).

Durante o ciclo de vida, a fêmea do inseto vetor hematófago da sub-família Phlebotominae alimenta-se do sangue do vertebrado ingerindo macrófagos contendo as formas amastigotas no interior de seus vacúolos parasitóforos. Assim, no interior do tubo digestório do inseto esses macrófagos são rompidos e essas formas amastigotas se diferenciam em promastigotas multiplicando-se por divisão binária. Ao esgotar o alimento, as promastigotas ditas procíclicas, deslocam-se para as porções anteriores do esôfago e do proventrículo, diferenciando-se em formas promastigotas metacíclicas. Em um próximo repasto sanguíneo essas formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas para o hospedeiro vertebrado. Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas infectivas são fagocitadas por macrófagos onde se diferenciam em amastigotas. Esses macrófagos infectados, em determinado momento podem sofrer a lise celular e amastigotas liberadas podem infectar novos macrófagos. Ou macrófagos infectados podem ser ingeridos pelo vetor dando continuidade ao ciclo.

1.3 Microambientes e sinalização

Em organismos cuja relação ecológica evoluiu ao parasitismo a dinâmica patógeno - hospedeiro proporcionou uma matriz de co-evolução em que emissão e recepção de sinais foram estreitadas de forma a manter a sobrevivência de ambos organismos (Lukes, Skalicky et al. 2014).

Nesse sistema de alternância entre o inseto e o mamífero, a *Leishmania* é capaz de sobreviver em dois ambientes distintos e bem caracterizados. Em seu ciclo de vida o protozoário se encontra em pequenos microambientes: a saber, dentro do trato digestório do flebotomíneo ou no interior dos macrófagos no hospedeiro vertebrado. Dessa forma, mudanças de pH, pela alternância do tubo digestório do inseto (pH 7,0 - 7,5) para um pH ácido (pH 4,5 - 5,0) dos fagolisossomos dos macrófagos, e também, a variação de temperatura de 22°C - 28°C do inseto para 31°C - 35°C de temperatura em lesões na pele do hospedeiro mamífero (Zilberstein and Shapira 1994).

O parasito é capaz de reconhecer as mudanças entre os ambientes, responder e se adaptar a essas para a manutenção de sua sobrevivência. Um exemplo dessa estreita adaptação no gênero *Leishmania* é a diferenciação de formas e a variação em sua expressão gênica.

A diferenciação de promastigotas em amastigotas, e vice-versa, favorece a sobrevivência do parasito em cada hospedeiro de acordo com o perfil dos microambientes em que se encontra (Lukes, Skalicky et al. 2014). É possível observar mudanças na expressão gênica na mesma forma de vida ao longo das fases de crescimento. É sabido que durante o crescimento das formas promastigotas há alterações na expressão do gene *meta - 1* para o desenvolvimento de formas promastigotas metacíclicas (Nourbakhsh, Uliana et al. 1996). Ao longo dos estágios de desenvolvimento ocorre também regulação diferencial de genes entre as formas amastigotas, promastigotas replicantes (procíclicos) e promastigotas não replicantes ou infectivos (metacíclicos) (Almeida, Gilmartin et al. 2004; Holzer, McMaster et al. 2006; Rochette, Raymond et al. 2009). Além disso há modificações na expressão de

genes que são regulados estágio-específico, em amastigotas e promastigotas, que são utilizados como critério de caracterização da diferenciação entre as formas de vida da *Leishmania*, um exemplo disto é a proteína de superfície amastina (Wu, El Fakhry et al. 2000; Rochette, McNicoll et al. 2005). Ainda assim pode haver genes regulados diferentemente entre espécies diferentes (Alcolea, Alonso et al. 2010). E ainda podem ocorrer fosforilações de motivos de proteínas específicas em determinada fase de vida do parasito (Tsigankov, Gherardini et al. 2013).

Na literatura, existem relatos de várias alterações protéicas na composição da membrana plasmática do parasito. A proteína GP63, que participa da defesa à lise pelo sistema complemento; proteínas expressas diferencialmente entre as fases de crescimento ou infectiva da *Leishmania*, como a proteína GP46, que apresenta níveis maiores de mRNA em formas promastigotas durante a fase estacionária em relação a fase logarítmica de crescimento (Beetham, Myung et al. 1997). Além disso, glicolípídeos de membrana, como GIPLs (glicosil inositol fosfolípídeos) que podem ser variavelmente regulados ao longo do ciclo de vida (Schneider, Rosat et al. 1993).

1.4 Regulação da expressão gênica

A *Leishmania* apresenta peculiaridades na organização de seu genoma e na regulação da expressão gênica. Seu genoma está organizado e distribuído em cerca de 36 cromossomos, que podem ter seu arranjo variado de acordo com a espécie (Britto, Ravel et al. 1998). Possui como característica a ausência de cromatina condensada durante o ciclo celular (Wincker, Ravel et al. 1996; Britto, Ravel et al. 1998), transcrição policistrônica e processamento de mRNAs através do *trans-splicing* (Agabian 1990; Mayer and Floeter-Winter 2005; Haile and Papadopoulos 2007; Requena 2011; Kramer 2012).

De uma maneira geral, os genes codificadores de proteínas estão organizados em grandes blocos gênicos. Nota-se a ausência de introns e também a ausência de uma sequência promotora de transcrição de RNA polimerase II, antecedendo cada gene. A transcrição é contínua, iniciando em pontos específicos do genoma, de forma que

todo o bloco de genes que se encontra a jusante desse ponto, na mesma fita de DNA, seja transcrito continuamente de maneira unidirecional. Dependendo do cromossomo, essa transcrição pode ser centrípeta ou centrífuga (Myler and Stuart 2000). A transcrição inicia-se a partir de uma sequência reconhecida pela RNA polimerase II, que não tem motivos característicos de uma região promotora, e em seguida os genes adjacentes são transcritos seguindo as suas orientações em cada uma das fitas do DNA. Essas informações induzem a um processo de transcrição policistrônica (Haile and Papadopoulos 2007; Requena 2011).

Em uma análise geral do genoma de *Leishmania*, alguns genes são encontrados em cópias múltiplas, organizadas em “*tandem*”, contudo também ocorrem alguns genes em cópia única. Suas fases abertas de leitura (Torfs, Bateson et al.) apresentam altos graus de conservação de sequência e as principais diferenças ocorrem nas regiões 5’ e 3’ não traduzidas. Por exemplo, os genes codificantes do transportador de arginina em *Leishmania donovani* (LdAAP3) (36), ou do transportador catiônico ATPase (Requena 2011).

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos é predominantemente pós-transcricional, ocorrendo nos processos de *trans-splicing* (maturação e edição do transcrito) e na estabilidade do mRNA (regulando a meia-vida da molécula), mas há também regulação na tradução e modificações pós-traducionais (Mishra, Holzer et al. 2003; Requena 2011).

O transcrito precursor (pré-mRNA) é submetido à ação de um conjunto de pequenos RNAs e proteínas que formam o complexo do spliceossomo (Gunzl 2010). Esse complexo é responsável pelo processamento do pré-mRNA em tripanossomatídeos através do processo denominado *trans-splicing* (Ivens, Peacock et al. 2005; Gunzl 2010). A conversão dos RNA policistrônicos nucleares em mRNA maduros ocorre com dois processos. Em um primeiro momento ocorre o *trans-splicing*, que corresponde a duas reações simultâneas de transesterificação que culminam com a adição, na região 5’ do pré-mRNA, de uma sequência de nucleotídeos (39 nt) conhecida como mini-exon. Esse pequeno RNA é derivado de da molécula de RNA de 135-147 nucleotídeos, o SL-RNA (*spliced leader RNA*) que contém o mini-exon na região 5’ terminal e um resíduo de GU (guanidina e uracila)

no início do intron que se segue em direção à extremidade 3' (LeBowitz, Smith et al. 1993). Além disso, o mini-exon apresenta em sua extremidade 5' uma estrutura conhecida como *cap 4*, que compreende quatro resíduos de 7-metilguanosina (m^7G), sendo então responsável pelo *capping* do mRNA (Bangs, Crain et al. 1992). O segundo processo compreende a adição, na região 3' do pré-mRNA, de uma sequência de adeninas (poliadenilação) conhecida como cauda poli (A). Na verdade os dois processos estão associados, sendo que a poliadenilação de um mensageiro à jusante de um pré-mRNA ocorre primeiramente ao *trans-splicing* do mRNA à montante (LeBowitz, Smith et al. 1993).

A adição do mini-exon SL-RNA e da cauda poli (A), que resultam na individualização do mRNA, acontecem após um processo de “dobramento” de acordo com sinalizações nos sítios específicos na molécula do pré-mRNA. Na porção 5' da molécula do pré-mRNA há um sítio de *splicing* marcado pela presença de uma extensão de polipirimidinas (adenosinas e guanidinas). Também nessa região 5' encontra-se um resíduo de adenosina (A) que é usado como o âncora durante as reações do *trans-splicing*, da mesma maneira que ocorre em um *cis-splicing* clássico. A primeira reação ocorre com a reação nucleofílica do resíduo GU (do SL-RNA) com o resíduo de adenosina âncora que gera uma configuração em forma de “Y”, apresentando uma região terminal 3'-OH livre, que libera o fragmento *cap*-mini-exon para a segunda reação. Essa, por sua vez, compreende a interação da extremidade 3'-OH livre com o fosfato presente no sítio 3' de *splicing* na molécula do pré-mRNA acarretando no deslocamento da estrutura intermediária em forma de “Y” formada e a junção das sequências maduras (Mayer and Floeter-Winter 2005; Gunzl 2010).

Assim, o mRNA maduro é exportado para o citoplasma, onde ocorrerão modificações pós-transcricionais relacionadas à estabilidade e possíveis ligações de proteínas às regiões 3'UTR sinalizando para modulação individual do mRNA que durante o processo de tradução atuarão na expressão e regulação gênica dessa molécula (Clayton and Shapira 2007).

1.5 Arginina

A arginina é um aminoácido catiônico semi-essencial para o homem, sendo necessária sua suplementação pela dieta (Wu and Morris 1998). Protozoários do gênero *Leishmania* utilizam arginina na via de síntese de poliaminas que desempenha papel fundamental no crescimento e diferenciação celular.

As enzimas arginase e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) usam o mesmo substrato, o aminoácido arginina. No macrófago, a iNOS utiliza a arginina como substrato para a produção de óxido nítrico (Hibbs, Taintor et al. 1987; Ivens, Peacock et al.), que atua contra o parasito no processo conhecido como “burst” oxidativo (Qadoumi, Becker et al. 2002; Kropf, Fuentes et al. 2005). De outro lado, a enzima arginase, presente tanto no macrófago como no parasito, catalisa a reação de conversão de arginina em ornitina e uréia. O aminoácido participa do ciclo da uréia e apresenta importante papel durante a infecção por *Leishmania*, favorecendo a biossíntese de poliaminas (Wanasen, MacLeod et al. 2007; Balana-Fouce, Calvo-Alvarez et al. 2012; da Silva and Floeter-Winter 2014).

A ornitina é importante para o crescimento, diferenciação e biossíntese de poliaminas, como espermidina e putrescina para o parasito e consequentemente para estabelecimento da infecção (Tabor and Tabor 1984; Roberts, Tancer et al. 2004; Hasne and Ullman 2005; Darlyuk, Goldman et al. 2009). Portanto, a arginina é considerada um aminoácido importante na relação patógeno-hospedeiro, uma vez que participa das várias vias metabólicas (Darlyuk, Goldman et al. 2009; Balana-Fouce, Calvo-Alvarez et al. 2012).

1.6 Tomada de arginina

A constatação da importância do aminoácido arginina na infecção torna interessante conhecer o caminho desse aminoácido desde a tomada pelo macrófago até seu uso pelo parasito. Foi descrito um transportador de arginina na membrana do

macrófago, “*cationic aminoacidic transporter 2B*” (CAT-2B) (Closs, Simon et al. 2004) e também um transportador para o mesmo aminoácido na membrana plasmática de *Leishmania*: aminoácido permease (amino acid porter 3-like; *AAP3*) (Darlyuk, Goldman et al. 2009).

A arginina juntamente com ornitina e lisina, é captada externamente por um mecanismo transmembrana independente de íons Na^+ através de uma molécula transportadora, CAT-2B nos macrófagos de hospedeiros vertebrados. Esse transportador pertence à família y^+ , composta de quatro membros: CAT-1, CAT-2 (CAT-2A e CAT-2B expressos por duas variantes de *splicing alternativo*), CAT-3, CAT-4. Na relação patógeno-hospedeiro, o CAT-2B representa a principal entrada de arginina nos macrófagos (Wanasen, MacLeod et al. 2007; Balana-Fouce, Calvo-Alvarez et al. 2012).

O transportador de arginina *AAP3*, que integra a família ácido/auxina amino permeases, foi primeiramente caracterizado em formas promastigotas de *L. donovani* (Ld *AAP3*). Esse transportador exibe 480 aminoácidos com 11 domínios *trans*-membrana em sua constituição, mas, apresenta apenas 20% de identidade com o sistema de transporte de aminoácidos de mamíferos (Shaked-Mishan, Suter-Grotemeyer et al. 2006). Além disso, o transportador de *L. donovani* é codificado por um gene presente em duas cópias em *tandem* no genoma e apresenta três transcritos que diferem pelo tamanho e pela região 3'UTR. Além de ser capaz de responder a condições de privação de arginina tanto em nível de expressão do seu transcrito como na medida da atividade (Darlyuk, Goldman et al. 2009).

O gene que codifica *AAP3* em *L. (L.) amazonensis* foi caracterizado em nosso laboratório e os resultados indicaram a presença de duas cópias do gene, organizada em *tandem* no genoma, que foram denominadas 5.1 *aap3* e 4.7 *aap3*, de acordo com o tamanho do transcrito (5100 e 4700 nucleotídeos, respectivamente). Esses transcritos apresentam 98% de similaridade entre as respectivas ORF's e 93% de similaridade com a ORF de Ld *AAP3*. No entanto, as duas cópias transcritas em *L. (L.) amazonensis* diferem tanto pela região 5'UTR quanto pela região 3'UTR (Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. 2011).

A análise de transcritos de *L. (L.) amazonensis* submetidos a ensaios de privação do aminoácido arginina, nas diferentes fases de crescimento *in vitro* de promastigotas (1-10 dias de cultura), mostrou que na fase estacionária da cultura, o transcrito da cópia 5.1 *aap3* responde à privação com um aumento em número de cerca de três ordens de grandeza em relação aos transcritos da cópia 4.7 *aap3*. O aumento do transcrito correlaciona com um aumento na taxa de tomada do aminoácido (Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. 2011).

Além disso, também foi mostrado que mutantes de *L. (L.) amazonensis*, nocaute-nulo de arginase (*arg⁻*) e mutantes geneticamente complementados com a ORF da arginase sem o sinal de endereçamento para o glicossomo (*arg⁻/+argΔSKL*) apresentam alta concentração de arginina interna, comparados aos parasitos selvagens ou complementados com a ORF com sinal de endereçamento para glicossomo (*arg⁻/+ARG*). Em ensaios de privação de arginina, aqueles mutantes diminuem a taxa de tomada de arginina, o que não acontece com o parasito selvagem nem com o mutante *arg⁻/+ARG*. Assim, concluiu-se que tanto a concentração externa como a concentração interna do aminoácido podem regular a expressão do transportador e a tomada do aminoácido (Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. 2011).

