

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Construção de Ferramentas Moleculares para Avaliação de
Expressão Gênica em *Leishmania donovani*.

Lucas Bigolin Lorenzon

Pelotas, 2013

Lucas Bigolin Lorenzon

Construção de Ferramentas Moleculares para Avaliação de Expressão Gênica em
Leishmania donovani.

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof^a. Dra. Ângela Kaysel Cruz

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L869c **Lorenzon, Lucas Bigolin**

Construção de ferramentas moleculares para avaliação de expressão gênica em *Leishmania donovani* / Lucas Bigolin Lorenzon. – 63f. ; fig. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2013. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite ; co-orientador Ângela Kaysel Cruz.

1.Biotecnologia. 2.Clonagem. 3.Tripanossomatídeos.
4.Leishmaniose. 5.Sequências intercodificadoras conservadas. 6.Leishmania donovani I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Cruz, Ângela Kaysel. III.Título.

CDD: 616.9364

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcos Villela, Universidade Federal de Pelotas

MSc. André Alex Grassmann, Universidade Federal de Pelotas

“Morrer, mas morrer peleando. Jamais frouxar o garrão! Com a pampa no coração e as inquietudes por diante”.

César Oliveira e Rogério Melo.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, não apenas por me apoiar financeiramente, mas também por me dar força pra continuar nos momentos em que a saudade batia mais forte e o único remédio parecia ser a volta para casa.

Agradeço em especial à minha mãe, Delair, por ter me convencido a voltar a estudar, depois de dois anos parado. A decisão de voltar aos estudos foi, com certeza, um divisor de águas em minha vida e, por isso, lhe sou muito grato.

Agradeço à minha amiga Jordana Luft, por me apoiar durante quase 3 anos nessa etapa da minha vida. Foi muito importante o convívio ao teu lado, bem como o apoio que me deste durante as horas mais difíceis. Muito obrigado!

Agradeço a todos os professores do curso por compartilharem seus conhecimentos e experiências comigo. Foram de grande valia.

Agradeço ao professor Dr. Luciano da Silva Pinto, por ter aceitado meu pedido de estágio, em 2009. Tenho ciência de que muito do pouco que sei devo ao tempo que passei no laboratório e, por isso, lhe sou muito grato.

Agradeço ao professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, por ter confiado em mim e me orientado durante 3 anos. Da mesma forma, agradeço à professora Dra. Maria Elisabeth Aires Berne pela co-orientação durante este período. Vocês foram de fundamental importância na minha formação. Muito obrigado!

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia. Como disse, o tempo que passei com vocês foi de extrema importância para minha formação.

Agradeço à professor Dra. Ângela Kaysel Cruz pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e lá desenvolver este trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular da USP de Ribeirão Preto pela ajuda que me deram durante este trabalho. Em especial, agradeço à Dra. Mônica Cristina Terrão por sua participação direta na estratégia deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas por esses anos de convívio. Desejo que todos nós tenhamos um futuro repleto de realizações.

Agradeço a 3 colegas em especial, por suas participações diretas na minha formação, desde o início do curso. Sem a ajuda dos colegas Cristian, João Paulo e Wallace, tenho certeza de que não chegaria até aqui. Gostaria de dizer que foi uma honra conviver, trabalhar e beber junto com vocês. Espero que tudo em suas vidas dê certo, pois vocês merecem.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro durante os dois anos que fui bolsista de iniciação científica.

Resumo

LORENZON, Lucas Bigolin. **Construção de Ferramentas Moleculares para Avaliação de Expressão Gênica em *Leishmania donovani***. 2013. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Leishmaniose é o nome dado a um grupo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Há cerca de 1,5 a 2 milhões de novos casos da doença por ano, sendo o número de mortes anuais estimado em 70 mil. *Leishmania* spp. possuem controle de sua expressão gênica majoritariamente pós-transcricional, diferindo da maioria dos outros organismos eucariotos. Sequências intercodificadoras conservadas (CICS) podem ter papel fundamental na regulação da expressão gênica de *Leishmania* spp. Nos propusemos a avaliar se as CICS 1722 e 4405, encontradas na região 3' não traduzida de determinados genes são capazes de interferir no padrão da expressão gênica de um *locus* constitutivo em *Leishmania donovani* durante sua diferenciação, já que em seus *loci* originais ocorrem alterações claras dos níveis de expressão gênica. Para isto, objetivamos, num primeiro momento, (i) produzir 3 plasmídeos contendo um gene repórter (*neo*) flanqueado pelas regiões 5' e 3'UTR (acrescido ou não das CICS) do locus *dhfr-ts*, que expressa constitutivamente enzima dihidrofolato redutase-timidato sintase; (ii) gerar os fragmentos lineares contendo a região de interesse (5'UTR-*neo*-3'UTR); e (iii) utilizá-los para transfectar *Leishmania donovani*. Técnicas de biologia molecular e microbiologia, tais como, reação em cadeia de polimerase (PCR), restrição e ligação enzimáticas, *assembly* PCR, cultivo e transformação de *Escherichia coli* e *Leishmania donovani* foram utilizadas para desenvolver este trabalho. Os plasmídeos foram construídos com sucesso e, após a obtenção dos fragmentos lineares por digestão enzimática, os mesmos foram utilizados para transfectar *L. donovani*. Estas

ferramentas podem ser úteis em estudos futuros que visem elucidar mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em *Leishmania* spp.

Palavras chave: *clonagem; tripanossomatídeos; leishmaniose; sequências intercodificadoras conservadas.*

Abstract

LORENZON, Lucas Bigolin. **Construction of molecular tools to evaluate gene expression in *Leishmania donovani***. 2013. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Leishmaniasis is a group of diseases caused by parasites from *Leishmania* genus. There are about 1,5 to 2 million new cases of this disease per year and it causes the death of 70 thousand infected people. Gene expression control in *Leishmania* occurs mainly at the post-transcriptional level, unlike most eukaryotes. Conserved interceding sequences (CICS) can have key roles on regulation of gene expression in *Leishmania* spp. We aimed to evaluate if CICS 1722 and 4405, found on 3' untranslated region (3'UTR) of certain *Leishmania* genes, which suffer modulation during differentiation from promastigotes to amastigotes, are able to modulate gene expression pattern of a constitutive locus in *Leishmania donovani* throughout differentiation. To do that, we first aimed to (i) construct 3 plasmids bearing a reporter gene (*neo*) flanked by the 5' and 3' UTR (to which we added, or not, the CICS) of *dhfr-ts* locus, which expresses constitutively the enzyme dihydrofolate reductase-thymidilate synthase; (ii) generate linear fragments containing the region of interest (5'UTR-*neo*-3'UTR) from the rest of the plasmids for integration on the homologous region in the genome; and (iii) use them to transfect *Leishmania donovani*. Molecular biology and microbiology techniques, such as, polymerase chain reaction (PCR), enzymatic restriction and ligation, assembly PCR, culture and transformation of *Escherichia coli* and *Leishmania donovani* were used to develop this work. The plasmids were successfully built, the linear fragments were generated by enzymatic digestion, and were subsequently used to transfect *L. donovani*. These tools can be useful in future studies which aim unravel the mechanisms involved on regulation of gene expression in *Leishmania* spp.

