

Emerson Augusto Castilho Martins

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

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

São Paulo

2011

Emerson Augusto Castilho Martins

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

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

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientadora: Dra. Lucile Maria
Floeter-Winter

São Paulo

2011

Martins, Emerson A. C.

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

146 páginas

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

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

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

Lista de Preferências

Alegrias, as desmedidas.
Dores, as não curtidas.

Casos, os inconcebíveis.
Conselhos, os inexequíveis.

Meninas, as veras.
Mulheres, insinceras.

Orgasmos, os múltiplos.
Ódios, os mútuos.

Domicílios, os passageiros.
Adeuses, os bem ligeiros.

Artes, as não rentáveis.
Professores, os enterráveis.

Prazeres, os transparentes.
Projetos, os contingentes.

Inimigos, os delicados.
Amigos, os estouvados.

Cores, o rubro.
Meses, outubro.

Elementos, os fogos.
Divindades, o logos.

Vidas, as espontâneas.
Mortes, as instantâneas.

Bertolt Brecht
Trad. Paulo César Souza

Agradecimentos

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

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

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

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

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

À FAPESP, pelo financiamento deste trabalho.

Índice

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

3.3.7.2	Ligação de fragmentos de DNA em plasmídeo.....	25
Vetores utilizados.....		25
Ligação de DNA.....		26
3.3.7.3	Transformação de bactérias competentes.....	26
Preparação de bactérias competentes.....		26
Transformação com plasmídeo e cosmídeo.....		27
3.3.7.4	Transfecção de macrófagos J774.....	27
Curva de ação de neomicina em macrófagos J774.....		27
Transfecção e seleção clonal.....		27
3.3.7.5	Transfecção de Leishmania.....	28
3.3.8	Sequenciamento de DNA.....	28
4	Resultados.....	30
4.1	Purificação de fagolisossomos.....	30
4.1.1	Avaliação da infecção.....	30
4.1.2	Purificação por gradiente de sacarose.....	32
4.1.3	Purificação por citometria de fluxo com “sorting”.....	36
4.1.4	Construção de macrófago com marcação de membrana de fagolisossomo... ..	40
4.1.5	Purificação de fagolisossomos pEGFP-Lamp1.....	45
4.2	Caracterização do gene do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	46
4.2.1	Busca inicial.....	46
4.2.2	Varredura da biblioteca de cosmídeo.....	49
4.2.3	Sequenciamento da Fase Aberta de Leitura (ORF).....	55
4.2.4	Mapeamento da região 5'UTR	58
4.2.5	Caracterização da região 3'UTR.....	64
4.2.6	Construção para transfecção em <i>L. (L.) amazonensis</i>	70
4.3	Avaliação da expressão dos genes.....	72
4.3.1	Quantificação de mRNA.....	72
4.3.2	Quantificação do mRNA que codifica o transportador de arginina ao longo da curva de crescimento.....	73
4.3.3	Estabilidade do mRNA do transportador.....	75
4.4	Fisiologia do transporte de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	76
4.4.1	Caracterização fisiológica do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	76
4.4.2	Resposta à privação de arginina.....	78
4.4.3	Influência da interrupção da via da arginase no transporte de arginina.....	80
5	Discussão.....	82
5.1	Tentativas de padronização de purificação de fagossomos e ensaios de tomada de arginina.....	82
5.2	Caracterização do gene que codifica o transportador de arginina.....	87
5.3	Regulação do transporte e da expressão do gene que codifica o transportador de arginina.....	89
6	Conclusões.....	96
7	Resumo.....	98
8	Abstract.....	100
9	Referências Bibliográficas.....	101
	Anexo I.....	112
	Anexo II.....	115
	Anexo III.....	119