Durante o ciclo de vida da *Leishmania* a alternância entre trato digestório do flebotomíneo e interior dos macrófagos no hospedeiro vertebrado leva a uma alternância de condições ambientais. Dentro do vetor, as formas promastigotas procíclicas sofrem processo de diferenciação para a forma promastigota metacíclica ao migrarem para a região da probóscide (Bates 2007). Assim na região da probóscide as formas metacíclicas se deparam com uma condição de privação de aminoácidos, entre eles a arginina (Shaked-Mishan, Suter-Grotemeyer et al. 2006; Darlyuk, Goldman et al. 2009; Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. 2011). Ainda é importante notar que nessas condições ambientais do vetor a presença de formas promastigotas está em meio alcalino e na temperatura ambiente de 22°C – 28°C (Zilberstein and Shapira 1994).

Em seguida, dando continuidade ao ciclo, as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo do vetor são transmitidas para a pele do vertebrado.

Nesse momento, inicialmente ocorre a variação de temperatura de 25°C para 34°C quando as formas metacíclicas são inoculadas. Uma vez em contato com o tecido epitelial, essas formas são fagocitadas por uma variedade de células hospedeiras de defesa, entre essas a principal é o macrófago. Posteriormente à fagocitose, o parasito se depara com a formação de um compartimento sub-celular, o fagossomo. (McConville and Naderer 2011).

Após a formação do vacúolo parasitóforo, que tem em seu envoltório porção da membrana plasmática do macrófago, essa vesícula sofre remodelação através de sua maturação e fusão com organelas endocíticas, como endossomos tardios e/ou vesículas lisossomais, resultando assim na formação do fagolisossomo. Durante esse tempo, a modificação do pH também acontece. Após a fusão dessas vesículas ao fagossomos, o pH do meio torna-se ácido com a presença de várias enzimas com atividades de hidrolases (Antoine, Prina et al. 1998). Nessas condições de pH ácido e temperatura entre 34°C e 37°C, ocorre a diferenciação de promastigotas para amastigotas (Barak, Amin-Spector et al. 2005). Nessa fase todos os sinais ambientais para diferenciação das formas já estão completos, e isso acontece para maior probabilidade de sobrevivência a esse microambiente de formas de *Leishmania* mais adaptadas a essas condições (Burchmore and Barrett 2001). Ainda nesse microambiente no interior do fagolisossomo de macrófago do vertebrado, a captação e utilização de arginina é importante para direcionar o estabelecimento ou não da infecção (Wanasen and Soong 2008; Balana-Fouce, Calvo-Alvarez et al. 2012).

As variações de pH, temperatura e oferta de nutrientes (aminoácido) comum ao ciclo de vida de *Leishmania* podem ser uma sinalização capaz de disparar mudanças em sua expressão gênica. Sabendo disso, avaliar a expressão de *AAP3* e a tomada de arginina em promastigotas e amastigotas torna-se interessante para conhecimento fisiológico da infecção e do parasito.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho está baseado na hipótese de que mudança de pH e temperatura possam gerar sinais que iniciem a diferenciação da forma promastigota para amastigota e que, tal qual a disponibilidade de arginina, também devam regular a expressão de *aap3* de *L. (L.) amazonensis*.

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão dos transcritos dos genes *5.1 aap3* e *4.7 aap3* em *L. (L.) amazonensis* mantidos em pH 7,0 ou 5,0 e nas temperaturas de 25°C ou 34°C durante a privação de arginina.

2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar a expressão dos transcritos dos genes *5.1 aap3* e *4.7 aap3* na fase log de crescimento de formas promastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*.

Avaliar se mudanças de pH, temperatura, assim como a disponibilidade de arginina, alteram a expressão dos transcritos dos genes *5.1 aap3* e *4.7 aap3* na fase log de crescimento de formas promastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*.

Caracterizar a expressão dos transcritos dos genes *5.1 aap3* e *4.7 aap3* na forma amastigota axênica de *L. (L.) amazonensis*.

Avaliar se mudanças de pH, temperatura e disponibilidade de arginina alteram a expressão dos transcritos dos genes *5.1 aap3* e *4.7 aap3* em formas amastigotas-like e promastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*.

Verificar como se dá a tomada de arginina em promastigotas diferentes pH's e temperaturas, em parasitos submetidos ou não à privação de aminoácidos.

Verificar como se dá a tomada de arginina em amastigotas-like diferentes pH's e temperaturas, em parasitos submetidos ou não à privação de aminoácidos.

Correlacionar a tomada de arginina com os níveis de mRNA de seu transportador.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos

Foi utilizada a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) e a bactéria *Escherichia coli* SURE TM (Stratagene, La Jolla, Califórnia, EUA).

3.1.1 Cultivo de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/ M2269)

As formas promastigotas foram mantidas em Meio M199 (GIBCO) a 25°C suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) em garrafas de cultura de 25 cm². As culturas foram repicadas pela inoculação de 5x10⁶ células em 10 mL de meio, a cada sete dias.

As células foram contadas, adicionando-se 50 µL de promastigotas da cultura em 950 µL de PSB-formaldeído a 10% e 19 mL de azida sódica (diluição de 20 x) em aparelho “Coulter ZTM Series” (Coulter).

3.1.2 Cultutivo de formas amastigotas-like de *L. (L.) amazonensis*

As células promastigotas em fase estacionária de crescimento foram coletadas e submetidas ao processo de diferenciação em amastigotas-like, descrito abaixo. As culturas de amastigotas-like eram preparadas para cada experimento.

3.1.3 Diferenciação para amastigotas-like de *L. (L.) amazonensis*

A diferenciação de formas promastigotas em formas amastigotas-like e a manutenção de amastigotas-like axênicas foram realizadas conforme adaptações dos protocolos da literatura (Bates, Robertson et al. 1992; Zilberstein and Shapira 1994; Hodgkinson, Soong et al. 1996; Balanco, Pral et al. 1998; Saar, Ransford et al. 1998; Gupta, Goyal et al. 2001; Teixeira, de Jesus Santos et al. 2002; Barak, Amin-Spector et al. 2005; Bahrami, Hatam et al. 2011).

Para cada experimento, 5×10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento foram coletadas e mantidas a 34°C em atmosfera de 5% CO₂, em 10 mL de meio M199 suplementado com 25% de SFB, 5 ppm de hemina, 100 µM adenina, 50 U de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, tampão Hepes-NaOH 40 mM e NaHCO₃ 12 mM, pH 5,5 (modificação de pH com adição de HCl 1M). Em seguida as células foram incubadas em 34°C em atmosfera de 5% CO₂ por quatro dias.

Para a contagem, as células foram coletadas a 3824 xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com ajuda da pipeta e as células foram ressuspensas em 1 volume de PBS 1X estéril (tampão fosfato – salino; 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,44 g de Na₂HPO₄; 0,24 g de KH₂PO₄; água q.s.p para 1L; pH 7,4 acertado com HCl). Em seguida foi adicionado às células 1 volume de Trypan Blue (stain 0,4% - Gibco BRL) seguindo-se a posterior visualização em microscopia de luz (Nikon Eclipse E200) e contagem em câmara de Neubauer, computando-se apenas as células vivas, coradas em azul.

3.1.4 Cultivo de bactérias *E. coli* SURE

As bactérias foram cultivadas a 37°C em meio SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl, 0,186 g de KCl 1M, 2,05 g de MgCl₂.6H₂O, 2,45 g de MgSO₄.7H₂O para 1L de água destilada). O meio sólido foi preparado com 1,5% de ágar com ampicilina a 100 µg/mL. Para selecionar clones transformados

utilizou-se IPTG a 15 µg/mL, ampicilina a 100 µg/mL e X-GAL a 70 µg/mL (diluído em N-dimetilforfamida).

3.1.5 Vetor de clonagem

Foi utilizado o plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega), clivado com *EcoRV* contendo uma timina adicionada às extremidades 3', para ligação de produtos de PCR.

3.2 Manipulação de ácidos nucleicos

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

Aproximadamente 5×10^9 promastigotas em fase estacionária de cultura foram coletadas por centrifugação a 3000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas uma vez com PBS 1X e ressuspensas em NaCl 150 mM. As células foram lisadas por gotejamento da suspensão em 4,5 mL de TES (Tris-HCl 150 mM, pH 7,5, EDTA 50 mM e 1% SDS) previamente aquecido a 65°C agitando levemente. O lisado foi tratado com pronase (200 mg/mL) a 45°C por 2 horas. Seguiu-se, então, uma extração orgânica pela adição de igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e uma pela adição de igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos, foi precipitada com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 7,0) e 2 volumes de etanol absoluto gelado. O precipitado foi enrolado em um bastão de vidro seco e ressuspendido em 0,5 mL de água. Realizou-se um tratamento com RNase A (50 µg/mL) por 1 hora a 37°C. Em seguida foram realizadas novas extrações orgânicas seguidas da precipitação do material genético, conforme descrito acima. O DNA foi ressuspendido em 0,5 mL de água. Depois a concentração e a pureza foram

determinadas em espectrofotômetro Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech ou Gene Quant *pro* (AmershamBiosciences).

3.2.2 Extração de RNA total

À mistura contendo as células em Trizol foram adicionados 200 μ L de clorofórmio e em seguida foi realizada uma agitação moderada seguido de repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi submetida à centrifugação por 14167 xg , 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo tipo “eppendorf”. Foram adicionados 500 μ L de isopropanol (gelado) e a suspensão foi tratada em vórtice e deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi colhido por centrifugação a 14167 xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com a micropipeta e centrifugado novamente a 14167 xg , a 4°C, por 5 minutos e novamente o sobrenadante excedente foi retirado.

Foi então adicionado 1 mL de etanol 75% (gelado) e a mistura foi centrifugada a 16627 xg , a 4°C, por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado com a micropipeta. Essa última centrifugação foi repetida para retirar totalmente o sobrenadante. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 10 μ L de água livre de RNase. Para o tratamento com DNase I, adicionou-se em cada amostra volume necessário de tampão 10X com $MgCl_2$, DNase I (1U/ μ L) (Fermentas), água e quantidade de RNA desejado, ajustando as condições necessárias para cada amostra e volume de reação final. A digestão ocorreu por incubação a 37°C por uma hora. Para inativar a reação foi adicionado EDTA para final 25 mM e mantido a 65°C por 10 minutos.

Após tratamento com DNase I, o volume total de reação foi acertado para 200 μ L final e foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, a mistura foi agitada e deixada em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi submetida à centrifugação por 14167 xg , 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo tipo “eppendorf”. Foi adicionado 1 volume de isopropanol (200 μ L) e 0,1 volume de acetato de amônio 5 M (20 μ L). O precipitado

foi mantido a -20°C por 1 hora ou até o dia seguinte para ser colhido por centrifugação a 14167 xg , a 4°C , por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado com a micropipeta. Procedeu-se novamente a centrifugação por 14167 xg , a 4°C , por 10 minutos e assim todo o sobrenadante poder ser retirado. Foi finalmente adicionado 1 mL de etanol 75% e novamente centrifugado a 14167 xg , a 4°C , por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Procedeu-se novamente à centrifugação por 14167 xg , a 4°C , por 5 minutos e todo o sobrenadante foi retirado. O RNA foi então deixado secar a temperatura ambiente e ressuspenso em $10\text{ }\mu\text{L}$ de água livre de RNase. Cada amostra foi então quantificada por Nanodrop®.

3.2.3 Transcrição reversa

Para a obtenção do cDNA, foi utilizado $2\text{ }\mu\text{g}$ de RNA, $2\text{ }\mu\text{L}$ de de iniciadores aleatórios (Fermentas - $0,2\text{ }\mu\text{M}$) e água livre de RNase para volume final de $40\text{ }\mu\text{L}$ para as reações positivas e $0,5\text{ }\mu\text{g}$ de RNA, $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de oligonucleotídeo randômico ($0,2\text{ }\mu\text{M}$) e água livre de RNase para volume final de $10\text{ }\mu\text{L}$ para as reações negativas. A solução foi então submetida à desnaturação do RNA a 70°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado tampão da enzima transcriptase reversa 10 X (Fermentas) e 10 mM de dNTPs e a reação foi mantida na temperatura de 15°C por 10 minutos. A enzima transcriptase reversa ($1\text{U}/\mu\text{L}$ – Fermentas) foi adicionada à reação e procedeu-se a incubação na temperatura de 37°C por 5 minutos. A associação dos iniciadores a fita molde foi realizada um passo de 25°C por 10 minutos. Em seguida a síntese de cDNA a 42°C por 60 minutos. Posteriormente, seguiu-se por 10 minutos a 70°C , para parar a reação e a amostra foi mantida a -20°C até o uso.

3.2.4 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

O fragmento alvo foi amplificado com o Kit TopTaq Master Mix - Qiagen com cada par de oligos a 20 μ M (ver Tabela 1 para composição dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho), para uma reação de 25 μ L ou 50 μ L de volume final. O protocolo padrão de ciclos utilizado foi: um tratamento inicial a 94°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos com temperatura de associação, conforme o T_m de cada par de iniciadores (ver Tabela 2) por 1 minuto, extensão a 72°C pelo tempo necessário de acordo com o tamanho esperado do produto a ser amplificado, levando-se em consideração a velocidade da *Taq* como sendo 1000 bp/minuto. No último ciclo, procedeu-se a um tratamento a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose entre 0,8% e 1,5% e estocados a 4°C.

3.2.5 Oligonucleotídeos

As sequências dos oligonucleotídeos, e sua sequência alvo, utilizados como iniciadores estão descritas na Tabela 1.