Key words: *cloning; trypanosomatids; leishmaniasis; conserved intercoding sequences.*

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp	24
Figura 2: Avaliação do DNA genômico extraído de <i>L. donovani</i> por eletroforese em gel de agarose.	31
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR da 5'UTR de <i>dhfrts</i>	32
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmideal extraído dos possíveis clones pGEM-5'UTR.	34
Figura 5: Mapa físico do vetor pGEM-5'UTR.....	35
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de plasmídeos pGEM-5'UTR digeridos com <i>EcoRI</i>	35
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmideal de possíveis clones pGEM-5'UTR.....	36
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmideal de possíveis clones pGEM-5'UTR.	37
Figura 9: Mapas de pGEM-5'UTR.....	38
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose plasmídeos pGEM-5'UTR digeridos com <i>SpeI</i>	39
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose de clones de pGEM-5'UTR digeridos com <i>SpeI</i>	40
Figura 12: <i>Assembly</i> PCR	41
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR 3'UTR do locus <i>dhfrts</i>	42
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose dos amplicons 3'UTR mutados e WT	43
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose dos amplicons 3'UTR WT e mutados.....	44
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose de potenciais clones pGEM-5'UTR-3'UTR.....	44
Figura 17: Mapas dos vetores pGEM-5'UTR e pGEM-5'UTR-3'UTR.....	46
Figura 18: Eletroforese em gel de agarose do DNA de potenciais clones pGEM-5'UTR-3'UTR digerido com <i>NdeI</i> e <i>EcoRI</i>	47
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos pGEM-5'UTR-3'UTR WT e mutados.....	48
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose de pX63neo digerido com <i>SpeI</i>	49
Figura 21: Eletroforese em gel de agarose de <i>screening</i> de clones recombinantes.....	50
Figura 22: Mapas de pGEM-5'UTR-neo-3'UTR.....	51
Figura 23: Eletroforese em gel de agarose de pGEM-5'UTR-neo-3'UTR	52

Figura 24: Eletroforese em gel de agarose de pGEM-5'UTR- <i>neo</i> -3'UTR.	53
Figura 25: Eletroforese em gel de agarose de pGEM-5'UTR- <i>neo</i> -3'UTR digeridos com <i>Eco</i> RI e <i>Nde</i> I.	54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Cronograma.....	29
Tabela 2: Ciclos das reações em cadeia de polimerase.....	30
Tabela 3: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as ampliações por PCR.	32

Lista de Abreviaturas e Siglas

AC – Adenil ciclase

AMPC – Adenosina 3',5'- monofostato cíclico

CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças

CICS – Sequências intercodificadoras conservadas

CO₂ – Dióxido de carbono

DNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

gDNA – DNA genômico

IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

LB – Luria Bertani

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

RPM – Rotações por minuto

TRIS – Hidroximetil aminometano

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

X-gal - *5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside*

WHO – Organização Mundial da Saúde

3' UTR – Região 3' não traduzida

5' UTR – Região 5' não traduzida

WT – Selvagem

SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract.....	10
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	13
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	14
1. Introdução geral.....	17
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivos gerais.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Revisão Bibliográfica.....	20
3.1. Leishmaniose.....	20
3.2. Tipos de leishmaniose.....	21
3.3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	22
3.4. Prevenção e controle.....	24
3.5. Tratamento.....	25
3.6. Organização genômica de <i>Leishmania</i> spp.....	25
4. Relatório de Estágio.....	29
4.1. Estratégia de clonagem.....	29
4.2. Metodologia.....	29
4.2.1. Reações em cadeia de polimerase.....	29
4.2.2. Eletroforeses.....	30
4.2.3. Clonagens.....	30
4.2.4. Cultivo e transformação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Leishmania donovani</i>	31
4.3. Construção de pGEM-5'UTR.....	31
4.4. Construção de pGEM-5'UTR-3'UTR.....	40
4.5. Construção de pGEM-5'UTR- <i>neo</i> -3'UTR.....	48
5. Conclusões e Perspectivas.....	55

6. Considerações Finais.....	56
7. Referências.....	57

1. Introdução Geral

Este trabalho foi realizado no laboratório de Parasitologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão, pertencente à Universidade de São Paulo. Estabeleci contato com a professora doutora Ângela Kaysel Cruz, que coordena o laboratório, durante o XI Curso de Bioquímica do departamento de Bioquímica, do qual participei em julho deste ano. Tive a honra de ser aceito por ela para estagiar em seu laboratório, podendo assim realizar o meu estágio final obrigatório, bem como, me preparar para a seleção de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

As linhas de pesquisa majoritárias do laboratório propõem-se a desvendar mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Sendo assim, meu trabalho foi desenvolvido nessa perspectiva. A professora Ângela me passou uma parte do trabalho da doutora Mônica Cristina Terrão, que consistia em investigar se pequenas sequências intercodificadoras conservadas (CICS – do inglês, *conserved intercoding sequences*) no interior de sequências 3' não traduzidas (3' UTR – do inglês, *untranslated regions*), presentes em transcritos que sofrem modulação de expressão durante a diferenciação de promastigotas em amastigotas *in vitro*, seriam capazes de modificar o padrão de expressão de um gene de expressão constitutiva durante a diferenciação *in vitro* de *Leishmania donovani* BOB. Este isolado foi escolhido para o trabalho por estar presente nos estoques do laboratório, bem como por ser possível induzir sua diferenciação de promastigota para amastigota *in vitro*. CICS e regiões não traduzidas serão abordadas com mais detalhes na revisão bibliográfica. Para desenvolver determinado trabalho, seria necessário construir inicialmente 3 plasmídeos recombinantes, contendo (i) a sequência 5' UTR do gene *dhfrts*, que codifica para a enzima Dihidrofolato redutase,

de expressão constitutiva (ii) o gene repórter *neo*, que também desempenha o papel de marcador de seleção nas construções, e (iii) a região 3'UTR do gene *dhfrts*. As duas regiões UTR flanqueando o gene repórter são fundamentais para o sucesso da recombinação homóloga no locus *dhfrts*. Os plasmídeos diferem entre si pelo fato de um deles conter a região 3' UTR selvagem, servindo como controle, enquanto nos outros dois, na 3' UTR foi inserida uma das CICS (CICS 1722 e CICS 4405). A origem e o motivo de escolha dessas duas CICS são abordados mais adiante, durante a revisão bibliográfica.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais: Desenvolver ferramentas moleculares para investigação da regulação de expressão gênica em *Leishmania donovani*.