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema geral do metabolismo de L-arginina em mamíferos.....	7
Figura 2. Representação do metabolismo de L-arginina na interação entre <i>Leishmania</i> e macrófago.....	11
Figura 3. Teste de infectividade de <i>L. (L.) amazonensis</i> em macrófagos J774.....	31
Figura 4. Detalhes das infecções de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> EGFP em J774.....	31
Figura 5. Isolamento de fagolisossomos por gradiente de sacarose.....	32
Figura 6. Contaminação de fagolisossomos por promastigotas livres.....	33
Figura 7. Avaliação da integridade das organelas purificadas.....	34
Figura 8. Fagolisossomo purificado corado com Neutral Red.....	35
Figura 9. Citometria de fluxo de fagolisossomos purificados por gradiente de sacarose.....	36
Figura 10. Citometria de fluxo pré-“sorting”.....	37
Figura 11. Análise da amostra separada em R2.....	38
Figura 12. Análise da amostra separada em R3.....	38
Figura 13. Microscopia de fagolisossomos purificados com citometria de fluxo.....	39
Figura 14. Avaliação de especificidade de marcação de compartimentos ácidos.....	40
Figura 15. Estratégia de construção do plasmídeo pEGFP-Lamp.....	41
Figura 16. Avaliação de funcionalidade de pEGFP-C1 em macrófagos.....	42
Figura 17. Sequências de Lamp1.....	43
Figura 18. Marcação de GFP-Lamp1 indica a membrana do fagossomo.....	44
Figura 19. Curva dose-resposta de neomicina em macrófagos.....	44
Figura 20. Avaliação de marcação pEGFP-Lamp1 em citômetro de fluxo.....	45
Figura 21. Avaliação microscópica de pEGFP-Lamp1 em fagolisossomos.....	46
Figura 22. PCR para isolamento do fragmento de DNA codificador do transportador de arginina.....	47
Figura 23. Confirmação de fragmento de DNA contendo o gene que codifica o transportador de arginina.....	48
Figura 24. Sequência de AAP3 de <i>L. (L.) donovani</i>	49
Figura 25. Varredura da biblioteca de cosmídeos.....	50
Figura 26. “Southern blot” para transportador de arginina.....	51
Figura 27. Confirmação de clones com fragmento esperado.....	52
Figura 28. Sequência parcial do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	53
Figura 29. Oligonucleotídeos para obtenção de complemento da sequência do transportador.....	54
Figura 30. Sequência completa da ORF que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	57
Figura 31. Obtenção da região 5'UTR do gene do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	58
Figura 32. Digestão de DNA de “mini-prep” para verificar presença de inserto.....	59
Figura 33. Sequência do fragmento menor correspondente à região 5'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	60
Figura 34. Sequência do fragmento maior correspondente à região 5'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62
Figura 35. Alinhamento de regiões 5'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	63
Figura 36. Fragmentos contendo a região 3'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	65
Figura 37. Sequência parcial da região 3'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	66
Figura 38. Sequência de nucleotídeos da região 3'UTR do gene que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
Figura 39. Possível orientação dos genes do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	68
Figura 40. Sequência de fragmento entre as duas cópias do gene que codifica o transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	69
Figura 41. Estratégia de construção de plasmídeo para obter o nocaute de transportador de arginina em <i>L. (L.) amazonensis</i>	71

Figura 42. Sequência da construção para nocaute de transportador de arginina em <i>L. (L.) amazonensis</i>	71
Figura 43. Fragmentos amplificados para PCR quantitativo em 5'UTR do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	72
Figura 44. Curvas de calibração para PCR quantitativo de RNA codificador do transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i>	73
Figura 45. Expressão de mRNA de transportador de arginina de <i>L. (L.) amazonensis</i> ao longo da curva de crescimento de promastigotas.....	74
Figura 46. Caracterização do mRNA codificador do transportador de arginina em <i>L. (L.) amazonensis</i>	75
Figura 47. Decaimento de mRNA de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	76
Figura 48. Tomada de arginina em função do tempo por promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> ..	77
Figura 49. Curva de tomada de arginina em função da concentração do aminoácido.....	78
Figura 50. Avaliação da resposta de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em fase log intermediária à privação de arginina.....	79
Figura 51. Tomada de arginina por promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em duas fases de crescimento.....	79
Figura 52. Tomada de arginina em mutantes de <i>L. (L.) amazonensis</i> nulos para arginase.....	80
Figura 53. Tomada de arginina em mutantes arg-.....	81

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais

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

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

Organismos do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos responsáveis por um conjunto de quadros clínicos que constituem doenças genericamente conhecidas como Leishmaniose. Por ano, cerca de 70.000 pessoas no mundo morrem de leishmaniose, o que a coloca como segunda protozoose que mais registra óbitos, sendo superada apenas pela malária (Alvar e col. 2006). Ocorre

como doença endêmica em 88 países em áreas tropicais e subtropicais, e estima-se que haja cerca de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo, cerca de 2 milhões de novos casos por ano, com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (Desjeux 1996). Esses números podem estar subestimados porque a parasitose atinge principalmente o 3o. Mundo com maior ocorrência em áreas rurais, onde o acesso da população ao atendimento médico é difícil, o diagnóstico usa técnicas que não são capazes de identificar todas as fases e formas da doença e nem sempre são registrados os casos diagnosticados (Desjeux 2004).