Para validar as formas *amastigotas-like*, diferenciadas conforme descrito anteriormente, foram utilizados iniciadores para a amplificação da sequência codificadora da proteína amastina. Sabendo da conservação da sequência gênica para a proteína amastina entre as espécies de *Leishmania* (McNicoll, Muller et al. 2005) a sequência dos iniciadores foi obtida a partir dos dados de Arruda (2013). Esses iniciadores desenhados para amastina em *L. infantum* foram utilizados para escanear entre os clusters do genoma de *L. (L.) amazonensis* (Real, Vidal et al. 2013) possíveis regiões codificantes de tal proteína. Assim, os iniciadores para amplificação do fragmento codificante para a proteína em *L. amazonensis* foram desenhados para amplificar a região de menor polimorfismo entre as sequências das duas espécies de *Leishmania*.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para reações de PCR convencional, qPCR e sequenciamento:

Oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'	Amplificar
5U1KFoward	5'GGTCCCCGATACACACATTC 3'	5'UTR 5.1 <i>aap3</i>
5U1KReverse	5' GTCTCCCGTTTTGCAAGAGA 3'	5'UTR 5.1 <i>aap3</i>
5U500Foward	5'ACCATTGTGGGTTAGTTATACATCC3'	5UTR 4.7 <i>aap3</i>
5U500Reverse	5' CAAGATCGCTAGCAGTGGAG 3'	5'UTR 4.7 <i>aap3</i>
T7	5' ATTATGCTGAGTGATATCCC 3'	sequenciamento
SP6	5' AAGATATCACAGTGGATTTA 3'	sequenciamento
GAPDHReal F	5' TCAAGGTCGGTATCAACGGC 3'	<i>Real-time</i>
GAPDHReal R	5' TGCACCGTGTCGTACTTCAT 3'	<i>Real-time</i>
Amastina F	5' GTGCGTTGTGTGGGCGGCCA 3'	<i>Real-time/região homóloga proteína L. amazonensis</i>
Amastina R	5' TGCCGGCTTCGTTCTCTTTGT 3'	<i>Real-time/região homóloga proteína L. amazonensis</i>

3.2.6 Eletroforese de DNA

A porcentagem de agarose, entre 0,8% e 1,5%, no gel de fracionamento foi escolhida levando-se em conta o tamanho dos fragmentos a serem analisados. O gel foi preparado e mantido em tampão 1 X TAE (40 mM Tris-acetato e 0,1 M EDTA) com adição de 2,5 µg/L de brometo de etídio antes do uso. O fracionamento se deu

pelo estabelecimento de uma diferença de potencial, a 90 Volts, pelo tempo do corante azul de bromofenol migrar 2/3 do gel. Após o fracionamento, o material foi visualizado através de iluminação ultravioleta em um *trans*-iluminador e a imagem foi registrada com o auxílio de uma máquina fotográfica Canon, acoplada ao *trans*-iluminador.

Tabela 2 - Condições de PCR para os oligonucleotídeos usados:

Par de oligonucleotídeos	Temperatura de associação (°C)	Tempo de extensão (segundos)
5U1KF + 5U1KR	56,1	30 (PCR convencional) e 60 (PCR <i>Real-Time</i>)
5U500F + 5U500R	60,5	30 (PCR convencional) e 60 (PCR <i>Real-Time</i>)
GAPDHRealF + GAPDHReal R	61,0	30 (PCR convencional) e 60 (PCR <i>Real-Time</i>)
Amastina F + Amastina R	63,7(PCR convencional) 60,0(<i>Real-time</i>)	30 (PCR convencional) e 60 (PCR <i>Real-Time</i>)

3.2.7 Eluição de DNA de gel de agarose

A região do gel contendo o DNA a ser eluído foi recortada com uma lâmina. A eluição foi feita através do kit QIAquick Gel Extraction Kit conforme instruções do fabricante.

3.3 Clonagem molecular e preparo de curva padrão para qPCR

3.3.1 Preparação de bactérias competentes e transformação

Bactérias *E.coli* SURE foram inoculadas em 10 ml de meio SOB líquido e incubadas a 37°C sob agitação de 250 RPM “over-night”. Esses 10 mL foram adicionados a 100 mL de meio SOB líquido, incubados nas mesmas condições de temperatura e agitação até atingir D.O entre 0,4 a 0,6 (A595 nm). Em seguida todo o volume da cultura foi distribuído em tubo de 50 mL e mantido em gelo por 10 minutos. A cultura foi então centrifugada a 885 *xg* a 4°C por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. As bactérias foram ressuspensas em um terço do volume inicial com FSB (*Frozen Storage Buffer* – tampão de armazenamento congelado - 10 µL de acetato de potássio; 100 g de glicerol; 7,4 g de KCl; 7,29 g de MnCl₂. 2H₂O; 1,5 g de CaCl₂.2H₂O; 0,8 g de hexamine cobalto III cloreto; pH 6,4) e mantidas em gelo por 10 minutos. Foi realizada nova centrifugação a 885 *xg*, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1/12,5V de FSB adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) para uma concentração final de 3,5% seguida de uma homogeneização imediata. Após mantidas em gelo por 5 minutos foi adicionado DMSO para uma concentração final de 7% e novamente foram incubadas em gelo por 10 minutos. Finalmente as células foram distribuídas em alíquotas de 200 µL e colocadas em banho de gelo-seco etanol e após congelamento foram estocadas a -80°C.

As bactérias foram transformadas por choque térmico. No primeiro passo as bactérias foram mantidas em gelo por 10 minutos. Em seguida foram incubadas a 42°C por 30 segundos e rapidamente foram colocadas em gelo por 2 minutos. Após, foram adicionados 800 µL de meio SOB líquido sem antibiótico e foram incubadas por 1 hora a 37°C. Posteriormente, 100 µL deste preparado foi plaqueado em placas de meio SOB sólido e incubadas novamente a 37°C por 12 a 16 horas.

3.3.2 Ligação de fragmentos de DNA em pGEM®-T Easy

O protocolo de clonagem foi realizado usando o kit pGEM®-T Easy Vector Systems – Promega, respeitando a relação de concentração de extremidade de fragmentos de vetor (10 ng ou 50 ng) e inserto (produto de PCR e/ou fragmento derivado de reação de digestão) de 1:3. A ligação se deu em volume final de reação de 10 µL, contendo o tampão *Rapid Ligation* (Promega), na presença de 3 U de T4 DNA Ligase.

3.3.3 Extração de DNA plasmidial

Após transformação bacteriana e plaqueamento, as colônias brancas selecionadas foram colocadas em 3 mL de meio SOB líquido com ampicilina (100 ng/mL), e incubados a 37°C “over-night”. As células foram então colhidas por centrifugação a 19283 *xg*, a 4°C por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de solução P1 (Tris-HCl 1M e EDTA 500 mM; pH 8 e RNase (Fermentas) para concentração final de 100 µg/mL) e misturadas por vórtice. Foram adicionados 300 µL de solução P2 (NaOH 0,2 N e SDS a 1%) e a mistura foi agitada cuidadosamente e em seguida mantida a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram então adicionados 300 µL de solução P3 (acetato de potássio 5 M; 23 mL de ácido acético glacial), procedendo-se à mistura gentilmente e mantendo-se em temperatura ambiente por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 19283 *xg*, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com ajuda de micropipeta e novamente centrifugado a 19283 *xg*, a 4°C por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante para um tubo tipo “eppendorf” foi adicionado 600 µL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e mantida a temperatura ambiente por 5 minutos. Após nova centrifugação a 16627 *xg*, a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado seguido de centrifugação a 19283 *xg*, a 4°C por 5 minutos. Finalmente o

sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de TE (Tris-HCl 1 M e EDTA).

3.3.4 Clivagem de DNA com endonucleases

Os protocolos usados para clivagem de DNA foram realizados de acordo com instruções do fabricante (Fermentas Life Sciences).

3.3.5 Determinação da sequência de nucleotídeos de DNA

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados os oligonucleotídeos na concentração de 3,2 µM em volume final de reação de 20 µL. Foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* da Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram precipitadas pela adição de 80 µL de isopropanol 75% seguido de agitação por vortex. Em seguida foi centrifugado a 20000 *xg* a 4°C por 20 minutos, e o sobrenadante foi desprezado. Os precipitados foram lavados com 100 µL de etanol 70% seguindo-se de nova centrifugação a 20000 *xg* a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se a centrifugação a 20000 *xg* a 4°C por 1 minuto. Com ajuda da pipeta retirou-se totalmente o sobrenadante e as amostras foram mantidas a 94°C por 1 minuto ou a 10 minutos em temperatura ambiente.

Após a precipitação as amostras foram enviadas ao serviço de sequenciamento do IQUSP (Instituto de Química-Universidade de São Paulo) onde foram fracionadas no aparelho ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer/ HITACHI. As sequências obtidas foram analisadas no software BioEdit.

3.3.6 Curva padrão qPCR

Os plasmídeos (pGEM®-T Easy) contendo as regiões que codificam as regiões 5' UTR's das cópias *5.1 aap3* e *4.7 aap3* foram digeridas com *ScaI* (Fermentas) e a concentração do DNA foi ajustada para se obter um número de cópias conhecido, de acordo com o tamanho do plasmídeo. A concentração estoque foi estabelecida em 10^{10} cópias em 2,5 μ L. A partir dessa solução estoque foi então feita a diluição seriada, de 10^8 a 10 cópias, utilizadas na curva de calibração do PCR quantitativo.

3.3.7 Reação de qPCR

As reações de *Real-Time* PCR foram realizadas com 10 μ L de SYBRGreen® PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems), 0,3 μ L dos oligonucleotídeos sense e anti-sense a 20 μ M, 5 μ L de cDNA diluídos 100 x, e água q.s.p. para 20 μ L final. As reações foram realizadas na máquina 7300 System (Applied Biosystems). As reações tiveram dois passos iniciais de incubação a 50°C por dois minutos (para ativar o fluoróforo) e 94°C por 10 minutos para *hot start* da *Taq* polimerase. Em seguida foram realizados 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, temperatura de associação por 1 minuto. Seguidos da leitura da fluorescência durante a curva de dissociação nas condições de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos.

3.4 Ensaio de privação de arginina

Promastigotas em fase log de cultura foram coletadas por centrifugação a 885 xg, 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes em meio 199 - EBSS (LGC Biotecnologia) a pH 7,0.

As células foram contadas e ressuspensas para obter a concentração final de 1×10^6 /mL células em meio EBSS pH 7,0 ou pH 5,0 (Tabela 3). Cada cultura foi então

distribuída em três grupos, sendo que em dois foi feita a variação de temperatura e o terceiro corresponde ao grupo controle, mantido em gelo. Cada conjunto de tratamentos foi então submetido à privação ou suplementado com arginina (400 μ M).

A figura 1 mostra o fluxograma esquemático do ensaio de privação. Após o ensaio, cada grupo de células foi lavado duas vezes com 800 μ L de PBS 1X. Em seguida, as células foram ressuspensas em 250 μ L de PBS 1X e gentilmente agitadas durante a adição de 750 μ L de TRIzol® Ambion (Life Technologies™) para a extração de RNA, sendo a suspensão mantida a -20°C.

Tabela 3 - Componentes do Meio EBSS usado em ensaios de privação e transporte de arginina:

Componentes	mg/mL
Cloreto de sódio	6.570,00
Fosfato de sódio monobásico.H ₂ O	140,00
Cloreto de potássio	390,00
Sulfato de magnésio	90,00
Cloreto de cálcio	190,00
D-Glicose	970,00
Vermelho de fenol	10,00
Bicarbonato de sódio	2.200,00

Figura 1– Representação esquemática do ensaio de privação em diferentes condições de temperatura e pH. Formas promastigotas ou amastigotas-like de *L.(L.) amazonensis* em fase log de crescimento foram mantidos em dois pHs (pH 7,0 e pH 5,0) em duas diferentes temperaturas (25°C e 34°C) e submetidos ou não à privação de arginina (-ARG) por quatro horas.

3.5 Tomada de arginina

O ensaio de tomada de arginina foi realizado após o protocolo de privação descrito anteriormente. Para o ensaio de tomada, promastigotas (5×10^7) em fase log de crescimento, ou amastigotas-like foram coletadas (promastigotas a 10621 xg por 10 minutos a 4°C; e amastigotas-like a 1620 xg por 10 minutos a 4°C) e lavadas 2 vezes em meio EBSS (Tabela 3) cujo pH era ajustado para ser o mesmo utilizado no protocolo de privação realizado anteriormente (pH 5,0 ou pH 7,0). As células foram ressuspensas em 250 μ L de PBS 1X, distribuídas 10^7 células por tubo por triplicata e colocadas para aclimatização em bloco aquecido nas temperaturas do ensaio (25°C ou 34°C) por três minutos. Em seguida foram adicionados 250 μ L de arginina tritiada (1mCi/43Ci/mmol; GE Healthcare) na concentração de 80 μ M, de modo a ter 100.000 cpm no volume total. O ensaio de tomada do aminoácido foi parado com a retirada de 200 μ L da suspensão (10^7 células) nos tempos escolhidos de 0, 1,0, 2,5 e 5,0 minutos. Cada alíquota foi colocada em outro tubo tipo “eppendorf” com 200 μ L de arginina 50 mM em meio EBSS pH 7, e mantida em gelo até a recuperação do

precipitado de células, nas condições de 1620 $\times g$ por 10 minutos a 4°C e posterior lavagem com PBS 1X por 2 vezes. Posteriormente as células foram ressuspendidas em 200 μL de PBS 1X gelado. A seguir, foram adicionadas a 800 μL de líquido de cintilação Ecolume (ICN Biomedicals) em tubo para cintilador. Cada amostra teve então a radioatividade mensurada em espectrômetro de cintilação líquida Perkin Elmer TRI-CARB 2910TR.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism v.6, utilizando o teste t de Student. Valores de (p) menores ou igual a 0,05 foram considerados.

Resultados

4 RESULTADOS

Para avaliar os sinais que regulam a expressão do transportador de arginina em *L. (L.) amazonensis*, escolhemos o pH, a temperatura e a privação da oferta de arginina, três variáveis que são fatores intrínsecos na passagem do inseto vetor para o hospedeiro vertebrado durante o ciclo da doença. A partir disso, submetemos 5×10^7 promastigotas ou amastigotas-like às combinações de pH e temperatura associados à privação ou suplementação de arginina (400 μ M) por 4 horas, como descritas na figura 1 em Material e Métodos. Em seguida foi feita a extração de RNA total e preparo de cDNA usando oligonucleotídeo randômico. A quantificação de mRNA de ambos as cópias gênicas do transportador, 5.1 *aap3* e 4.7 *aap3* foram normalizadas pela quantificação do transcrito do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) pela técnica de *Real -Time* PCR (qPCR).

4.1 Padronização das curvas de quantificação de PCR em tempo real

As regiões 5' UTR, de ambas cópias gênicas do transportador foram amplificadas pela técnica de PCR convencional, a partir dos oligonucleotídeos (5U1KF E 5U1KR) que amplificam a região não traduzida da cópia 5.1 *aap3* e os pares (5U500F E 5U500R) que reconhecem a 5' UTR do transcrito 4.7 *aap3* (ver tabela 1). Os fragmentos obtidos foram então ligados no vetor pGEMT-Easy (Promega) e essas construções foram clonadas em *E. coli SURE*. DNA dos plasmídeos recombinantes dos clones selecionados foi preparado e digerido pela enzima *EcoRI*. Uma vez confirmado o tamanho esperado do fragmento amplificado foi feita a certificação por sequenciamento.

Cada um desses plasmídeos foram então utilizados para a estabelecer a curva de calibração para o PCR em tempo real, conforme descrito em Material e Métodos. DNA de cada plasmídeo foi linearizado pela digestão com a enzima de restrição *ScaI*, purificado e quantificado em espectrofotômetro. Com o tamanho do plasmídeo

foi calculada a concentração de DNA para se ter 10^{10} moléculas por mL. Essa solução estoque foi então utilizada para a obtenção da diluição seriada que serviu de “template” para cada ponto da curva de calibração.

As curvas de calibração de cada segmento gênico foram efetuadas fazendo o qPCR, utilizando-se o protocolo de ciclagem descrito em Material e Métodos. Ao final de cada reação de amplificação foram analisados os seguintes parâmetros de eficiência da reação que significa que para cada ciclo, a quantidade do produto duplica. A eficiência é calculada a partir do declive (slope) da curva de calibração e deve estar entre os valores de 90% e 110%. Além da análise do R^2 que permite avaliar a performance da dupla dos iniciadores e analisar a diluição seriada do alvo. Também é um coeficiente obtido através da curva de calibração (deve ser maior que 0,99).