2.2. Objetivos específicos: (i) construir um plasmídeo contendo o cassete 5'UTR-*neo*-3'UTR selvagem; (ii) construir um plasmídeo contendo o cassete 5'UTR-*neo*-3'UTR contendo a CICS 1722; (iii) construir um plasmídeo contendo o cassete 5'UTR-*neo*-3'UTR; (iv) gerar os cassetes de integração, fragmentos lineares extraídos do plasmídeo e (v) utilizá-los para transfectar *Leishmania donovani* BOB.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Leishmaniose

Entende-se por leishmaniose um grupo de doenças causadas pelos parasitos protozoários da família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. O número de casos novos dessas doenças é estimado em cerca de 1,5 a 2 milhões por ano, enquanto são estimadas 70 mil mortes por ano. 350 milhões de pessoas vivem atualmente em área de risco para infecção e doença (WHO, 2004). Nos últimos anos ocorreu um aumento no número de casos de leishmaniose, e esta doença é considerada emergente em algumas áreas, e reemergente em outras (Ashford, 2000). Os 3 principais fatores que estão relacionados com a expansão das leishmanioses são mudanças ambientais que favoreçam a proliferação do inseto vetor, situação do sistema imune do indivíduo e falhas no tratamento (Dujardin, 2006).

Leishmania spp. entram em contato com os hospedeiros mamíferos através da picada da fêmea de insetos da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, que ao alimentar-se do sangue do mamífero, libera algumas espécies de parasitos em sua corrente sanguínea (Nagill e Kaur, 2011). Há cerca de 70 entre as 400 espécies descritas do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* que podem transmitir leishmaniose. Enquanto que, no velho mundo, o primeiro gênero é responsável pela maioria das infecções, no novo, as infecções pela picada de fêmeas do gênero *Lutzomyia* são predominantes. Atualmente, são aproximadamente 20 espécies de incriminadas na veiculação de Leishmanias ao homem e animais no Brasil (Rangel e Lainsoh, 2003). É sabido que a presença de uma concentração maior de dióxido de carbono (CO₂) no ambiente é capaz de atrair tais insetos, explicando o fato de determinadas espécies alimentarem-se do sangue de diferentes espécies de mamíferos. Insetos machos também são atraídos pela maior concentração de CO₂, bem como, por

odores específicos de cada mamífero. Visto que não realizam hematofagia, uma possível explicação para esta atração diz que os machos são atraídos para encontrar uma parceira, e assim, facilitar o acasalamento (Pinto *et al.*, 2001).

3.2. Tipos de Leishmaniose

O termo leishmaniose inclui duas principais doenças, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral, que são causadas por mais de 20 diferentes espécies do gênero *Leishmania* (CDC, 2004). Das 12 espécies de *Leishmania* neotropical universalmente aceitas, e que causam doença no homem, sete ocorrem no Brasil. A forma mais comum da doença é a leishmaniose cutânea, que usualmente é identificada pelo aparecimento de uma ou mais úlceras indolores na pele, podendo também apresentar danos à mucosa nasal e oral (sendo então, classificada como leishmaniose mucocutânea). Tais lesões podem ocorrer de meses a anos após o aparecimento de úlceras cutâneas (cerca de 10% das lesões cutâneas progridem para lesões mucocutâneas). A forma cutânea da doença é endêmica nas regiões tropicais e neotropicais, atingindo mais de 70 países (Reithinger *et al.*, 2007). No velho mundo, as principais espécies que causam leishmaniose cutânea são: *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. chagasi*. Na região dos mares Mediterrâneo e Cáspio, *L. infantum* e *L. chagasi*. No novo mundo, os principais agentes etiológicos da doença são *L. braziliensis*, *L. guyaniensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (Dowlati, 1996). Cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (Nagiil e Kaur, 2011).

Leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, é a forma mais grave da doença, já que os parasitos se alojam e multiplicam em células do sistema fagocitário mononuclear, levando a um quadro clínico complexo, acompanhado de

hepato-esplenomegalia e imuno-supressão (WHO, 2004; Bryceson, 1995). Pacientes infectados apresentam febre, perda de peso, aumento no tamanho do baço e do fígado, bem como diminuição na produção de células sanguíneas, que pode levar à anemia, sangramentos e infecções por outros organismos. Essa forma da doença é causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani*- *L. d. donovani* e *L. d. archibaldi* (Índia, Ásia e leste africano), *L. d. chagasi* (América) e *L. d. infantum* (Europa, norte africano e América Latina). *L. d. chagasi* é a única espécie que causa leishmaniose visceral no Brasil. A mortalidade causada por leishmaniose visceral, quando a doença não é tratada, pode chegar a alarmantes 75–79% dos casos (Piscopo e Mallia, 2006). Esta doença é mais comum no sul da Ásia, com um número estimado de 300000 casos em 2006, seguido pelo leste africano, com 30000 casos por ano, Brasil com mais de 3500 casos notificados em 2009 (Sinam/SVS/MS) e Etiópia, com cerca de 4000 casos por ano (Alvar *et al.*, 2007). Mais de 90% dos casos ocorrem em 6 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil. O Brasil é um dos principais países considerando-se ambos os tipos de leishmaniose, sendo o único a estar presente nas duas listas de países responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose visceral e tegumentar. A presença do cão em áreas endêmicas supera em importância a presença humana para a doença, uma vez que os cães são os principais reservatórios de *Leishmania* spp. A maior incidência desta doença está na área rural destes países, onde fatores responsáveis por tal incidência são principalmente más condições de saneamento ambiental, construção de casas a menos de 500 metros das matas, desmatamento, nível sócio-econômico da população, migração para áreas endêmicas, falta de medidas de controle e a presença do vetor de transmissão devido a condições ambientais favoráveis à sua proliferação (Nagiil e Kaur, 2011).

3.3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

O ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania* envolve diversos estágios de desenvolvimento e alterna entre os insetos vetores e os mamíferos hospedeiros. Uma das principais diferenças no desenvolvimento de tais parasitos é a ocorrência dos mesmos como formas amastigotas intracelulares nos macrófagos dos mamíferos e como formas promastigotas extracelulares nos flebotomíneos (Silva *et al.*, 2011). Como mencionado anteriormente, a transmissão do parasito de um hospedeiro vertebrado para outro é feita por insetos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo).