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

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

1.2 Ciclo de vida

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

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

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

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

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

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

1.3 Mecanismos de regulação gênica em *Leishmania*

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

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

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

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

2007; Haile e Papadopoulou 2007).

1.4 Metabolismo de arginina na infecção

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

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

parasita (Sacks e Anderson 2004).

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

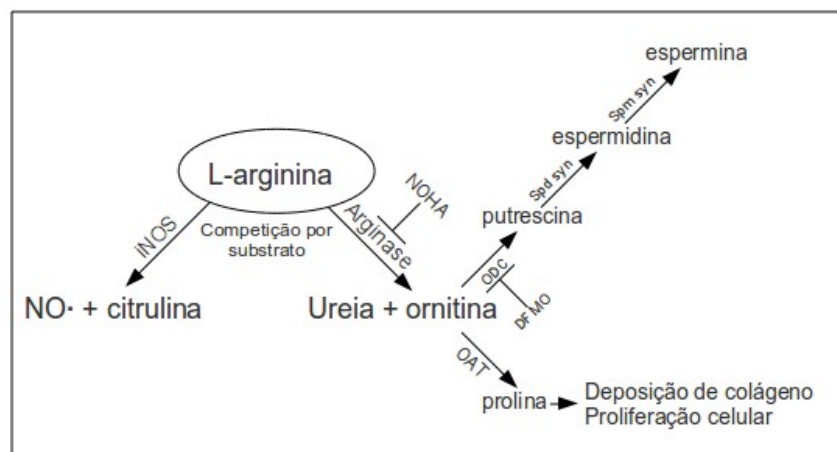


Figura 1. Esquema geral do metabolismo de L-arginina em mamíferos. Representação das principais vias de uso e produção de arginina, citrulina e ornitina, adaptado de Das e col. (2010). Inibição identificada pelo símbolo ⊥; DFMO: difluorometil-ornitina; iNOS: sintase induzível de óxido nítrico; NO: óxido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

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

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

1.5 Transporte de L-arginina

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

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

De maneira interessante, o estímulo de macrófagos infectados por IFN- γ juntamente com LPS provoca uma diminuição na infecção, relacionado com maior produção de NO pelas células hospedeiras, mas estímulo somente com IFN- γ causa um aumento na quantidade de parasitas (Qi e col. 2004). Quando a resposta de

transporte de arginina ao estímulo é avaliada, vemos que o estímulo somente com IFN- γ não é capaz de promover o aumento do influxo de arginina (Visigalli e col. 2004). O aumento na carga parasitária deve ocorrer porque, para que a explosão respiratória ocorra, deve haver o aumento da transcrição do gene da iNOS, estimulado por IFN- γ com LPS ou IFN- γ com TNF- α e, necessariamente, o aumento da expressão do gene para o CAT2B, mediado por NF- κ B (Visigalli e col. 2004; Yeramian e col. 2006). Embora haja relato de NF- κ B ativar simultaneamente a expressão de iNOS e de CAT2B (Hammermann e col. 2000), aparentemente a ativação da transcrição de CAT2B por *Leishmania* ocorre por meio de ativação de receptores “toll-like” associado à ativação do complexo p50/p50 NF- κ B, diminuindo a quantidade de p65 e causando, simultaneamente, um aumento na expressão do transportador de arginina e repressão da expressão de iNOS (Tuon e col. 2008; Calegari-Silva e col. 2009). Como a ativação somente com IFN- γ leva a um aumento do influxo de arginina no macrófago sem a ativação da iNOS, e um paralelo aumento na quantidade de *Leishmania* nos macrófagos (Wanassen e col. 2007), especulamos que o parasita leve ao influxo de arginina pela célula hospedeira e esse influxo seja desviado para o parasita, disponibilizado para sua sobrevivência e replicação.