Nas figuras 2 (*gapdh* – normalizador), 3 (5.1 *aap3*) e 4 (4.7 *aap3*) apresentamos as retas de calibração típicas obtidas para cada fragmento.

Figura 2 – Curva de calibração em qPCR do fragmento que codifica o gene normalizador *gapdh*. No eixo X, os ciclos da reação de PCR em tempo-real (Ct); no eixo Y, concentração inicial de cada “template” em número de cópias do DNA do plasmídeo contendo o amplicon clonado no vetor pGEMT-Easy, linearizado com *ScaI*. Em destaque os valores R^2 (0,9992) e eficiência da reação (94%).

Figura 3 - Curva de calibração em qPCR do fragmento que codifica a copia do gene 5.1 *aap3*. No eixo X, os ciclos da reação de PCR em tempo-real (Ct); no eixo Y, concentração inicial de cada “template” em número de cópias do DNA do plasmídeo contendo o amplicon clonado no vetor pGEMT-Easy, linearizado com *ScaI*. Em destaque os valores de R^2 (0.9984) e eficiência da reação (94%).

Figura 4 - Curva de calibração em qPCR do fragmento que codifica a copia do gene 4.7 *aap3*. No eixo X, os ciclos da reação de PCR em tempo-real (Ct); no eixo Y, concentração inicial de cada “template” em número de cópias do DNA do plasmídeo contendo o amplicon clonado no vetor pGEMT-Easy, linearizado com *ScaI*. Em destaque os valores R^2 (0.9957) e eficiência da reação (98%).

4.2 Expressão dos transcritos de *aap3* em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

4.2.1 Obtenção de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para quantificação dos transcritos de *aap3*

Para analisar a expressão dos transcritos de *aap3* em formas promastigotas foi utilizado um protocolo que visa a obtenção de um grande número de células. Assim, 5×10^6 células foram coletadas de uma cultura em fase estacionária de crescimento. Essas células foram adicionadas a 10 mL de Meio M199 e mantidas na câmara de incubação a 25°C. Após quatro dias, a esse inóculo inicial foram adicionados 90 mL de meio 199 e esse volume total foi dividido em duas garrafas de cultura de células de 182 cm². Em cada garrafa foi adicionado mais 50 mL de meio M199 e a cultura foi mantida a 25°C por mais dois dias. Essas células foram então utilizadas no ensaio de privação de arginina que foi realizado como esquematizado na figura 1 e descrito em Material e Métodos.

RNA total de cada tratamento foi utilizado para a obtenção de cDNA e cada cDNA foi submetido ao qPCR para a quantificação dos transcritos em relação ao número de cópias da curva de calibração, corrida em paralelo, e esses foram finalmente normalizados pelo número de transcritos de *gapdh* do mesmo cDNA.

4.2.2 Análise dos transcritos 5.1 *aap3* de promastigotas em relação à mudança de pH

A análise do mRNA 5.1 *aap3* em formas promastigotas mantidas em pH 7,0 e 25°C (Figura 5) revelou que a privação de arginina levou a um aumento desse transcrito quando comparado com o grupo suplementado com arginina ($p=0,0124$). Esses resultados repetem a observação descrita por Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011). Ainda, na figura 5 podemos observar que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de transcritos 5.1 *aap3* dos parasitos

submetidos à privação em comparação com aqueles mantidos em gelo. Esse tipo de comportamento frente à privação foi observado por Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011) quando os parasitos submetidos à privação se encontravam em fase log tardia de crescimento ou próximo da fase estacionária de cultura. O protocolo utilizado para a obtenção de maior número de células provavelmente leva a essa fase log tardia mais rapidamente.

Uma vez repetido o resultado de variação de expressão de *5.1 aap3*, em condição de privação de arginina, fizemos a avaliação dessa expressão dos parasitos submetidos à variação do pH para 5,0 inicialmente mantendo a temperatura em 25°C. Na figura 5 podemos observar que o perfil obtido é semelhante àquele observado para pH 7,0 indicando que a variação de pH somada à privação do aminoácido resultou no aumento do transcrito *5.1 AAP3* em relação aos parasitos suplementados ($p=0,0104$). Os parasitos mantidos em gelo apresentaram mais cópias do transcrito em relação a aqueles suplementados com arginina a 25°C e pH 5,0 ($p=0,0032$).

Figura 5 - Mudança de pH 7,0 para pH 5,0 a 25°C não modula o transportador de arginina 5.1 *aap3* em *L.(L.) amazonensis*. O número de cópias do transcrito *5.1 aap3* foi determinado em promastigotas mantidos em dois pHs distintos na temperatura de 25°C durante a privação (-) ou suplementação (+) com arginina. C, controle mantido em gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. As barras representam a média ± erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito *5.1 aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* (n=6). * $p<0,05$.

4.2.3 Análise dos transcritos 5.1 *aap3* em promastigotas em relação à mudança de temperatura

Com o aumento da temperatura para 34°C (Figura 6), a privação de aminoácidos em pH 7,0 favoreceu o aumento das cópias do transcrito 5.1 *aap3* em relação ao grupo mantido no gelo em 1,9 vezes ($p=0,0017$), e de aproximadamente 1,4 vezes ($p=0,0103$) em relação ao grupo suplementado de arginina. A 34°C em pH 5,0, a privação de arginina promoveu um aumento do número de cópias do transcrito em relação ao grupo controle mantido em gelo em 3,5 vezes ($p=0,0006$) e ao suplementado em 2,2 vezes ($p=0,0045$).

Esse aumento do grupo privado a 34°C e pH 5,0 ainda é superior ao proporcionado com a privação a 34°C e pH 7,0 ($p=0,0141$) em 1,7 vezes. É interessante ressaltar que apenas a variação do pH e temperatura foi suficiente para proporcionar um aumento do número de cópias do transcrito, como podemos observar no grupo suplementado ($p=0,0189$) em pH 5,0 e 34°C quando comparado ao grupo mantido, em gelo (1,5 vezes).

Figura 6 - Mudança de temperatura de 25°C para 34°C modula a expressão da cópia 5.1 *aap3* em ambos pH's durante a privação de aminoácido. O número de cópia do transcrito 5.1 *aap3* foi determinado em promastigotas mantidas em pH 7,0 ou pH 5,0 a 34°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. C, controle – células mantidas em gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias de 5.1 *aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* ($n=6$). * $p<0,05$; ** $p<0,001$.

Para podermos comparar todos os dados, fizemos uma análise normalizada, utilizando como 100% os valores de quantidade de transcritos obtidos dos promastigotas axênicos mantidos em gelo em cada temperatura e pH e comparamos os valores obtidos durante a privação ou suplementação de arginina em meios de cultura em pH 7,0 e 25°C (condições que são encontradas no vetor) ou depois da mudança do pH e/ou da temperatura.

Ao normalizarmos os resultados foi possível notar que os parasitos mantidos em gelo apresentaram maior quantidade do transcrito ($p < 0,0001$) em relação ao grupo suplementado mantido em pH 7,0 e 25°C. E que esse grupo controle em relação ao grupo privado exibiu quantidade similar de mRNA, apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) (Figura 7). Entre os grupos privado e suplementado, a privação de arginina favoreceu um aumento do número de cópias de *5.1 aap3* em 1,44 vezes ($p < 0,0001$). Também foi observado que a mudança para o pH 5,0 mantida a temperatura de 25°C, apesar de apresentar pequena variação, não mostrou diferença significativa entre os testes realizados.

Já, as análises feitas em pH 7,0 variando a temperatura de 25°C para 34°C, mostraram que a privação de arginina promoveu um aumento do transcrito *5.1 aap3* em 1,6 vezes em relação aos parasitos submetidos à privação a 25°C ($a = 0,0005$). Também foi observado um aumento de 1,7 vezes no número de transcritos em relação aos parasitos mantidos em gelo durante a privação (controle) ($p = 0,0003$) e ao suplementado (34°C; pH 7,0; $p = 0,0116$).

Quando comparados os valores de transcritos em células submetidas à privação a 25°C e pH 7,0 e à privação a 34°C e pH 5,0 foi observado um aumento da expressão de *5.1 aap3* em 2,5 vezes ($d = 0,0066$). Ainda comparando os tratamentos a 25°C e pH 7,0 com os tratamentos a 34°C e pH 5,0 foi observado entre os grupos suplementados que há um aumento de *5.1 aap3* de 1,7 vezes quando os parasitos foram submetidos à acidificação e elevação da temperatura ($e = 0,0009$).

Ao compararmos os resultados dos experimentos feitos a 25°C e pH 5,0 com os tratamentos a 34°C em ambos os pH's observamos que o grupo privado a pH 5,0 apresentou maior número do mRNA *5.1 aap3* em relação ao grupo privado em pH 5,0

a 25°C ($b=0,0060$) e que entre essas mesmas condições de pH e temperatura porém entre os grupos privados também foi possível verificar um aumento desse transcrito ($c=0,0165$).

Com o aumento da temperatura para 34°C e a diminuição do pH para 5,0 pôde-se observar um aumento de 2,6 vezes do transcrito *5.1 aap3*, quando comparado aos parasitos mantidos no gelo em pH 5,0 ($p=0,0003$) e de 2 vezes em relação aos parasitos suplementados mantidos a 34°C e pH 5,0 ($p=0,0193$).

Figura 7 - Comparação da expressão relativa do número de cópias do transcrito *5.1 aap3* em promastigotas em diferentes condições de pH e temperatura, submetido ou não à privação de arginina. O número de cópia de *5.1 aap3* determinado nos tratamentos em pH 7,0 ou pH 5,0 a 25°C ou 34°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina foi normalizado pelo número de cópias do transcrito do controle mantido em gelo (C) durante o ensaio de privação. A linha pontilhada representa 100% referente ao grupo mantido em gelo e pH 7,0. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias de *5.1 aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* ($n=6$) de dois experimentos independentes. * $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$; $a=0,0005$; $b=0,0060$; $c=0,0165$; $d=0,0066$; $e=0,0009$.

4.2.4 Análise da expressão do transcrito 4.7 *aap3* em promastigotas em relação a diminuição do pH

A comparação em formas promastigotas, do número de transcritos da cópia 4.7 *aap3* a 25°C e pH 7,0 em parasitos mantidos nas mesmas condições confirmou quantidade 200 vezes menor em relação a expressão de 5.1 *aap3*, (ver figura 5 e figura 8), confirmando as observações de Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011). Não foi observada diferença estatística entre os parasitos submetidos ou não à privação de arginina quando os tratamentos foram realizados a 25°C e pH 7,0, embora seja possível observar uma tendência à diminuição dos transcritos quando os parasitos foram submetidos à privação (Figura 8), ainda confirmando as observações daqueles autores.

Figura 8 - Transportador de arginina 4.7 *aap3* de *L. (L.) amazonensis* é pouco modulado em diferentes condições de pH a 25°C. O número de cópia do transcrito 4.7 *aap3* foi determinado em promastigotas mantidas em pH 7,0 ou pH 5,0 ou 25°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. C, controle, promastigotas mantidos em gelo durante o ensaio de privação. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito 4.7 *aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* (n=6). *p=0,0243.

A variação de pH para 5,0 em parasitos mantidos a 25°C resultou em uma diminuição do número de cópias do transcrito 4.7 *aap3* nos parasitos submetidos à privação, em relação ao grupo controle (p=0,0243). No entanto, de maneira geral, a

mudança de pH não altera o perfil do número de transcritos nos parasitos nos diferentes tratamentos.

4.2.5 Análise dos transcritos 4.7 *aap3* em promastigotas em relação à mudança de temperatura

Quando os parasitos foram submetidos à mudança de temperatura de 25°C para 34°C pudemos observar que os parasitos privados de arginina tanto em pH 7,0 como em pH 5,0 apresentam um aumento do número de cópias de 4.7 *aap3*, contudo sem significado estatístico (Figura 9) em relação aos parasitos mantidos em gelo. A suplementação de arginina, não alterou o número de cópias do transcrito nos parasitos mantidos em pH 7,0, em relação aos privados do aminoácido, mas a mudança do pH levou a uma diminuição dos transcritos nos parasitos suplementados em relação aos privados de arginina.

Novamente, para estabelecermos uma comparação do número de transcrito presente nos parasitos submetidos a todos os tratamentos, realizamos a normalização dos dados em relação ao grupo controle de cada tratamento, em gelo e em ambos os pH's durante o ensaio de privação (Figura 10). Foi possível observar que variação do número de transcritos 4.7 *aap3* foi proporcionalmente menor daquela observada com o transcrito 5.1 *aap3* (figura 7). No entanto, algumas diferenças significativas puderam ser observadas. Há uma redução de 50% dos transcritos em parasitos submetidos à privação de arginina em pH 7,0 a 25°C ($p=0,0005$) quando comparado ao grupo controle. Entre os tratamentos realizados a 25°C no pH 5,0 foi possível observar que a privação favoreceu uma queda no número de transcritos 4.7 *aap3* em relação ao grupo controle deste tratamento ($p=0,0027$) e ao grupo suplementado ($p=0,0028$). A análise normalizada entre os tratamentos a 34°C apenas em pH 7,0 não foi observada nenhuma diferença com relevância estatística.

Figura 9 - Transportador de arginina 4.7 *aap3* de *L. (L.) amazonensis* não é modulado em diferentes condições de temperatura pH a 34°C. O número de cópia do transcrito 4.7 *aap3* foi determinado em promastigotas mantidos em pH 7,0 ou pH 5,0 na temperatura de 34°C, em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. C, controle, promastigotas mantidos em gelo durante o ensaio de privação. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito 4.7 *aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* (n=6). ns, valores estatisticamente não significantes.

Quando realizadas as comparações entre os tratamentos a 34°C em pH 5,0 notou-se que a suplementação favoreceu o aumento de 1,2 vezes no número de transcritos em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

Tomando por base as comparações realizadas entre os tratamentos privado e suplementado foi observado poucas variações. Algumas delas similares ao que foi visto para a análise normalizada de 5.1 *aap3*, contudo em menores proporções. A suplementação em pH 7,0 e 5,0 a 34°C apresentaram maior número de cópias de 4.7 *aap3* em relação aos grupos suplementados nos pH 7,0 ($a = 0,0407$) e pH 5,0 ($p < 0,0001$) a 25°C, respectivamente 1,8 e 1,2 vezes respectivamente. O grupo privado em pH 5,0 a 34°C apresentou 1,9 vezes mais cópias de 4.7 *aap3* em relação ao grupo também privado em pH 5,0 a 25°C ($b = 0,0152$).

Figura 10 – Expressão relativa do número de cópias do transcrito 4.7 *aap3* em promastigotas mantidas em pH 7,0 ou pH 5,0 a 25°C ou 34°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. A linha pontilhada representa 100% referente ao grupo controle mantido em gelo e pH 7,0 (C) durante as quatro horas do ensaio de privação. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias de 5.1 *aap3* normalizado pelo número de cópias de GAPDH (n=6) de dois experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001; a =0,0407; b=0,0152.