A transmissão do parasito a partir do hospedeiro mamífero para o inseto ocorre quando este realiza hematofagia para alimentar-se, ingerindo assim macrófagos infectados. Ao chegarem no intestino médio do inseto, os macrófagos são rompidos, liberando assim parasitos na forma de amastigotas, que em resposta às diferenças ambientais encontradas diferenciam-se na forma replicativa promastigota procíclica que se aderem à membrana peritrófica e multiplicam-se. Após a proliferação, essas formas se diferenciam na forma infectiva promastigota metacíclica, perdem a adesão à membrana e migram para a região do esôfago do inseto de onde são regurgitados durante o repasto sanguíneo, infectando assim o hospedeiro mamífero (Terrão, 2012). Ao alcançar a derme do hospedeiro vertebrado, e na presença de uma reação inflamatória local, os parasitos são reconhecidos e fagocitados (principalmente) por macrófagos que migraram para o sítio de infecção. Já dentro do macrófago, quando o fagossomo contendo o parasito funde-se ao lisossomo, ocorre a diferenciação da forma promastigota para formas intracelulares com flagelo rudimentar (amastigotas), que se replicam dentro dos fagolisossomos (Real e Mortara, 2012). Quando o número de parasitos dentro do

macrófago aumenta demais, este é lisado, liberando amastigotas. Novos macrófagos as fagocitam e perpetuam a infecção. O ciclo de vida é fechado quando as fêmeas de flebotomíneos ingerem os macrófagos infectados, durante a hematofagia. Sabe-se que a etapa de diferenciação de promastigota para amastigota é fundamental para a sobrevivência intracelular desses parasitos e, embora este processo não seja muito bem elucidado no âmbito molecular, é sabido que alterações em fatores ambientais, tais como pH e temperatura, são capazes de desencadear este processo (Zilberstein e Shapira, 1994). O ciclo de vida de *Leishmania* spp. encontra-se ilustrado na figura 1.

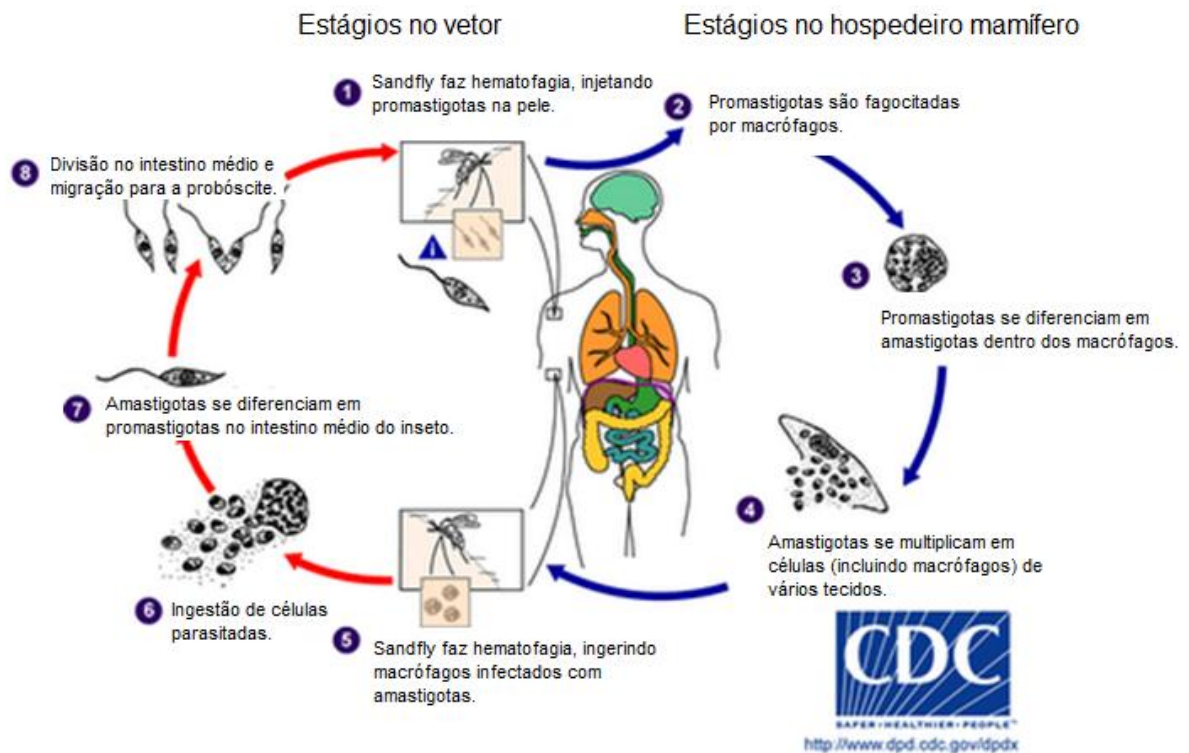


Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Adaptado de CDC, 2004.

3.4. Prevenção e controle

Prevenção e controle de leishmaniose é baseada em duas categorias principais: (i) medidas para diminuir a exposição humana a picadas do vetor e (ii)

medidas para diminuir os reservatórios de infecção. Ao estabelecer-se uma estratégia para controle é importante conhecer o comportamento dos flebotomíneos locais e as espécies hospedeiras. Para diminuir os reservatórios de infecção, é ideal um diagnóstico rápido em humanos. Em caso de animais domésticos portadores de leishmaniose visceral, principalmente cães, medidas de eliminação têm sido utilizadas. A aplicação de inseticidas no domicílio e peridomicílio ajuda a diminuir a população do vetor. Telas contendo inseticida utilizadas para vedar janelas e portas ajudam bastante quando o pico de atividade do inseto é tarde da noite (CDC, 2004).

3.5. Tratamento

Algumas lesões cutâneas causadas por leishmaniose curam sem a necessidade de quimioterapia. Nesses casos, é feito um balanço entre pontos a favor e contra da medicação, uma vez que esta desencadeia alguns efeitos colaterais. Existem disponíveis formulações para emprego parenteral, por via endovenosa ou intramuscular. No caso de lesões mucocutâneas e viscerais, as principais drogas utilizadas são os antimoniais pentavalentes. Embora sejam bastante eficazes, algumas espécies de *Leishmania* têm desenvolvido resistência, por superexpressarem proteínas transportadoras de membrana, que bombeiam a droga para fora da célula. Anfotericina B também têm sido utilizada, embora desencadeie efeitos colaterais. Há uma constante busca por desenvolvimento de novas drogas para combater infecções por *Leishmania* spp (Ravinder *et al.*, 2012). Uma nova droga tem sido testada *in vitro* contra *Leishmanias*, a nirantina, que atua sobre a topoisomerase I de *Leishmania*, dificultando a replicação e a transcrição do parasito, levando-o à morte (Chowdhury *et al.*, 2012).