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

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

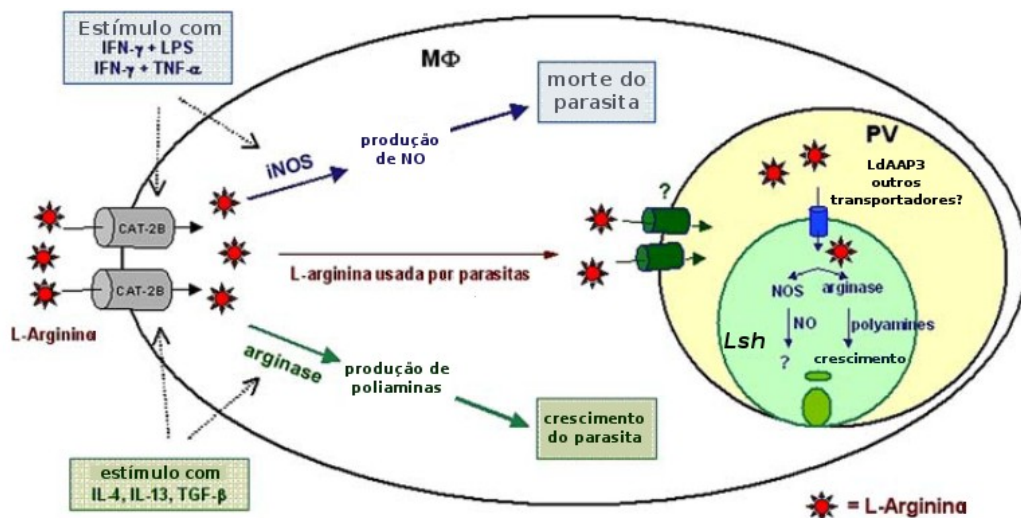


Figura 2. Representação do metabolismo de L-arginina na interação entre *Leishmania* e macrófago. A ativação do tipo clássica por citocinas Th1 nos macrófagos (IFN γ +LPS ou IFN γ +TNF- α) leva à ativação de iNOS e aumento da expressão de CAT2B, levando à morte do parasita. Já o estímulo com IL-4, IL-13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

2 Objetivos

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

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

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

6 Conclusões

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

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

7 Resumo

Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas digenéticos, com uma fase no tubo digestório de um hospedeiro invertebrado (promastigota), e uma fase parasita intracelular de macrófagos (amastigotas). Estudar a demanda de L-arginina no parasita é interessante, uma vez que o aminoácido é indispensável para a sobrevivência do parasita e, ao mesmo tempo, serve de substrato para a produção de óxido nítrico, principal composto microbicida dos macrófagos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o transporte de arginina em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* do ponto de vista fisiológico e caracterizar o gene que codifica o transportador do aminoácido, bem como a regulação da sua expressão em resposta a diferentes condições biológicas. Para medir o influxo de L-arginina em fagolisossomos, utilizamos macrófagos J774 infectados com *L. (L.) amazonensis* e desenvolvemos uma metodologia com citometria de fluxo com “sorting” para a purificação da organela. Validamos microscopicamente a presença do parasita na organela por sua fluorescência, e avaliamos a integridade da membrana externa dessa com marcador de pH ácido. Paralelamente, o gene que codifica o transportador de arginina do parasita foi caracterizado. Foram encontradas duas cópias em tandem que produzem dois transcritos (5.1AAP3 e 4.7AAP3), cujas regiões 5'UTR e 3'UTR são diferentes. Por meio de PCR quantitativo em tempo real, avaliamos a expressão desses transcritos e verificamos que 5.1AAP3 é mais expressa ao longo do desenvolvimento do parasita, com um máximo em fase estacionária. A determinação da meia-vida dos mRNA das duas cópias indicou uma duração de $32,6 \pm 5,0$ min para o mRNA de 4.7AAP3, enquanto que o de 5.1AAP3 não apresentou decaimento até 180 min do estudo, evidenciando que a estabilidade maior pode ser a razão de sua maior abundância. A submissão de parasitas à privação de arginina levou a aumento

na tomada do aminoácido concomitante ao aumento do transcrito 5.1AAP3. Mutantes nulos de arginase submetidos à privação de arginina respondem com uma taxa de incorporação mais baixa em relação aos parasitas selvagens, e mantêm a resposta à privação mesmo com os parasitas em fase estacionária, diferente do observado nos parasitas selvagens. Esse conjunto de resultados nos levou a sugerir que a expressão do transportador pode ser regulada pela estabilidade do mRNA, e que o “pool” de arginina interno ao parasita pode controlar, num mecanismo de retroalimentação negativo, a expressão de seu transportador.