4.3 Expressão dos transcritos de *aap3* em formas amastigotas-like de *L. (L.) amazonensis*

4.3.1 Obtenção de amastigotas-like em cultura

Para o estabelecimento do protocolo para o desenvolvimento de formas amastigotas-like em culturas axênicas no laboratório, descrito em Material e Métodos, utilizamos as condições descritas em (Bates, Robertson et al. 1992; Zilberstein and Shapira 1994; Hodgkinson, Soong et al. 1996; Balanco, Pral et al. 1998; Saar, Ransford et al. 1998; Gupta, Goyal et al. 2001; Teixeira, de Jesus Santos et al. 2002; Barak, Amin-Spector et al. 2005; Bahrami, Hatam et al. 2011) bem como experimentos pilotos para avaliação do comportamento dos parasitos em dois meios de cultura com composições distintas: M199 e Schneider's. A composição de ambos

os meios foi analisada (Tabela 4) e constatou-se que havia uma concentração diferente de arginina em cada meio.

Tabela 4 – Composição de arginina em meios de cultura usados para diferenciação e manutenção de formas amastigotas-like de *L.(L.) amazonensis*:

Meio	Componente	Peso molecular (Daltons)	Concentração (mg/mL)
Meio 199 (Gibco)	Cloridrato de arginina	211,0	70,0
Meio Schneider's (LGC Biotecnologia)	arginina	174,0	400,0

Além disso, foi analisado se essa quantidade de arginina seria prejudicial para posterior análise de expressão do transportador desse aminoácido em ensaios de tomada do aminoácido em parasitos submetidos previamente à sua privação. Assim, após a diferenciação celular em ambos os meios foi realizada a extração de RNA total e consequente produção de cDNA. Esse RNA total extraído, codificado em cDNA, foi inicialmente utilizado para a confirmação da diferenciação das formas promastigotas em amastigotas-like. Para isso foram desenhados dois iniciadores do gene que codifica a proteína amastina descrita como fase específica em formas amastigotas. Essa proteína é usada como referência em confirmação de formas amastigotas diferenciadas e cultivadas em meios axênicos (Wu, El Fakhry et al. 2000; Rafati, Hassani et al. 2006; Rosenzweig, Smith et al. 2008; Nasereddin, Schweynoch et al. 2010).

Assim, PCR convencional de cDNA de amastigotas-like, obtidas tanto em meio Schneider como em M199 e de cDNA de amastigotas recuperadas de lesão em patas de hamster sírio infectado, resultou em um produto, também encontrado quando DNA genômico foi utilizado como template. Essa observação indica a expressão do mRNA de amastina nessas amostras, certificando a diferenciação das células. Amostras do controle negativo das reações de transcrição reversa, do controle

negativo sem DNA e ainda de cDNA de formas promastigotas não produziram nenhum fragmento (Figura 11).

O passo seguinte foi utilizar os mesmos cDNA das amostras da figura 11 na análise de expressão de ambas as cópias do transportador de arginina, normalizadas por número do transcrito de *gapdh*. Foi verificado que parasitos mantidos em meio M199 apresentavam maior expressão gênica de 5.1 *aap3* e 4.7 *aap3* em relação às amostras derivadas de cultura em meio Schneider (resultados não mostrados). Dessa forma, escolhemos o meio M199 para cultura e diferenciação de formas amastigotas-like de *L. (L.) amazonensis* no presente estudo.

Uma vez estabelecido o protocolo para a diferenciação de formas amastigotas-like, foram feitos os ensaios para análise do número de transcritos de 5.1 *aap3* e 4.7 *aap3* nas formas amastigotas-like após ensaio de privação de arginina, variação de temperatura e pH.

Figura 11 – Detecção por PCR convencional de mRNA que codifica amastina para validação de diferenciação de amastigotas-like de *L. (L.) amazonensis*. Eletroforese em gel de agarose 2%. M – marcador “ladder” de 100 bp. 1 - controle negativo da reação de PCR. 2 - controle positivo constituído de DNA genômico como molde. 3 - cDNA de promastigotas. 4 - cDNA de amastigotas recuperadas de lesão em hamsters. 5, 8 e 10 - cDNA de amastigotas-like obtidos em meio M199. 6, 7 e 9 - cDNA de amastigotas-like obtidos em meio Schneider. 11 - cDNA negativo (sem transcriptase reversa) da amostra de RNA cujo cDNA positivo se encontra na canaleta 8.

4.3.2 Análise da expressão do transcrito 5.1 *aap3* em amastigotas-like

As formas amastigotas-like derivadas de 10^7 promastigotas, obtidas como descrito no item 4.3.1, foram submetidas às diferentes condições descritas na figura 1. Após a extração de RNA total das células de cada condição, foi feita a reação de transcrição reversa e o cDNA foi utilizado em qPCR para determinação do número de transcritos de cada cópia que codifica o transportador *AAP3*. A normalização se procedeu novamente pelo número de transcritos de *gapdh*.

A expressão do mRNA 5.1 *aap3* em células amastigotas-like durante os tratamentos realizados a 25°C e pH 7,0 (Figura 12) mostrou o mesmo perfil encontrado para as formas promastigotas nas mesmas condições (figura 5). Nesse tratamento, o grupo privado de arginina apresentou um aumento significativo quando comparado com o valor encontrado nos parasitos suplementados com arginina ($p < 0,0001$) e com o grupo controle mantido em gelo ($p = 0,0384$). E entre o grupo controle e as amastigotas-like suplementadas de arginina, o grupo em gelo apresentou maior número do transcrito ($p < 0,0001$).

Quando a temperatura de 25°C foi mantida, e o pH variou para 5,0 detectamos um aumento no número de transcritos tanto dos parasitos privados ($p = 0,0015$) como nos suplementados ($p = 0,0076$) com arginina, em relação aos parasitos mantidos em gelo (Figura 12). Contudo, não detectamos diferenças entre os grupos de parasitos privados e suplementados a 25°C em pH 5,0. Já a mudança de pH de 7,0 para pH 5,0 levou a um aumento no número de cópias do transcrito quando os parasitos foram suplementados com o aminoácido ($p < 0,0001$). Além disso, entre os grupos controle mantidos em diferentes pH's foi possível observar uma variação negativa com a acidificação do pH ($\alpha = 0,0101$).

Figure 12 – Privação de arginina em pH 7,0 a 25°C modula o transcrito *5.1 aap3* do transportador de arginina em formas amastigotas-like de *L.(L.) amazonensis*. O número de cópias do transcrito *5.1 aap3* foi determinado em amastigotas-like mantidos na temperatura de 25°C durante a privação (-) ou suplementação (+) com arginina. C, controle mantido em gelo durante as quatro horas do ensaio. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito *5.1 aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito *gapdh* (n=6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; a=0,0101.

O aumento de temperatura para 34°C, mantido o pH 7,0 resultou em aumento do transcrito *5.1 aap3* de amastigotas-like privadas de arginina quando comparadas ao grupo suplementado ($p=0,0004$). O grupo mantido em gelo quando comparado ao grupo suplementado apresentou uma quantidade superior do transcrito ($p=0,0004$) (Figura 13).

Amastigotas-like mantidas em 34°C e pH 5,0 apresentaram variação no número de transcritos *5.1 aap3* quando comparadas ao grupo privado ($p=0,0404$) e entre os grupos privados e suplementados ($p=0,0173$) (Figura 13). Analisando entre os tratamentos de privação em ambos os pH's foi possível observar que em pH 7,0 o transcrito apresentou maior quantidade de cópias em relação ao grupo mantido em pH 5,0 ($p=0,0011$). E entre os grupos suplementados a manutenção em pH 5,0

favoreceu o aumento do número de cópias de 5.1 *aap3* em relação ao grupo também suplementado em pH 7,0 ($p=0,0036$).

Figura 13 – Mudança do pH 5,0 para 7,0 a 34°C não favorece aumento do número de cópias de 5.1 *aap3*. O número de cópias do transcrito 5.1 *aap3* foi determinado em amastigotas-like mantidas na temperatura de 34°C durante a privação (-) ou suplementação (+) com arginina, nos dois pHs. C, controle mantido em gelo durante as quatro horas do ensaio. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito 5.1 *aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* ($n=6$). * $p<0,05$. ** $p<0,001$.

De forma semelhante as análises realizadas para as formas promastigotas, normalizamos os resultados pelo grupo mantido em gelo em cada pH e temperatura. Os dados normalizados estão apresentados na figura 14.

Dentre os grupos mantidos a temperatura de 25°C foi observado um aumento do número de cópias de 5.1 *aap3* de 2,4 e 1 vez, respectivamente, entre o grupo privado em comparação ao grupo suplementado de arginina ($p=0,0259$) e ao grupo controle ($p=0,0410$), ambos em pH 7,0.

Quando variamos o pH para 5,0 ainda a 25°C foi possível observar um aumento da quantidade de transcritos de 2,3 vezes entre o grupo privado ($p < 0,0001$) e 2,4 vezes entre o grupo suplementado ($p = 0,0018$) quando comparados ao grupo controle.

Dentre os grupos mantidos na temperatura de 34°C foi possível observar apenas mudança significativa do número de transcritos entre os grupos em pH 7,0 quando comparamos o grupo suplementado com o controle ($p = 0,0008$).

A análise normalizada permitiu ainda verificar que a privação de arginina a 25°C e pH 7,0 favoreceu um aumento em torno de 1,1 vez do número de cópias do transcrito *5.1 aap3*, em relação ao grupo também privado a 25°C e pH 5,0 ($a = 0,0410$). Além disso, foi possível observar um aumento de 2,3 vezes do número de cópias quando comparado a privação a 25°C e pH 7,0 com o grupo também privado em pH 7,0 a 34°C ($b = 0,0344$). Ao compararmos os grupos privados em pH 5,0 foi possível observar que a 25°C há uma maior quantidade do transcrito em relação ao tratamento feito a 34°C, de 1,9 vezes ($e = 0,0006$).

Quando comparamos o grupo suplementado em pH 7,0 a 25°C com os demais suplementados, foi visto 1,7 vezes mais quantidade do transcrito em relação ao grupo a 34°C e pH 7,0 ($d = 0,0060$). Já o grupo suplementado a 25°C em pH 5,0 apresentou um aumento de 3 vezes em relação ao grupo suplementado em pH 7,0 a 25°C ($c = 0,0015$). O tratamento em pH 5,0 a 25°C em relação ao pH 5,0 a 34°C, ambos suplementados, resultou em uma expressão 2,8 vezes maior do transcrito *5.1 aap3* ($f = 0,0016$).

Figura 14 – Comparação da expressão relativa do número de cópias do transcrito 5.1 *aap3* em amastigotas-like submetidas a todos os tratamentos. Os resultados da quantificação do transcrito 5.1 *aap3* foram normalizados em relação ao controle mantido em gelo (100%). O número de cópia de 5.1 *aap3* determinado nos tratamentos em pH 7,0 e pH 5,0 a 25°C e 34°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. C, controle promastigotas mantidas em gelo durante o ensaio de privação. A linha pontilhada representa 100% referente ao grupo mantido em gelo e pH 5,0. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias de 5.1 *aap3* normalizado pelo número de cópias de GAPDH (n=6) de dois experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001; a=0,0018.

4.3.3 Análise da expressão do transcrito 4.7 *aap3* em amastigotas-like

O número de cópias do transcrito 4.7 *aap3* a 25°C pH 7,0 (Figura 15) também apresentou uma redução de uma ordem de grandeza em relação a expressão de 5.1 *aap3* (Figura 12) em formas amastigotas-like, repetindo o comportamento em formas promastigotas observado nesta dissertação e por (Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. 2011).

Na temperatura de 25°C em pH 7,0 foi observado que o número de transcritos da cópia 4.7 *aap3* no grupo controle em pH 7,0 foi maior em relação aos grupo suplementado (p=0,0077) em mesmo pH e entre o grupo controle em pH 5,0 (p=0,0038) (Figura 15). Ainda a 25°C, o grupo privado apresentou maior quantidade

do transcrito quando comparado ao grupo suplementado, ambos em pH 7,0 ($p=0,0073$).

O grupo submetido à privação de arginina em pH 5,0 a 25°C apresentou maior número de cópia do transcrito 4.7 *aap3* em relação ao grupo controle ($p=0,0085$) e ao grupo suplementado ($p=0,0015$) ambos em pH 5,0 (Figura 15).

Figura 15 – Expressão do mRNA 4.7 *aap3* em formas amastigotas-like é pouco modulado nas condições de pH 5,0 ou pH 7,0 a 25°C. O número de cópia do transcrito 4.7 *aap3* foi determinado em amastigotas-like mantidas em pH 7,0 ou pH 5,0 a 25°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. C, controle, amastigotas-like mantidas em gelo durante o ensaio de privação. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito 4.7 *aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* ($n=6$). * $p<0,05$.

Na figura 16 observamos que o aumento da temperatura para 34°C nas amastigotas-like mantidas em pH 7,0 associado à privação de arginina resultou em aumento significativo do número de cópias do transcrito 4.7 *aap3*, $p=0,0237$.

No entanto, quando ocorreu a acidificação do pH a 34°C, a privação de arginina levou a uma diminuição do número de transcritos 4.7 *aap3* em relação ao grupo controle mantido em gelo ($p<0,0001$), e em relação ao grupo suplementado ($p=0,0072$). Já o grupo suplementado quando comparado ao grupo controle

apresentou menor número do transcrito quando comparado ao grupo controle ($p=0,0034$).

No entanto, entre os grupos privados observamos maior quantidade do transcrito a 34°C e pH 7,0 em relação ao grupo também privado em pH 5,0 ($p<0,0001$). Entre os grupos suplementados em ambos os pH foi possível verificar uma maior quantidade de *4.7 aap3* em pH 7,0 do que em pH 5,0 ($p=0,0194$).

Figura 16 – Número de cópias do transcrito *4.7 aap3* é pouco modulado nas diferentes condições de pH e temperatura a 34°C. O número de cópia do transcrito *4.7 aap3* foi determinado em pH 7,0 ou pH 5,0 a 34°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. C, controle, promastigotas mantidos em gelo durante o ensaio de privação. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito *4.7 aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* ($n=6$). * $p<0,05$; *** $p<0,0001$.

A comparação de todos os tratamentos aos quais as formas amastigotas-like foram submetidas, em relação ao número de transcritos de *4.7 aap3*, foi feita a partir da normalização em relação ao controle gelo em cada pH e temperatura (Figura 17). Foi observado que os tratamentos realizados em pH 5,0 e 25°C apresentaram diferença significativa, entre as condições controle e privado ($p=0,0016$). Quando comparado os resultados a 34°C em pH 7,0 a privação apresentou maior quantidade do transcrito em relação a suplementação em mesmo pH ($p=0,0199$). Dentre os

tratamentos a 34°C, no pH 5,0 foi possível observar diferença estatística entre o grupo controle e o suplementado ($p=0,0010$).