3.6. Organização genômica de *Leishmania* spp.

É sabido que os organismos se adaptam a mudanças ambientais regulando sua expressão gênica, garantindo-lhes características fundamentais para a sua sobrevivência nessas novas condições. Enquanto na maioria dos eucariotos o principal ponto de controle da regulação da expressão gênica ocorre no primeiro nível de controle, a iniciação da transcrição, inibindo ou ativando a transcrição de seus genes, tripanossomatídeos quase não realizam este tipo de regulação. As características adquiridas por esses organismos parecem não ter relação alguma com processos regulados pela RNA polimerase II (Clayton, 2002). Os genes que codificam para proteínas em tripanossomatídeos estão organizados em unidades policistrônicas, gerando um transcrito policistrônico, pré-mRNA que contém informação para várias proteínas e que deve ser processado (Myler *et al.*, 2000; Berriman *et al.*, 2005). Os principais sítios de início de transcrição em *Leishmania* spp. são encontrados nas regiões de troca de fita que separam os *clusters* direcionais de genes (DCG) divergentes (Myler *et al.*, 2000; Ivens *et al.*, 2005). Os genes de *Leishmania* spp. são transcritos e processados continuamente (Rosenzweig *et al.*, 2008). O pré-mRNA produzido na transcrição sofre duas principais reações co-transcricionais: (i) *trans-splicing*, onde uma molécula de RNA de 39 a 41 nucleotídeos, o *spliced-leader* (SLRNA), que contém o *cap* é adicionado à extremidade 5' do RNA codificador (Bruzik *et al.*, 1988); e (ii) poliadenilação, que ocorre na extremidade 3' do RNA após a clivagem do transcrito (Liang *et al.*, 2003). Estes dois processos são acoplados, uma vez que a poliadenilação ocorre quando o pré-mRNA é clivado para receber o *spliced-leader* (Lebowitz *et al.*, 1993). A ausência de promotores para a RNA polimerase II nos genes que codificam proteínas e a transcrição policistrônica dos mesmos indica que a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre posteriormente ao processamento (Clayton, 2002), em diversos níveis, pelo transporte seletivo do mRNA para o citoplasma, controle diverso da estabilidade de cada transcrito, seleção das sequências de mRNA que serão traduzidas, processamentos pós-traducionais ou degradação dirigida das proteínas (Rosenzweig *et al.*, 2008). Processamento pós-transcricional regulado por

RNAs citoplasmáticos (Jager *et al.*, 2007), silenciamento da transcrição do SL-RNA mediando a resposta a estresse ambiental (Lustig *et al.*, 2007), presença de regulons transcricionais em determinados genes têm recebido atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Quanto ao controle da estabilidade dos mRNAs, a maioria dos estudos investiga o papel da região 3' não traduzida (3'UTR), onde ocorre a ligação de complexos protéicos, resultando na modificação da estabilidade do transcrito (Wu *et al.*, 2000).

Comparando-se a sequência genômica das três primeiras espécies de *Leishmania* que tiveram seu genoma sequenciado (*L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*), nota-se grande conservação de sintenia entre elas, bem como um alto grau de conservação das regiões que codificam proteínas (do inglês, CDS) (Laurentino *et al.*, 2004). Por outro lado, a conservação de sequências intercodificadoras entre *L. major* e *L. braziliensis* é de cerca de 50% (Laurentino *et al.*, 2004). Isso nos permite postular que tais regiões intercodificadoras, quando são conservadas, sofram pressão seletiva e, por consequência, desempenhem papéis importantes na regulação da expressão gênica. Pensando dessa forma, Vasconcelos e colaboradores (Vasconcelos *et al.*, 2012) desenvolveram algoritmos para buscar sequências intercodificadoras conservadas (CICS) entre os três genomas. Mais do que isto, conseguiram agrupar genes que possuíam as mesmas CICS (em *clusters*). O trabalho de Lahav (Lahav *et al.*, 2011) disponibilizou um perfil global das modulações de expressão gênica de *Leishmania donovani* durante sua diferenciação de promastigota para amastigota. Vasconcelos verificou se genes agrupados por conter a mesma CICS em suas regiões 3'UTR também estariam agrupados por seu perfil de expressão durante a diferenciação e confirmou a correlação positiva para alguns grupos de genes. Dentre os genes agrupados por CICS que apresentaram correlação com o perfil de expressão durante a diferenciação estão a CICS 1722 (28

pares de base) e 4405 (20 pares de base). Estas duas CICS foram objeto de estudo deste trabalho.

4. Relatório de estágio

4.1. Estratégia de clonagem

Como mencionado anteriormente, nos propusemos a construir três vetores portando gene repórter e UTRs diferentes para integração, por recombinação homóloga, no genoma de *Leishmania donovani*, no locus *dhfrts*. Escolhemos o vetor pGEM-T easy (Promega) para servir como base para as clonagens. Este vetor é amplamente utilizado por permitir a clonagem de produtos de PCR, sem a necessidade de digestão prévia. Cada plasmídeo deveria receber 3 insertos na seguinte ordem: 5'UTR, 3'UTR e, por fim, a inserção de *neo* entre as duas regiões UTR. O cronograma dos trabalhos realizados na Universidade de São Paulo está representado na tabela 1.

Tabela 1: Cronograma.

CRONOGRAMA	ago/12	set/12	out/12	nov/12	dez/12
Estratégia de clonagem	X				
Atividades paralelas	X	X			
Construção de plasmídeos		X	X	X	
Transfecção de <i>L. donovani</i>					X

4.2. Metodologia

4.2.1. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Todas as reações de polimerase em cadeia foram realizadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores, DNTPs, MgCl₂, tampão e enzima Taq DNA polimerase da marca Invitrogen. Os parâmetros utilizados para fazer todas as PCRs deste trabalho estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Ciclos das reações em cadeia de polimerase.

Ciclos	Temperatura	Tempo	Vezes
Desnaturação	95	5'	1 X
Desnaturação	94	30"	} 32 x
Anelamento	55	30"	
Extensão	72	1'30"	
Extensão	72	8'	1 X
Store	4	∞	1 X

4.2.2. Eletroforeses

Todas as eletroforeses apresentadas neste trabalho foram feitas em gel de agarose 0,8%. O tampão utilizado foi TAE 1X (Tris, acetato e EDTA). A voltagem de corrida foi mantida constante em 100 volts. Após as corridas, os géis foram corados por 20 minutos em solução de brometo de etídeo. Todas as imagens de géis foram capturadas no aparelho Image Quant Las 4000 (GE).

4.2.3. Clonagens

Os fragmentos de DNA separados nos géis de agarose foram purificados com kit de purificação de DNA (Axygen). Enzimas de restrição que geram corte coesivo foram utilizadas para gerar extremidades complementares nos fragmentos de DNA, possibilitando que estes sejam ligados eficientemente nas etapas posteriores. Todas as enzimas de restrição utilizadas neste trabalho (*EcoRI*, *NdeI*, *NcoI*, *SpeI* e *HindIII*) foram adquiridas junto à New England Biolabs. Os protocolos do fabricante, indicando tempo de digestão, quantidade de enzima e tampão, bem como tempo de reação foram seguidos à risca. A primeira reação de ligação (pGEM-T + 5'UTR) foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase, que vem no mesmo kit que o plasmídeo pGEM-T easy (Promega). As ligações subsequentes (inserção de 3'UTR e *neo* no pGEM-5'UTR) foram feitas utilizando a enzima T4 DNA ligase da marca New England Biolabs. O protocolo de ambos os fabricantes foi seguido.