8 Abstract

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

9 Referências Bibliográficas

- Akopyants, N. S., Kimblin, N. e col. (2009). "Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector" Science **324**(5924): 265-268.
- Allen, R. D. e A. K. Fok (1983). "Nonlysosomal vesicles (acidosomes) are involved in phagosome acidification in *Paramecium*" J Cell Biol **97**(2): 566-570.
- Altschul, S. F., Gish, W. e col. (1990). "Basic local alignment search tool" J Mol Biol **215**(3): 403-410.
- Alvar, J., Yactayo, S. e col. (2006). "Leishmaniasis and poverty" Trends Parasitol **22**(12): 552-557.
- Archer, S., Queiroz, R. e col. (2008). "Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways" Methods Enzymol **448**(1): 359-377.
- Assreuy, J., Cunha, F. Q. e col. (1994). "Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*" Eur J Immunol **24**(3): 672-676.
- Balanco, J. M. F., Moreira, M. E. e col. (2001). "Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity" Curr Biol **11**(23): 1870-1873.
- Baldwin, E. (1935). "Problems of nitrogen catabolism in invertebrates. III. Arginase in the invertebrates, with a new method for its determination." Biochem J **29**(1): 252-262.
- Boothroyd, J. C. e G. A. Cross (1982). "Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end" Gene **20**(2): 281-289.
- Boucher, J. L., Moali, C. e col. (1999). "Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase

- inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization" Cell Mol Life Sci **55**(8-9): 1015-1028.
- Boulais, J., Trost, M. e col. (2010). "Molecular characterization of the evolution of phagosomes" Mol Syst Biol **6**(1): 423.
- Bruhat, A., Jousse, C. e col. (1997). "Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels" J Biol Chem **272**(28): 17588-17593.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems" J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Button, L. L., Russell, D. G. e col. (1989). "Genes encoding the *major* surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed" Mol Biochem Parasitol **32**(2-3): 271-283.
- Calegari-Silva, T. C., Pereira, R. M. S. e col. (2009). "NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection" Immunol Lett **127**(1): 19-26.
- Camargo, E. P., Sbravate, C. e col. (1992). "Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids" J Parasitol **78**(1): 40-48.
- Camargo, E. P. (1999). "*Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit" Adv Parasitol **42**(1): 29-112.
- Chakraborty, P., Sturgill-Koszycki, S. e col. (1994). "Isolation and characterization of pathogen-containing phagosomes" Methods Cell Biol **45**(1): 261-276.
- Charlab, R., Valenzuela, J. G. e col. (1999). "Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*" Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15155-15160.
- Clarke, M. e L. Maddera (2006). "Phagocyte meets prey: uptake, internalization, and

- killing of bacteria by *Dictyostelium amoebae*" Eur J Cell Biol **85**(9-10): 1001-1010.
- Clayton, C. e M. Shapira (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias" Mol Biochem Parasitol **156**(2): 93-101.
- Closs, E. I., Boissel, J. e col. (2006). "Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs)" J Membr Biol **213**(2): 67-77.
- Cruz, A., Coburn, C. M. e col. (1991). "Double targeted gene replacement for creating null mutants" Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7170-7174.
- Cunningham, M. L., Titus, R. G. e col. (2001). "Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin" Science **292**(5515): 285-287.
- da Silva, E. R., Castilho, T. M. e col. (2002). "Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction" Int J Parasitol **32**(6): 727-737.
- da Silva, E. R. , da Silva, M. F. L. et al. (2008). "Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme" Mol Biochem Parasitol **159**(2): 104-111.
- da Silva, M. F. L. "Relação entre a localização celular da enzima arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel na infecção de macrófagos murinos". Tese (Doutorado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2010.
- Darlyuk, I., Goldman, A. e col. (2009). "Arginine homeostasis and transport in the human pathogen *Leishmania donovani*" J Biol Chem **284**(30): 19800-19807.
- Das, P., Lahiri, A. e col. (2010). "Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator" PLoS Pathog **6**(6): e1000899.

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

Arch Microbiol **185**(5): 348-354.