Nas análises comparativas entre os tratamentos de cada grupo, o grupo privado em pH 5,0 a 25°C mostrou diferença significativa apresentando maior número de cópias do transcrito *4.7 aap3* em relação aos grupos privados em pH 7,0 a 25°C ($a=0,0385$). Quando comparado o grupo privado em pH 5,0 a 25°C com o grupo também privado em mesmo pH a 34°C observamos uma queda do número de transcritos com a elevação da temperatura ($b=0,0009$). Também entre o grupo privado em pH 7,0 a 34°C apresentou maior número do transcrito em relação ao grupo privado em pH 5,0 na mesma temperatura ($d=0,0266$). As análises do grupo suplementado em pH 5,0 e 25°C mostrou maior número de cópias em relação ao grupo suplementado em pH 5,0 a 34°C ($c=0,0159$).

Figura 17 – Expressão relativa do mRNA *4.7 aap3* mostram pequena variação entre os tratamentos em diferentes pH s e temperaturas. O número de cópias do transcrito *4.7 aap3* determinado nos tratamentos em pH 7,0 e pH 5,0 a 25°C e 34°C em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. C, controle amastigotas-like mantidas no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. A linha pontilhada representa 100% referente ao grupo mantido em gelo e pH 5,0. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SEM) do número de cópias de *4.7 aap3* normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* ($n=6$) de dois experimentos independentes. * $p<0,05$; $a=0,0299$; $b=0,0279$; $c=0,0374$; $d=0,0012$.

4.4 Regulação da tomada de arginina em *L. (L.) amazonensis*

Na tentativa de correlacionar os resultados obtidos nas análises da expressão dos transcritos *5.1 aap3* e *4.7 aap3* das cópias do gene que codificam o transportador de aminoácidos *AAP3* com a expressão fisiológica dessa proteína, realizamos o ensaio de tomada de arginina, submetendo os parasitos às mesmas variações de pH e temperatura em privação ou não de arginina como nos experimentos em que os RNA mensageiros foram quantificados (esquema de tratamento da Figura 1).

4.4.1 Análise da tomada de arginina em formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*

O ensaio de tomada de arginina em promastigotas mantidos em pH 7,0 e 25°C mostrou que a privação de arginina favorece o aumento da tomada do aminoácido em relação aos grupos controle (gelo) e suplementados com arginina (Figura 18). Esses resultados repetem a observação feita por Castilho et al 2011 e estão diretamente relacionados aos resultados obtidos naquele trabalho e nesta dissertação, em relação ao número de cópias de mRNA mensageiro *5.1 aap3*, encontrado nas condições de pH e temperatura característica de formas promastigotas (pH 7,0; 25°C).

Também conforme observado nos resultados de quantificação de mRNA, a variação do pH para 5,0 mantém as mesmas taxas de tomada de arginina tal como o observado quando os parasitos são mantidos em pH 7,0. Contudo, uma diferença na velocidade de tomada do aminoácido quando os parasitos foram submetidos à privação de arginina em pH 5,0 só foi significativa quando comparada ao transporte do promastigotas suplementados com arginina (Figura 19).

Figura 18 – A velocidade de tomada de arginina a 25°C e pH 7,0 é maior em promastigotas privados do aminoácido por 4 horas. Promastigotas foram submetidos ao ensaio de transporte na presença de 40 μ M arginina tritiada nos tempos de 0, 1, 2,5 e 5,0 minutos após condição de privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) de arginina. Gelo, controle promastigotas mantidos no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 19– Privação de arginina promoveu o aumento da tomada de arginina em promastigotas mantidos a 25°C e pH 5,0. Promastigotas foram submetidos ao ensaio de transporte na presença de 40 μ M arginina tritiada nos tempos de 0, 1, 2,5 e 5,0 minutos após condição de privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) de arginina. Gelo corresponde ao controle em que os promastigotas foram mantidos no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação, antes do ensaio de tomada. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

A mudança de temperatura nas promastigotas para 34°C com o pH mantido em 7,0 levou os parasitos suplementados ou privados de arginina a apresentarem as mesmas taxas de tomada de arginina (Figura 20), de maneira distinta ao observado em pH 7,0 a 25°C. No entanto, comparando-se os valores absolutos, foi possível observar que o aumento da temperatura resultou em um aumento da tomada de arginina pela *Leishmania*, independente da privação ou não do aminoácido.

Figura 20 – Elevação da temperatura favoreceu o aumento da tomada de arginina em formas promastigotas a 34°C e pH 7,0 e a privação de arginina não promoveu o aumento da tomada do aminoácido. Promastigotas foram submetidos ao ensaio de transporte na presença de 40 μ M arginina tritiada nos tempos de 0, 1, 2,5 e 5,0 minutos após condição de privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) de arginina. Gelo, controle promastigotas mantidos no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

A variação de temperatura e de pH levou os promastigotas submetidos à privação ou suplementados com arginina a uma redução na taxa de transporte em comparação com os parasitos mantidos em gelo (Figura 21).

Figura 21 – Variação do pH de 7,0 para 5,0 a 34°C não promoveu o aumento da tomada de arginina em promastigotas privados ou suplementados com arginina. Promastigotas foram submetidos ao ensaio de transporte na presença de 40 μ M arginina tritiada nos tempos de 0, 1, 2,5 e 5,0 minutos após condição de privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) de arginina. Gelo, controle promastigotas mantidos no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Tendo em base os resultados da tomada de arginina nas duas condições de pH 7,0 ou 5,0 e nas duas temperaturas de 25°C ou 34°C foi possível comparar a velocidade de tomada de arginina (*slope* das figuras 18 a 21) entre os diferentes tratamentos. A análise desses resultados, apresentados na figura 22, indicam que mantida a temperatura 25°C, a diminuição do pH resultou em um aumento na velocidade do transporte em relação à taxa de tomada de arginina nos parasitos mantidos em pH 7,0 ($p=0,0448$).

Quando foi analisada a velocidade de tomada do aminoácido pelas formas promastigotas mantidas em 34°C e pH 7,0 verificou-se um aumento significativo em relação aos parasitos mantidos a 25°C tanto em pH 7,0 ($p=0,0054$) como em pH 5,0 ($p=0,0153$). No entanto, quando esses parasitos mantidos a 34°C tiveram o pH diminuído, não se observou alterações significativas nessa velocidade de tomada em relação ao observado em pH 7,0. Interessante notar que nessa temperatura de 34°C, em ambos os pH's não se observa o efeito da privação do aminoácido, sendo a

velocidade de tomada próxima à do grupo suplementado com arginina. Portanto, a resposta à privação só é evidente quando os parasitos estão mantidos a 25°C em pH 7,0, apesar de ainda se observar uma diferença entre o grupo privado e suplementado, mantido a 25°C e pH 5,0.

Figura 22 – Efeito da variação de pH e temperatura na velocidade de transporte de arginina em promastigotas. A velocidade de transporte em cada condição foi calculada a a partir dos dados das figura 18 a 21. As barras pretas, grupo (-) e (+) mantido a 25°C e pH 7,0; barras brancas, grupo (-) e (+) mantido a 25°C e pH 5,0; barras cinza grupo (-) e (+) mantidos a 34°C e pH 7,0; barras listradas; grupo (-) e (+) mantidos a 34°C e pH 5,0. C, controle promastigotas mantidas no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. *p<0,05.

4.4.2 Análise da tomada de arginina em formas amastigotas-like em *L.(L.) amazonensis*

O perfil observado para o transporte de arginina em formas amastigotas-like mantidas a 25°C e pH 7,0 (Figura 23) apresentou o mesmo tipo de resposta em relação à privação de arginina como o observado para a tomada de arginina em formas promastigotas (Figura 18). Contudo, detectou-se uma redução nos valores de velocidade.

Em formas amastigotas-like, a diminuição do pH para 5,0 a 25°C (Figura 24) resultou no aumento da tomada do aminoácido em relação ao grupo mantido no gelo, mas a privação de arginina não favoreceu o transporte do aminoácido.

Figura 23 – Amastigotas-like mantidas a condições de pH e temperatura de formas promastigotas retomam maior tomada de arginina quando associada à privação do aminoácido. Variação do transporte de arginina em 10^7 amastigotas-like em função do tempo 0, 1, 2,5 e 5,0 minutos após condição de privação (-ARG) ou suplementação (+ ARG) de arginina. Gelo, controle amastigotas-like mantidas no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 24 – Mudança do pH para 5,0 a 25°C aumenta a tomada de arginina em amastigotas-like independentemente da privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) com arginina. Gelo, controle amastigotas-like mantidas no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Quando aumentamos a temperatura da cultura de amastigotas-like para 34°C, mantendo pH 7,0, o transporte de arginina permaneceu inalterado tanto em parasitos mantidos em gelo, como privados ou não do aminoácido (Figura 25).

No entanto, na temperatura de 34°C, a mudança de pH para 5,0 provocou um aumento na tomada do aminoácido tanto dos amastigotas-like submetidas à privação, como daquelas suplementadas, em relação ao grupo mantido em gelo (Figura 26). Se comparados apenas os amastigotas-like privadas e suplementadas, observamos que a privação de arginina não influenciou positivamente na tomada do aminoácido.

Figura 25 – Aumento da temperatura para 34°C não modifica o perfil de tomada de arginina em amastigotas-*like* privadas ou não do aminoácido. Cinética de tomada de arginina de amastigotas-*like* mantidas a 34°C em pH 5,0 submetidas à privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) de arginina. Gelo, controle amastigotas-*like* mantidas no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 26 – Mudança de pH para 5,0 a 34°C, não promoveu aumento da atividade do transportador em amastigotas-*like* submetidas a privação em comparação aos amastigotas-*like* suplementadas com o aminoácido. Cinética de tomada de arginina de amastigotas-*like* mantidas a 34°C em pH 5,0 submetidas à privação (- ARG) ou suplementação (+ ARG) de arginina. Gelo corresponde à cinética de tomada nos amastigotas-*like* mantidas no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. Dados representam valores da média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Para estabelecer as condições em que houve variação no comportamento de tomada de arginina em diferentes pH's ou temperatura, com ou sem privação do aminoácido foi comparada a velocidade de tomada (Figuras 23 a 26), em todos os tratamentos aos quais os amastigotas-*like* foram submetidas.

A figura 27 apresenta essa comparação e pode-se coletar várias informações para o transporte de arginina em formas amastigotas-*like*. Como já mencionado, a velocidade de transporte, observada para todos os grupos, é da ordem de 10 vezes menor daquelas observadas para cada respectivo grupo de tratamento em formas promastigotas (comparar Figuras 22 e 27). Também para o que aconteceu com os promastigotas, a privação do aminoácido só estimula a tomada de arginina em culturas mantidas a 25°C e pH 5,0. Nos outros tratamentos, observa-se algum efeito no aumento da velocidade de tomada quando as amastigotas-*like* submetidas à privação foram mantidas a pH 5,0, nas duas temperaturas de tratamento, mas só em relação ao grupo mantido em gelo. O perfil observado para todos os grupos de tratamento a 34°C pH 7,0 não apresentou diferenças entre controle, privado ou suplementado com arginina.

Em formas amastigotas-*like* foi visualizada diferença estatística quando comparados estes conjuntos de dados. Entre eles a comparação entre os slopes a 25°C e 34°C ambos em pH 7,0 mostrou que o aumento da temperatura favoreceu positivamente a velocidade de tomada de arginina ($p=0,0312$). Ainda o tratamento em pH 7,0 a 34°C permaneceu com superior velocidade quando comparado ao tratamento em pH 5,0 a 25°C ($p=0,0345$). Entre a análise a 34°C a acidificação do pH não favoreceu o aumento na velocidade, apresentando menor slope quando comparado ao pH 7,0 na mesma temperatura ($p=0,0222$).

Figura 27 – Mudança da temperatura e pH não alteram a velocidade de tomada de arginina em 10^7 amastigotas-like privadas (-ARG) ou suplementadas (+ARG) por 4 horas entre os tratamentos em pH 7,0 ou 5,0 associadas a temperatura de 25°C ou 34°C. Em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. Em condição de privação (-) ou suplementação (+) de arginina. As barras pretas, grupo (-) e (+) mantido a 25°C e pH 7,0; barras brancas, grupo (-) e (+) mantido a 25°C e pH 5,0; barras cinza grupo (-) e (+) mantidos a 34°C e pH 7,0; barras listradas; grupo (-) e (+) mantidos a 34°C e pH 5,0. C, controle amastigotas-like mantidas no gelo durante as quatro horas do ensaio de privação. ns, os valores de p foram calculados com base no teste *t* de Student. * $p > 0,05$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os diferentes ambientes em que as formas de vida de *Leishmania* se encontram durante seu ciclo de vida heteroxeno apresentam peculiaridades e adversidades como a mudança do pH, a presença de hidrolases nos fagolisossomos, a alteração na oferta de nutrientes e fontes de energia em ambientes compartimentalizados (Burchmore and Barrett 2001), bem como a variação da temperatura entre o hospedeiro e o vetor (Zilberstein and Shapira 1994). A partir disso, o parasito desenvolveu estratégias para promover sua resposta adaptativa a essas condições.

No presente trabalho foram analisadas condições que caracterizam distintivamente dois ambientes em que a *Leishmania* se desenvolve e se diferencia: um no hospedeiro vertebrado e outro no inseto vetor. Dessa forma, foram adotados os parâmetros de pH e temperatura encontrados em cada um desses ambientes para examinar o comportamento fisiológico específico do transportador de arginina *AAP3*. Assim, tanto promastigotas como amastigotas-like foram mantidas em pH 7,0 em temperatura de 25°C para simular as possíveis sinalizações ambientais presentes na probóscide do flebotomíneo, acrescidos de privação ou não de aminoácidos, simulando uma diminuição de nutrientes que ocorre naquele local, após a digestão do repasto sanguíneo pelo inseto. Por outro lado, as mesmas formas de vida, promastigotas e amastigotas-like forma mantidas em pH 5,0 na temperatura de 34°C, simulando as condições encontradas no interior dos macrófagos, condições essas também associadas à oferta ou não do aminoácido arginina.

As análises foram feitas em dois níveis de expressão. Quantificamos os transcritos das duas cópias do gene que codifica *AAP3* nos parasitos submetidos a cada um dos tratamentos. Paralelamente, determinamos, nas mesmas condições, a velocidade de tomada de arginina. Dessa forma, procuramos verificar como se dá a

transcrição/estabilização do transcrito para correlacionar com o dado da ação fenotípica do transportador, a medida pela velocidade de tomada do aminoácido.

Utilizando as informações obtidas anteriormente no laboratório, fizemos a quantificação por PCR em tempo real dos dois transcritos do gene que codifica *AAP3*. Neste estudo confirmamos que a cópia *5.1 aap3* apresenta um maior número de transcritos em parasitos mantidos a 25°C e pH 7,0, e que o número de transcritos dessa cópia aumenta quando os parasitos são submetidos à privação de arginina (Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011)). Ainda, mostramos que esse transcrito apresenta regulação diferencial de expressão em resposta às variações de temperatura e pH e que a oferta de arginina pode ou não ser percebida nessas diferentes condições. Esse transcrito continua sendo a principal molécula a responder aos diferentes estímulos.