4.2.4. Cultivo e transformação de *Escherichia coli* e *Leishmania donovani*.

Em todas as etapas de propagação de plasmídeos foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* DH10B. O meio de cultivo Luria-Bertani (LB) foi utilizado para cultivar *E. coli*. A temperatura utilizada foi 37°C, com agitação de 200 RPM. Quando foi necessário selecionar clones recombinantes, foi utilizado meio LB sólido (contendo 1,5% de ágar) com 100 µg.ml⁻¹. *Leishmania donovani* foi cultivada em meio M199, acrescido de 10% soro fetal bovino. Quando houve necessidade de selecionar parasitos recombinantes, foi utilizado meio M199 sólido (contendo 1% de ágar) com 10 µg.ml⁻¹ da droga de seleção G418 (análoga de neomicina). Os cultivos de *L. donovani* foram feitos em estufa a 25°C.

4.3. Construção de pGEM-5'UTR

O DNA de *Leishmania donovani* BOB, extraído pela Dra. Mônica C. Terrão (Terrão, 2012), foi analisado por eletroforese em gel de agarose. A figura 2 mostra a foto da eletroforese do DNA genômico.

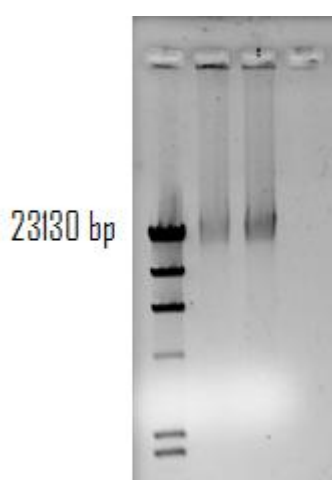


Figura 2: Avaliação do DNA genômico extraído de *L. donovani* por eletroforese em gel de agarose. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2 e 3: duas amostras de DNA genômico de *Leishmania donovani* BOB.

Utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5'UTR-F e 5'UTR-R (Tabela 1) foi possível amplificar, pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR), um fragmento de 570 pares de base da região 5' não traduzida do gene que codifica para a enzima Dihidrofolato redutase. O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% (figura 3 A).

Tabela 3: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as amplificações por PCR.

Oligonucleotídeos iniciadores	
5'UTR- F	5' CCTCCCTCCTCACACCATCA
5'UTR-R	5' ATATA ACTAGT AGAAGCTCCTCGACGGTGG
3'UTR-F	5' ATATA ACTAGT AGAGATAGGAGGCGCCAT
3'UTR-R	5' TATACATATGGAGCACCAAAAAGCGCAAG
3'UTR-1722-F	5' GGACCCTGAGATGCCACACGCTGAGGTG GGACCCTCATTCCCTCGAT
3'UTR-1722-R	5' CACCTCAGCGTGTGGCATCTCAGGGTCC CAGCACACAACGGAGAACAG
3'UTR- 4405-F	5' GTGTGCGCGTGCCTGTGTGTG GACCCTCATTCCCTCGAT
3'UTR- 4405-R	5' ACACACACGCGCGCACAC CAGCACACAACGGAGAACAG

Em verde, os sítios de clivagem para a enzima *SpeI*. Em azul, o sítio de clivagem para a enzima *NdeI*.

Em vermelho, as regiões CICS, utilizadas para hibridizar a um amplicon com outro e garantir a inserção da seqüência hibridizada entre uma seqüência qualquer que se queira amplificar.

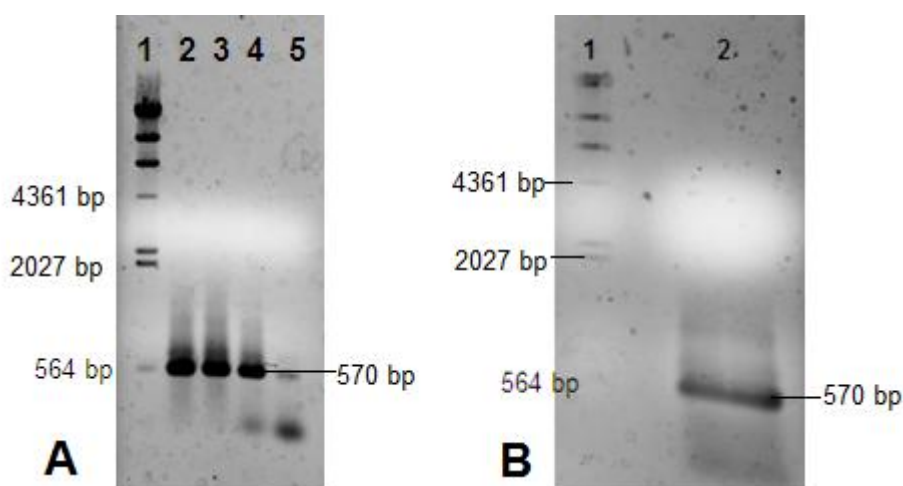


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR da 5'UTR de *dhfrts*. **A:** Amostra 1: DNA de fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2, 3 e 4: amplicons 5'UTR-*dhfrts*; 5: controle negativo. **B:** Amostra 1: DNA de fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: amplicon 5'UTR-DHFR.

As amostras dos poços 2, 3 e 4 da figura 3A foram misturadas e o total de DNA foi fracionado novamente em agarose 0,8% (figura 3B), possibilitando a quantidade de DNA suficiente para ser posteriormente purificada e empregada na clonagem.

O fragmento da amostra 2 da figura 3B foi, então, extraída do gel e purificada com o kit de purificação de DNA em gel (Axygen). A amostra purificada foi quantificada e utilizada para realizar uma ligação com o vetor pGEM-T Easy, conforme instruções do fabricante (Promega). Foi feito um cálculo para resultar uma proporção de inserto:vetor 6:1, visando obter alta eficiência de ligação. O produto de ligação foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH10B, por meio de eletroporação (2,5 kv). Os clones transformados foram selecionados em meio Luria-Bertani (LB), contendo 100 µg de ampicilina por mL de meio. Além disso, X-gal e IPTG foram aplicados sobre o meio antes da seleção, permitindo a distinção entre clones recombinantes e não recombinantes.

Poucos clones resultaram desta primeira tentativa de clonagem. -O DNA plasmideal de 8 clones foi extraído e submetido a eletroforese em gel de agarose (figura 4).

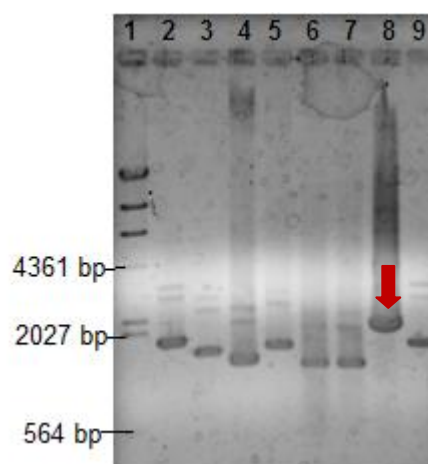


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmideal extraído dos possíveis clones pGEM-5'UTR. Amostra 1: DNA de fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2 e 9: DNA extraído de plasmídeos pGEM (colônia azul – controle); 3 a 8: DNA plasmideal extraído de 6 clones brancos (recombinantes). A seta vermelha indica o único clone cujos plasmídeos migraram menos do que a amostra controle.