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

- in target cells" J Immunol **138**(2): 550-565.
- Hsiao, L. L., Howard, R. J. e col. (1991). "Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*" Biochem J **274** (1)(1): 121-132.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C. e col. (2001). "The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages" J Exp Med **193**(6): 777-784.
- Iyengar, R., Stuehr, D. J. e col. (1987). "Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst" Proc Natl Acad Sci U S A **84**(18): 6369-6373.
- Jousse, C., Averous, J. e col. (2004). "Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms" Biochem Biophys Res Commun **313**(2): 447-452.
- Kandpal, M., Fouce, R. B. e col. (1995). "Kinetics and molecular characteristics of arginine transport by *Leishmania donovani* promastigotes" Mol Biochem Parasitol **71**(2): 193-201.
- Kapler, G. M., Coburn, C. M. e col. (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression" Mol Cell Biol **10**(3): 1084-1094.
- Kima, P. E. e W. Dunn (2005). "Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate *Leishmania* parasitophorous vacuoles" Microb Pathog **38**(4): 139-145.
- Kooter, J. M., De Lange, T. e col. (1984). "Discontinuous synthesis of mRNA in trypanosomes" EMBO J **3**(10): 2387-2392.
- Kropf, P., Fuentes, J. M. e col. (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo" FASEB J **19**(8): 1000-1002.
- Lainson, R. e J. J. Shaw (1987). Evolution, classification and geographical

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

Landfear, S. M., McMahon-Pratt, D. e col. (1983). "Tandem arrangement of tubulin genes in the protozoan parasite *Leishmania enriettii*" Mol Cell Biol **3**(6): 1070-1076.

Liew, F. Y., Millott, S. e col. (1990). "Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine" J Immunol **144**(12): 4794-4797.

Liew, F. Y., Xu, D. e col. (1999). "Immune effector mechanism in parasitic infections" Immunol Lett **65**(1-2): 101-104.

Marletta, M. A., Yoon, P. S. e col. (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate" Biochemistry **27**(24): 8706-8711.

Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D. e col. (2004). "Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3" Eukaryot Cell **3**(2): 506-517.

Martinez, F. O., Helming, L. e col. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective" Annu Rev Immunol **27**(1): 451-483.

Martins, E. A. C. e P. R. Maciel Filho (2010). "Mecanismos de expressão gênica em eucariotos" Revista da Biologia **4**(1): 1-5.

Mayer, M. G. e L. M. Floeter-Winter (2005). "Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity" Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(5): 501-513.

McConville, M. J., de Souza, D. e col. (2007). "Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes" Trends Parasitol **23**(8): 368-375.

McNally, K. P. e N. Agabian (1992). "*Trypanosoma brucei* spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo" Mol Cell Biol **12**(11): 4844-4851.

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

- following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva" BMC Immunol **9**(1): 12.
- Monnerat, S., Martinez-Calvillo, S. e col. (2004). "Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*" Mol Biochem Parasitol **134**(2): 233-243.
- Muleme, H. M., Reguera, R. M. e col. (2009). "Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis" J Immunol **183**(12): 8068-8076.
- Murray, H. W. (1982). "Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis - II Oxygen- dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes" Journal of Immunology **129**(1): 351-357.
- Murray, H. W. e D. M. Cartelli (1983). "Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity" J Clin Invest **72**(1): 32-44.
- Murray, H. W., Szuro-Sudol, A. e col. (1989). "Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages" Infect Immun **57**(3): 845-849.
- Murray, H. W. e C. F. Nathan (1999). "Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*" J Exp Med **189**(4): 741-746.
- Myler, P. J., Audleman, L. e col. (1999). "*Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes" Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2902-2906.
- Naderer, T. e M. J. McConville (2008). "The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective" Cell Microbiol **10**(2): 301-308.
- Niedbala, W., Wei, X. Q. e col. (1999). "Effects of nitric oxide on the induction and

- differentiation of Th1 cells" Eur J Immunol **29**(8): 2498-2505.
- Nourbakhsh, F., Uliana, S. R. e col. (1996). "Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*" Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 201-213.
- Peters, N. C., Egen, J. G. e col. (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies" Science **321**(5891): 970-974.
- Qi, H., Ji, J. e col. (2004). "Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis" Infect Immun **72**(2): 988-995.
- Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R. e col. (2009). "*Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice" Mol Biochem Parasitol **165**(1): 48-56.
- Rey, L. (2002). Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Rogers, M., Kropf, P. e col. (2009). "Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival" PLoS Pathog **5**(8): e1000555.
- Ross, R. (1903). "Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan" Br Med J **2**(2237): 1261-1262.
- Ryan, K. A., Dasgupta, S. e col. (1993). "Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*" Gene **131**(1): 145-150.
- Sacks, D. L. e P. V. Perkins (1984). "Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes" Science **223**(4643): 1417-1419.
- Sacks, D. e C. Anderson (2004). "Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice" Immunol Rev **201**(1): 225-238.

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

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