O protocolo utilizado para a obtenção de maior número de promastigotas aparentemente privilegiou a chegada da cultura em fase log tardia mais rapidamente, uma vez que os perfis obtidos para o tratamento 25°C e pH 7,0 é semelhante aos descritos por Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011) para parasitos submetidos à privação que se encontravam em fase log tardia de crescimento ou próximo da fase estacionária de cultura.

A confirmação dos dados de Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011), nessa simulação do ambiente encontrado na probóscide do vetor flebotomíneo (pH 7,0 e 25°C) reitera que há uma clara adaptação do parasito de modo a suprir a necessidade de captação de arginina para o estabelecimento de uma futura infecção (figura 5). Ou seja, para proliferar no hospedeiro mamífero, o parasito, ao ser inoculado durante o repasto sanguíneo, deve estar preparado para tomar arginina, suprimindo as necessidades de poliaminas necessárias para essa replicação. Assim, nossa proposta é que o parasito reconhece sinais como mudança de pH, temperatura e carência de nutrientes e modula a expressão do transportador, especialmente promovendo a estabilização do mRNA transcrito da cópia *5.1 aap3*. Essa proposta tem amparo no conceito de que a *Leishmania* modula a expressão de *AAP3* para garantir maior eficácia na tomada do aminoácido uma vez no interior do hospedeiro

vertebrado (Qadoumi, Becker et al. 2002; Roberts, Tancer et al. 2004; Hasne and Ullman 2005; Kropf, Fuentes et al. 2005).

Ainda a favor dessa resposta adaptativa, nas formas promastigotas mantidas em pH 7,0 e 25°C associadas a privação de arginina, a modulação do transcrito *5.1 aap3* correlaciona com a atividade de transporte da proteína, como mostrado nas figuras 5 e 18, respectivamente, também corroborando os dados de Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011).

Uma vez no hospedeiro mamífero, a *Leishmania* encontra inicialmente uma mudança de temperatura que atua como sinalização para várias modificações. É sabido que a variação da temperatura é capaz de sinalizar modificações na expressão gênica de *Leishmania*, como exemplo a proteína de “choque térmico” (*hsp70* ou *hsp80*) e mudanças morfológicas como a diferenciação de promastigotas para amastigotas-like (Zilberstein and Shapira 1994). De acordo com o observado em formas promastigotas a elevação da temperatura para 34°C em pH 7,0 levou a um aumento do número de transcritos encontrados a 25°C e pH 7,0. Isto reflete que a privação de arginina associada à elevação da temperatura exerce uma modulação positiva do transcrito *5.1 aap3* (figura 6). Nossos resultados mostram que o aumento da temperatura para 34°C em pH 7,0 além de aumentar a quantidade do transcrito proporciona um aumento na tomada (figura 20) e na velocidade do transporte de arginina (figura 22).

É interessante notar que em relação os tratamentos realizados a 25°C, a privação de arginina em pH 5,0 não modulou a expressão dos transcritos de *aap3* como em pH 7,0 (figura 5). Em contraposição, podemos propor que a sinalização dada pela alteração da temperatura é mais importante para modular a atividade do transportador de arginina, o que pode representar um mecanismo interessante, pois essa é a primeira sinalização que pode ser percebida pelo parasito na entrada do hospedeiro mamífero.

De uma forma geral, a mudança pontual de pH a 25°C não priorizou o aumento do número de cópias do transcrito *5.1 aap3*. Como discutido, essa mudança não é a que ocorre fisiologicamente no início da infecção, uma vez que a mudança de pH só

irá ocorrer após a fusão do fagossomo ao lisossomo. Contudo, esse resultado não correlaciona com o encontrado para a tomada de arginina em pH 5,0 a 25°C (figura 19), quando se observou um aumento na tomada por *AAP3*. Isto pode estar relacionado à melhor atividade dessa família de transportadores em pH ácido, como descrito para o transportador de prolina em formas promastigotas de *L. donovani* (Zilberstein and Gepstein 1993; Shaked-Mishan, Suter-Grotemeyer et al. 2006), explicando uma sensível adaptação ao pH ácido.

Nossos resultados em parasitos mantidos na temperatura de 34°C ainda indicam que a variação do pH foi suficiente para proporcionar um aumento do número de cópias do transcrito *5.1 aap3*, (figura 6). Novamente, os resultados da figura 6, em pH ácido e já na temperatura de 34°C correlacionam com uma maior atividade de captação do aminoácido (figura 21), indicando que o parasito apresenta grande capacidade de modulação de suas respostas fisiológicas e adaptação às mudanças ambientais e confirma que o momento mais importante é a mudança da temperatura.

Esse tipo de comportamento já foi visto em outros transportadores que tem a participação de prótons em sua atividade de tomada, por exemplo do transportador do aminoácido prolina nessas mesmas condições (34°C, pH 5,0) (Mazareb, Fu et al. 1999). Além do mais a adição da condição de carência de arginina, a essas condições, potencializa esse resultado (figura 7) quando há a maior expressão do mRNA *5.1 aap3* do que a encontrado nas demais condições de pH e temperatura entre os grupos privados do aminoácido.

Pelos resultados das condições simuladas, podemos supor que após o contato das formas promastigotas com o hospedeiro mamífero (temperatura de 34°C) e a formação dos fagolisossomos (pH 5,0) associadas à privação ocorre o aumento do número de transcritos *5.1 aap3*, e esse aumento correlaciona com o aumento da tomada do aminoácido em formas promastigotas nas mesmas condições (figuras 21) quando comparado o mesmo pH a 25°C. No entanto, quando analisamos a velocidade do transporte de arginina (figura 22), vemos que nas condições encontrados no fagolisossomo, não há um incremento nessa velocidade e também já não há mais resposta à privação de arginina, aparentemente indicando que já foi atingido o máximo da expressão do transportador. Novamente, esse resultado

direciona para o fato de ser a variação de temperatura um dos fatores iniciais, em condição de privação de arginina, que modulam a expressão de *AAP3* em formas promastigotas quando já em contato com o hospedeiro vertebrado.

Sabendo da variabilidade de nutrientes no interior dos vacúolos parasitóforos e da importância do aminoácido arginina na infecção (Vincendeau, Gobert et al. 2003; Wanasen, Xin et al. 2008; da Silva and Floeter-Winter 2014) procuramos entender se a captação de arginina é facilitada ou mantida na manutenção da infecção, isto é, em formas amastigotas-like.

Um rearranjo de moléculas de superfície na membrana da *Leishmania* que as tornam aptas a promover a captação de moléculas no interior dos vacúolos parasitóforos pode ser importante para a manutenção da infecção (Burchmore and Barrett 2001) na diferenciação de promastigotas para amastigotas, após a entrada do parasito no hospedeiro mamífero. Essa preparação das formas promastigotas para sobrevivência no hospedeiro vertebrado, diante das sinalizações fisiológicas de pH ácido, temperatura de 34°C e privação de arginina, pode ser encontrada quando promastigotas foram mantidos a 34°C, pH 5,0 e privados do aminoácido (figura 7). Foi possível verificar um grande aumento do número de cópias do transcrito nessas condições que simulam as formas amastigotas.

Uma vez diferenciado na forma amastigota, o parasito precisa estar apto a captar biomoléculas para sobreviver no interior dos fagolisossomos. Nesse local, a entrada de nutrientes pode ser feita através de translocadores que utilizam o potencial de membrana H^+ para incorporar aminoácidos (Vieira and Cabantchik 1995; Shaked-Mishan, Suter-Grotemeyer et al. 2006; dos Santos, Paes et al. 2009). Dessa forma, muitas dessas moléculas translocadoras estão adaptadas a um melhor funcionamento em pH ácidos (Burchmore and Barrett 2001). Nesse sentido é possível pensar que a *Leishmania* precisa apresentar a adaptação para sobreviver no interior dos macrófagos antes de atingir essa sub-localização celular. Assim, desenvolver uma pré-adaptação bem sucedida às respostas de variação de temperatura e pH (Zilberstein and Gepstein 1993; Zilberstein and Shapira 1994) é bastante importante para captação de biomoléculas e consequente sucesso da infecção, principalmente sabendo da importância da arginina no quadro da infecção, como já discorrido

anteriormente neste trabalho. Essas observações corroboram com a maior expressão do transcrito de *aap3* e correlação com a atividade da proteína em pH 5,0 e 34°C encontradas neste estudo em formas promastigotas.

A importância de uma modulação de expressão inicial, antes do final da diferenciação em amastigota, pode ser inferida quando observamos que não ocorre em formas amastigotas-like na temperatura de 34°C em pH 5,0 (figura 13) um incremento da quantidade de mRNA *5.1 aap3* observada em formas promastigotas. Além do mais, tanto os ensaios de quantificação dos transcritos como os de captação de arginina não mostraram uma correlação entre si nessas condições de temperatura e pH para as formas amastigotas-like (figura 13 e 21). Isto nos leva a postular que o protozoário já deve ter sido capaz de reconhecer a sinalização característica de troca de hospedeiro e também os sinais do novo ambiente ao qual está inserido e assim se preparar para manter sua sobrevivência e sucesso no hospedeiro mamífero, diante da disponibilidade de arginina antes ou durante a diferenciação total para as formas amastigotas. E que, uma vez diferenciada, essa expressão atinge seu auge para a manutenção do parasito no mesmo ambiente. Aqui ainda devemos lembrar que, uma vez no interior do macrófago, esse pode produzir e fornecer também as poliaminas necessárias para a replicação do parasito, pela ação da enzima arginase I do macrófago, que pode ser mantida pelo aumento da tomada de arginina pelo transportador do macrófago CAT-2B (Wanasen, MacLeod et al. 2007; da Silva and Floeter-Winter 2014)

Dando continuidade à análise do efeito das sinalizações encontradas no ciclo de vida do parasito quando retornamos parcialmente as condições de pH ácido para pH 7,0 ainda a 34°C (figura 13) é possível observar um perfil de expressão de *5.1 aap3* similar ao encontrado em formas promastigotas a 25°C em pH 7,0. Contudo, esse comportamento não interfere na tomada de arginina (figura 21) quando comparada as condições padrão de manutenção e cultivo de formas amastigotas-like, pH 5,0 e 34°C (figura 13 e 22). Além disso a privação não interfere na expressão do mRNA nessas condições. Essas observações podem indicar uma pré-adaptação das amastigotas ao romper o macrófago no hospedeiro vertebrado, e a necessidade de manter o “pool” do aminoácido até o parasito ser novamente fagocitado por outro macrófago.

Em seguida, na análise da variação da temperatura para 25°C em pH ácido, não foi possível verificar diferença de expressão relacionada a essas sinalizações, juntamente com a privação do aminoácido (figura 12), e que também essas variações não envolvem mudanças na tomada de arginina (figura 24). Como justificativa para a ausência de respostas nessas condições podemos argumentar que são condições não encontradas pelo parasito em seu ciclo de vida, ou rapidamente alteradas, quando do rompimento de macrófagos no tubo digestório do inseto vetor, quando a temperatura é alterada, e o pH 5,0 também é logo alterado para o pH 7,0 sinalizando a diferenciação de amastigota para promastigota.

De fato, uma vez que as formas amastigotas-*like* foram mantidas totalmente na condição encontrada no inseto, ou seja em pH 7,0 e 25°C o transcrito *5.1 aap3* associado à privação de arginina (figura 12) levou à modulação similar ao perfil encontrado anteriormente para as formas promastigotas nas mesmas condições. Em vista disso, nossas análises propõem uma regulação de expressão do transportador de arginina de forma cíclica que acompanha a troca de hospedeiro durante o ciclo, apesar de encontramos em culturas axênicas de amastigotas-*like* um perfil de quantificação dos transcritos menor que encontrado em formas promastigotas.

Essas variações de expressão são comuns entre as formas de vida (Rosenzweig, Smith et al. 2008) e entre as espécies de *Leishmania* (Depledge, Evans et al. 2009). Além disso, mudanças de expressão gênica nos processos de diferenciação e desenvolvimento em *Leishmania* também já são relatadas na literatura (Saxena, Lahav et al. 2007). Ainda, a estabilização do mRNA pelo aumento de sua meia-vida, conforme demonstrado por Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011) pode ser resultado de uma regulação pós – transcricional devida à associação de proteínas a motivos localizados nas regiões não traduzidas do RNA mensageiro, como observado para a estabilidade de outros mRNA's (Charest, Zhang et al. 1996; Stiles, Hicock et al. 1999; Abanades, Ramirez et al. 2009). Também se pode aventar a hipótese da existência de modificações em proteínas (Tsigankov, Gherardini et al. 2013) responsáveis pela modulação da expressão gênica, sendo essas proteínas específicas para cada etapa do ciclo do parasito, em resposta às mudanças ambientais

a que está submetido nas passagens entre o hospedeiro e o vetor. Contudo essas hipóteses ainda devem ser testadas.

Apesar de alguns resultados de quantificação de mRNA terem exibido diferenças nos grupos privados de ou suplementados com arginina, a flutuação de expressão a nível de número de transcritos, não refletiu totalmente alteração na velocidade do transporte do aminoácido nas mesmas condições. Apenas detectamos uma variação na velocidade de tomada na temperatura de 34°C e pH 7,0 em formas amastigotas-*like* (figura 27). Esse tipo de observação nos leva a propor que além do aumento da meia-vida do RNA mensageiro Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011), possa haver uma alteração na estabilidade ou atividade da própria proteína.

Em relação ao transcrito 4.7 *aap3*, nossos resultados também repetiram os resultados anteriores de Castilho-Martins, Laranjeira da Silva et al. (2011) indicando haver um número muito menor deste transcrito. Ainda neste estudo acrescentamos informações do número desse transcrito para formas promastigotas e amastigotas-*like*. Continua intrigante o achado de que o número de transcritos 4.7 *aap3* não sofra a mesma modulação como observado para o transcrito 5.1 *aap3*. Principalmente em condições 25°C e pH 7,0. No entanto, o refinamento de análise que apresentamos neste trabalho indica a existência de uma expressão diferencial daquele transcrito seguida das mudanças de temperatura e pH, tanto em formas promastigotas (figuras 8, 9 e 10) como em amastigotas-*like* (ver figuras 15, 16 e 17). No entanto, fica claro que não há contribuição desse transcrito na variação na atividade da proteína, nem uma expressão correlacionada com a fase de vida do parasito.

Genes duplicados são comuns no genoma das espécies de *Leishmania*. O transportador de prolina/alanina de *L. donovani* também se encontra duplicado e de forma que cada cópia também codifica para dois distintos transcritos (Inbar, Schlisselberg et al. 2013) ou ainda genes em clusters (8 cópias) codificantes para proteínas integrais de membranas participantes na tomada de glicose em *L. enrietti* (Stein, Cairns et al. 1990). O verdadeiro significado para essas versatilidades gênicas ainda é pouco conhecido. Entende-se muitas vezes que a duplicação acontece evolutivamente de forma que uma das cópias pode ser expressa diferencialmente entre as fases de vida do parasito ou derivar o produto por ele codificado para

desempenhar outras funções restritas, ocasionadas aleatoriamente pelas diferenças no acúmulo de mutações e pela taxa evolutiva a que as cópias são submetidas. Essas frequências de eventos evolutivos podem proporcionar mudanças nas sequências e assim contribuir para alto nível de variação (Jackson 2007).