O fracionamento do DNA dos diferentes clones sugeria diferença de tamanho de moléculas. Somente um dos clones continha plasmídeos que migraram menos no gel do que a amostra controle, indicando que possuía maior peso molecular, possivelmente em função da inserção do inserto 5'UTR. A seguir o DNA dos mesmos plasmídeos recombinantes foram submetidos a digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Caso o plasmídeo a ser digerido fosse o pGEM-5'UTR (o vetor esperado, cujo mapa está apresentado na figura 5), tal digestão liberaria um fragmento de tamanho similar ao inserto (5'UTR-DHFR), uma vez que dois sítios de *EcoRI* flanqueiam o inserto. Sendo assim, plasmídeos representando cada um dos padrões distintos (figura 4) foram digeridos com *EcoRI*, de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs). O produto das digestões foi fracionado em gel de agarose 0,8% (figura 6).

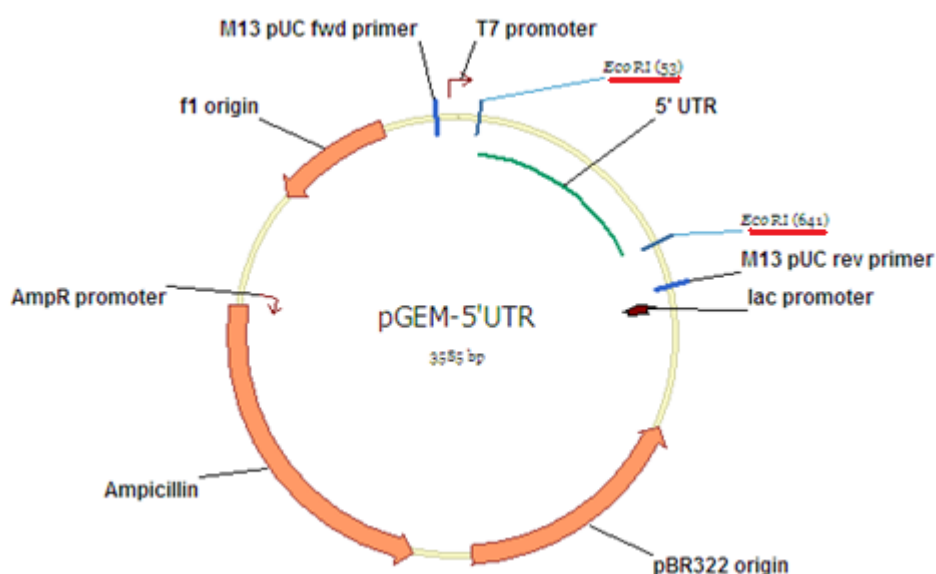


Figura 5: Mapa físico do vetor pGEM-5'UTR.

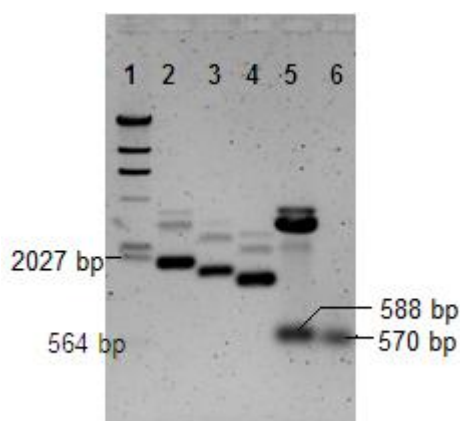


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de plasmídeos pGEM-5'UTR digeridos com *EcoRI*. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2 a 5: digestão de 4 clones pGEM-5'UTR com *EcoRI*; 6: amplicon 5'UTR-*dhfrts* (controle).

O único clone que continha um inserto do tamanho esperado (amostra 5 da figura anterior) foi então seqüenciado pelo método de Sanger, no equipamento 3100 ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O resultado do seqüenciamento demonstrou que, apesar de o inserto ser o esperado, este estava no sentido contrário ao que era necessário para prosseguir com as clonagens. Assim sendo, uma nova ligação foi feita para selecionar novos clones em busca de um que

portasse a sequência esperada no sentido correto. Novamente, vários padrões de bandas foram encontrados na triagem por extração de plasmídeos (figura 7).

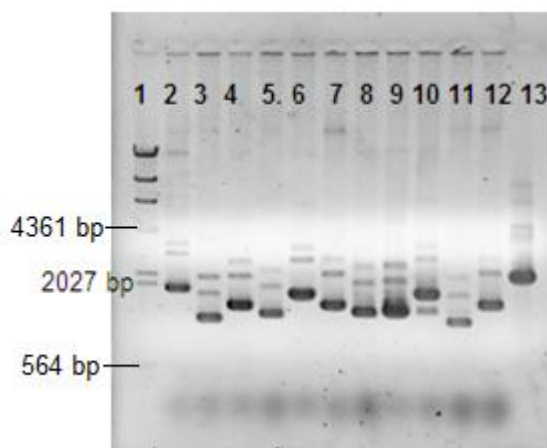


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmideal de possíveis clones pGEM-5'UTR. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: DNA extraído de plasmídeos pGEM-T (colônia azul – controle); 3 a 12: DNA plasmideal extraído de dez diferentes clones, potenciais pGEM-5'UTR; 13: pGEM-5'UTR (sentido invertido – controle).

Como nenhum clone pGEM-5'UTR na direção correta foi obtido para prosseguir com as construções, uma nova ligação foi feita, desta vez utilizando uma nova alíquota de pGEM-T easy. O protocolo do fabricante foi novamente seguido, tanto para ligação quanto para transformação de células eletrocompetentes (recém-preparadas). Desta vez, vários clones foram obtidos, todos portando plasmídeos que migraram em gel de agarose com o perfil de bandas compatível com o controle pGEM-5'UTR invertido, sugerindo igual peso molecular (Figura 8).

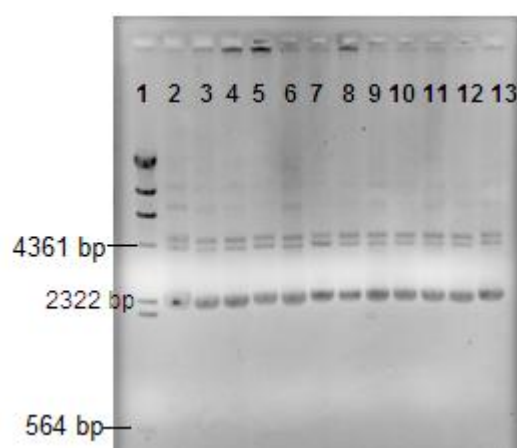


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmideal de possíveis clones pGEM-5'UTR. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2 e 13: pGEM-5'UTR invertido (controle); 3 a 12: extração de plasmídeos de 10 clones de pGEM-5'UTR.