A duplicação de *aap3* pode refletir a adaptação evolutiva da espécie para concretizar a manutenção da infecção de acordo com a fase de vida do parasito, incluindo a necessidade de arginina nos processos vitais. Dessa forma, poderia ser proposto que uma das cópias do gene poderia responder de acordo com as sinalizações ambientais encontradas nas alternância dos hospedeiros, a partir da variações resultantes da co-evolução entre parasito e hospedeiro. E ainda garantir através de uma segunda cópia do transportador *aap3* níveis basais de expressão para fornecimento mínimo de arginina independente da variação ambiental submetida. Contudo a função da duplicação do gene que codifica o transportador *AAP3* ainda não foi bem esclarecida. O significado biológico e evolutivo da existência da duplicação do gene que codifica o transportador de arginina, pode ser especulado se considerarmos que 98% da ORF é conservada entre as cópias, um indicativo que o produto de ambas as cópias é extremamente semelhante e que assim é difícil supor o desempenho de funções distintas. Isso também pode ser corroborado pela inexistência de uma possível alternância da abundancia dos transcritos ao longo do ciclo de vida do parasito. No entanto, as diferenças significativas são encontradas nas sequências das regiões 5' e 3'UTR dos transcritos de cada cópia. São essas diferenças é que devem ser exploradas, principalmente na busca de motivos de regulação de meia-vida ou de manutenção da tradução (Charest, Zhang et al. 1996; Boucher, Wu et al. 2002; McNicoll, Muller et al. 2005; Abanades, Ramirez et al. 2009). A existência desses motivos podem estar relacionada às sinalizações que induziram as diferenças de expressão observadas neste trabalho.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A temperatura e o pH associados à privação de arginina podem representar sinais ambientais capazes de modular positivamente a expressão de *AAP3* em *L.(L.) amazonensis*.
- Seleção de amastigotas-like a partir de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L.(L.) amazonensis*.
- As duas cópias do gene que codifica *AAP3*, organizadas em *tandem* no genoma de *Leishmania* apresentam regulação diferencial dos seus transcritos. O mensageiro *5.1 aap3* apresenta uma maior variação em relação a alterações de pH, temperatura e privação do aminoácido, do que o transcrito da cópia *4.7 aap3*, tanto em formas promastigotas como em amastigotas-like.
- As formas promastigotas apresentam regulação do transcrito *5.1 aap3* sensível à oferta de arginina a 25°C e pH 7,0. Esse comportamento é um indicativo de que essas formas são sinalizadas com a privação de arginina em pH 7,0 e 25°C, provavelmente no tubo digestório do inseto vetor, após o esgotamento do repasto sanguíneo.
- A elevação da temperatura, ainda em pH 7,0 associada à privação de arginina leva a um aumento no número de transcritos *5.1 aap3*, em formas promastigotas, indicando que temperatura pode estar atuando como um primeiro sinal regulador. Essas condições equivalem à entrada do parasito no hospedeiro vertebrado. Ainda, o aumento do número de transcritos correlaciona com o aumento na atividade de transporte da proteína *AAP3* nessas formas.
- O tratamento a 34°C e pH 5,0 leva a um maior incremento no número de cópias do transcrito *5.1 aap3* quando essas condições são associadas à privação de arginina em formas promastigotas. Contudo, não ocorre um incremento na atividade do transporte de arginina em formas promastigotas

mantidas nestas condições, quando comparadas ao tratamento nessa mesma temperatura e pH 7,0.

- A acidificação do meio na temperatura de 25°C modula apenas a atividade da proteína em formas promastigotas, o que pode ser um indicativo de que *AAP3* tenha uma atividade fenotípica ótima em pH baixo. Assim, a mudança do pH pode ser um sinalizador apenas para a atividade protéica e não influencie na estabilidade do RNA mensageiro que codifica a proteína.
- As formas amastigotas-*like* mostraram menor quantidade dos RNA's mensageiros de ambas as cópias 5.1 *aap3* e 4.7 *aap3* em comparação com formas promastigotas, em qualquer dos tratamentos a que foram submetidas.
- As formas amastigotas-*like* mantidas a 34°C e pH 5,0 não apresentaram o mesmo padrão de transcritos de *aap3* daquele observado para as formas promastigotas nas mesmas condições. Isso pode ser um indicativo de que a resposta adaptativa se dá em formas promastigotas, durante a entrada no hospedeiro vertebrado ou durante a diferenciação para as formas amastigotas. Uma vez diferenciadas, essas formas estão adaptadas para a vida intracelular, expressando o fenótipo de expressão máxima de *AAP3*.
- As formas amastigotas-*like* a 34°C apresentam modulação da tomada de arginina quando há a reversão do pH para a condição do vetor, ou seja de pH 5,0 para pH 7,0. Essa modulação correlaciona com o aumento no número de transcritos. Esse comportamento de resposta pode ser devido a uma regulação cíclica entre as formas de vida durante a alternância dos microambientes, e pode significar uma pré-adaptação à entrada nos diferentes hospedeiros e assim manutenção da infecção e do ciclo de vida do parasito.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abanades, D. R., L. Ramirez, et al. (2009). "Key role of the 3' untranslated region in the cell cycle regulated expression of the *Leishmania infantum* histone H2A genes: minor synergistic effect of the 5' untranslated region." BMC Mol Biol **10**: 48.
- Agabian, N. (1990). "Trans splicing of nuclear pre-mRNAs." Cell **61**(7): 1157-1160.
- Alcolea, P. J., A. Alonso, et al. (2010). "Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage." Int J Parasitol **40**(13): 1497-1516.
- Almeida, R., B. J. Gilmartin, et al. (2004). "Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome." Mol Biochem Parasitol **136**(1): 87-100.
- Antoine, J. C., E. Prina, et al. (1998). "The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages." Trends Microbiol **6**(10): 392-401.
- Arruda, L. V. (2013). Desenvolvimento de plasmídio para expressão protéica dependente da fase do ciclo de vida em Leishmania. Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.
- Bahrami, S., G. R. Hatam, et al. (2011). "In vitro cultivation of axenic amastigotes and the comparison of antioxidant enzymes at different stages of *Leishmania tropica*." Trop Biomed **28**(2): 411-417.
- Balana-Fouce, R., E. Calvo-Alvarez, et al. (2012). "Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis." Mol Biochem Parasitol **181**(2): 85-93.
- Balanco, J. M., E. M. Pral, et al. (1998). "Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages." Parasitology **116** (Pt 2): 103-113.
- Bangs, J. D., P. F. Crain, et al. (1992). "Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides." J Biol Chem **267**(14): 9805-9815.

- Barak, E., S. Amin-Spector, et al. (2005). "Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response." Mol Biochem Parasitol **141**(1): 99-108.
- Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." Int J Parasitol **37**(10): 1097-1106.
- Bates, P. A., C. D. Robertson, et al. (1992). "Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms." Parasitology **105** (Pt 2): 193-202.
- Beetham, J. K., K. S. Myung, et al. (1997). "Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form." J Biol Chem **272**(28): 17360-17366.
- Boucher, N., Y. Wu, et al. (2002). "A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element." J Biol Chem **277**(22): 19511-19520.
- Britto, C., C. Ravel, et al. (1998). "Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes." Gene **222**(1): 107-117.
- Burchmore, R. J. and M. P. Barrett (2001). "Life in vacuoles-nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes." Int J Parasitol **31**(12): 1311-1320.
- Castilho-Martins, E. A., M. F. Laranjeira da Silva, et al. (2011). "Axenic *Leishmania amazonensis* promastigotes sense both the external and internal arginine pool distinctly regulating the two transporter-coding genes." PLoS One **6**(11): e27818.
- Charest, H., W. W. Zhang, et al. (1996). "The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region." J Biol Chem **271**(29): 17081-17090.
- Clayton, C. and M. Shapira (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias." Mol Biochem Parasitol **156**(2): 93-101.
- Closs, E. I., A. Simon, et al. (2004). "Plasma membrane transporters for arginine." J Nutr **134**(10 Suppl): 2752S-2759S; discussion 2765S-2767S.
- da Silva, M. F. and L. M. Floeter-Winter (2014). "Arginase in *Leishmania*." Subcell Biochem **74**: 103-117.
- Darlyuk, I., A. Goldman, et al. (2009). "Arginine homeostasis and transport in the human pathogen *Leishmania donovani*." J Biol Chem **284**(30): 19800-19807.
- Depledge, D. P., K. J. Evans, et al. (2009). "Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds." PLoS Negl Trop Dis **3**(7): e476.

- dos Santos, M. G., L. S. Paes, et al. (2009). "Biochemical characterization of serine transport in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*." Mol Biochem Parasitol **163**(2): 107-113.
- Gunzl, A. (2010). "The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified?" Eukaryot Cell **9**(8): 1159-1170.
- Gupta, N., N. Goyal, et al. (2001). "In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*." Trends Parasitol **17**(3): 150-153.
- Haile, S. and B. Papadopoulou (2007). "Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa." Curr Opin Microbiol **10**(6): 569-577.
- Hasne, M. P. and B. Ullman (2005). "Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*." J Biol Chem **280**(15): 15188-15194.
- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, et al. (1987). "Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite." Science **235**(4787): 473-476.
- Hodgkinson, V. H., L. Soong, et al. (1996). "*Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms." Exp Parasitol **83**(1): 94-105.
- Holzer, T. R., W. R. McMaster, et al. (2006). "Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol **146**(2): 198-218.
- Inbar, E., D. Schlisselberg, et al. (2013). "A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses." Biochem J **449**(2): 555-566.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-442.
- Jackson, A. P. (2007). "Origins of amino acid transporter loci in trypanosomatid parasites." BMC Evol Biol **7**: 26.
- Kaye, P. M. and T. Aebischer (2011). "Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine." Clin Microbiol Infect **17**(10): 1462-1470.
- Kramer, S. (2012). "Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids." Mol Biochem Parasitol **181**(2): 61-72.
- Kropf, P., J. M. Fuentes, et al. (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo." FASEB J **19**(8): 1000-1002.

- Lainson, R. (2010). Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev Pan-Amaz Saude. **1(2)**: 13-32.
- LeBowitz, J. H., H. Q. Smith, et al. (1993). "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*." Genes Dev **7(6)**: 996-1007.
- Lukes, J., T. Skalicky, et al. (2014). "Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates." Mol Biochem Parasitol.
- Mayer, M. G. and L. M. Floeter-Winter (2005). "Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity." Mem Inst Oswaldo Cruz **100(5)**: 501-513.
- Mazareb, S., Z. Y. Fu, et al. (1999). "Developmental regulation of proline transport in *Leishmania donovani*." Exp Parasitol **91(4)**: 341-348.
- McConville, M. J. and T. Naderer (2011). "Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*." Annu Rev Microbiol **65**: 543-561.
- McNicoll, F., M. Muller, et al. (2005). "Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*." J Biol Chem **280(42)**: 35238-35246.
- Mishra, K. K., T. R. Holzer, et al. (2003). "A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* Paraflagellar rod gene PFR2." Eukaryot Cell **2(5)**: 1009-1017.
- Mylers, P. J. and K. D. Stuart (2000). "Recent developments from the *Leishmania* genome project." Curr Opin Microbiol **3(4)**: 412-416.
- Nasereddin, A., C. Schweynoch, et al. (2010). "Characterization of *Leishmania (Leishmania) tropica* axenic amastigotes." Acta Trop **113(1)**: 72-79.
- Nourbakhsh, F., S. R. Uliana, et al. (1996). "Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **76(1-2)**: 201-213.
- Qadoumi, M., I. Becker, et al. (2002). "Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **70(8)**: 4638-4642.
- Rafati, S., N. Hassani, et al. (2006). "Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis." Clin Vaccine Immunol **13(10)**: 1104-1110.
- Real, F., R. O. Vidal, et al. (2013). "The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models." DNA Res **20(6)**: 567-581.
- Requena, J. M. (2011). "Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 2069-2085.

- Rey, L. (1992). Bases da Paarasotologia Médica Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Roberts, S. C., M. J. Tancer, et al. (2004). "Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants." J Biol Chem **279**(22): 23668-23678.
- Rochette, A., F. McNicoll, et al. (2005). "Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania spp.*" Mol Biochem Parasitol **140**(2): 205-220.
- Rochette, A., F. Raymond, et al. (2009). "Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*." Mol Biochem Parasitol **165**(1): 32-47.
- Rosenzweig, D., D. Smith, et al. (2008). "Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage." FASEB J **22**(2): 590-602.
- Ross, R. (1903). "Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan." Br Med J **2**(2237): 1261-1262.
- Saar, Y., A. Ransford, et al. (1998). "Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **95**(1): 9-20.
- Saxena, A., T. Lahav, et al. (2007). "Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation." Mol Biochem Parasitol **152**(1): 53-65.
- Schneider, P., J. P. Rosat, et al. (1993). "Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major*." Biochem J **295** (Pt 2): 555-564.
- Shaked-Mishan, P., M. Suter-Grotemeyer, et al. (2006). "A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*." Mol Microbiol **60**(1): 30-38.
- Stein, D. A., B. R. Cairns, et al. (1990). "Developmentally regulated transporter in *Leishmania* is encoded by a family of clustered genes." Nucleic Acids Res **18**(6): 1549-1557.
- Stiles, J. K., P. I. Hicock, et al. (1999). "Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*." Ann Trop Med Parasitol **93**(8): 781-807.
- Tabor, C. W. and H. Tabor (1984). "Polyamines." Annu Rev Biochem **53**: 749-790.
- Teixeira, M. C., R. de Jesus Santos, et al. (2002). "A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species." Parasitol Res **88**(11): 963-968.

- Torfs, C. P., T. F. Bateson, et al. (1992). "Anorectal and esophageal anomalies with Down syndrome." Am J Med Genet **44**(6): 847; author reply 848-850.
- Tsigankov, P., P. F. Gherardini, et al. (2013). "Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif." J Proteome Res **12**(7): 3405-3412.
- Vieira, L. L. and Z. I. Cabantchik (1995). "Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H(+)-pump generated membrane potential." Mol Biochem Parasitol **75**(1): 15-23.
- Vincendeau, P., A. P. Gobert, et al. (2003). "Arginases in parasitic diseases." Trends Parasitol **19**(1): 9-12.
- Wanasen, N., C. L. MacLeod, et al. (2007). "L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages." Infect Immun **75**(6): 2802-2810.
- Wanasen, N. and L. Soong (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection." Immunol Res **41**(1): 15-25.
- Wanasen, N., L. Xin, et al. (2008). "Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection." Int J Parasitol **38**(3-4): 417-429.
- Wincker, P., C. Ravel, et al. (1996). "The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species." Nucleic Acids Res **24**(9): 1688-1694.
- Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." Biochem J **336** (Pt 1): 1-17.
- Wu, Y., Y. El Fakhry, et al. (2000). "A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins." Mol Biochem Parasitol **110**(2): 345-357.
- Zilberstein, D. and A. Gepstein (1993). "Regulation of L-proline transport in *Leishmania donovani* by extracellular pH." Mol Biochem Parasitol **61**(2): 197-205.
- Zilberstein, D. and M. Shapira (1994). "The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites." Annu Rev Microbiol **48**: 449-470.