Três clones foram escolhidos aleatoriamente para serem seqüenciados, visando verificar o sentido do seu inserto. Os dados do seqüenciamento foram analisados no programa MEGA5 (disponível para download no link <http://www.megasoftware.net/>). O alinhamento dos dados juntamente com a seqüência do amplicon 5'UTR-DHFR nos mostrou que os três clones testados estavam, novamente, no sentido inverso.

Como o sequenciamento de DNA é feito como rotina, uma vez por semana no laboratório em que este trabalho foi desenvolvido, outros métodos foram usados para triar os clones obtidos, agilizando assim, o prosseguimento dos experimentos. As triagens foram, então, feitas por digestão enzimática do DNA, que fosse diagnóstica do sentido do inserto. Foi percebido que, caso a enzima *SpeI* fosse utilizada, seria possível diferenciar clones de pGEM-5'UTR de clones pGEM-5'UTR invertido (figura 9). Sendo assim, DNA plasmideal de dez colônias foi extraído e submetido a digestão enzimática com *SpeI*, segundo protocolo do fabricante (New England Biolabs). As digestões foram corridas em gel de agarose 0,8% (figura 10).

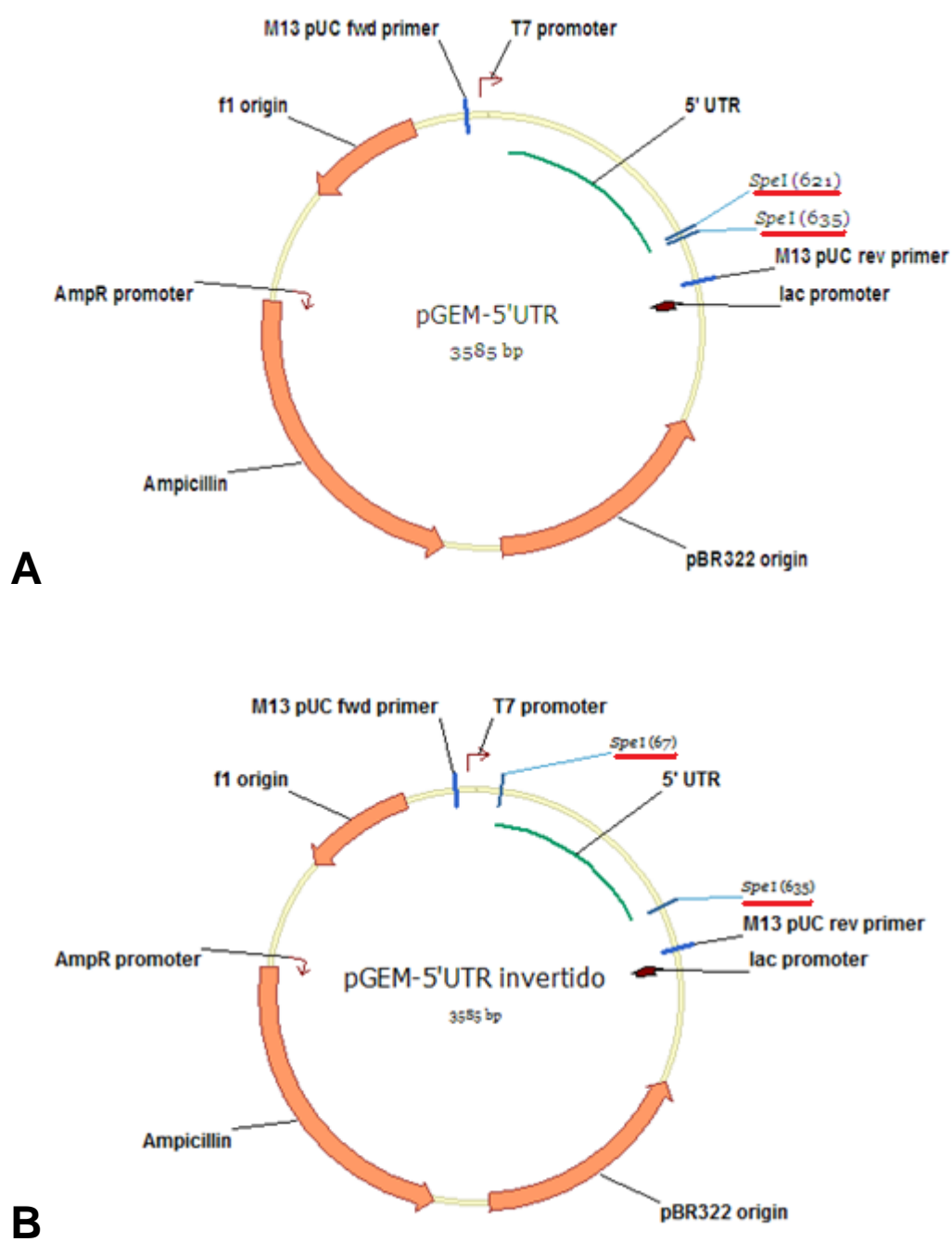


Figura 9: Mapas de pGEM-5'UTR. **A:** pGEM-5'UTR com a região 5'UTR na orientação correta; **B:** pGEM-5'UTR com a região 5'UTR na orientação incorreta.

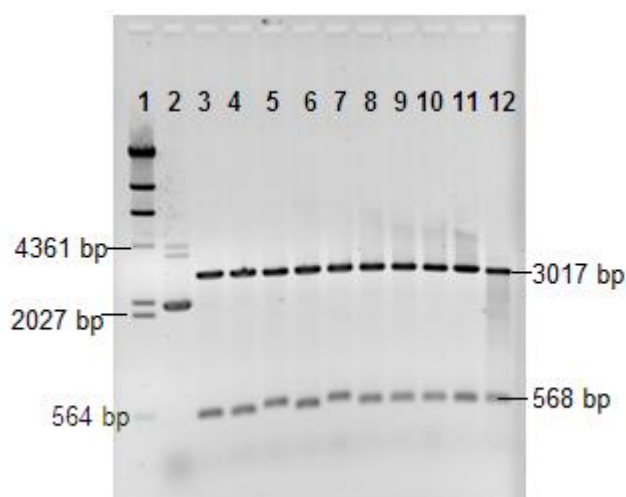


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose plasmídeos pGEM-5'UTR digeridos com *SpeI*. Amostra 1: DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*; 2: pGEM-5'UTR invertido (controle); 3 a 12: dez clones de pGEM-5'UTR digeridos com *SpeI*.

Todos os clones triados continham o inserto 5'UTR na região invertida. Uma vez que a probabilidade de inserção no sentido incorreto é de 50% no protocolo utilizado, este resultado nos foi estranho. Ao analisarmos as etapas anteriores, buscando possíveis erros, descobrimos que os clones não estavam sendo triados de forma aleatória (apenas colônias maiores haviam sido triadas). Assim sendo, mais dez clones foram triados, escolhendo-se 5 colônias grandes e 5 colônias menores. A triagem foi feita por extração de plasmídeos e posterior digestão do DNA resultante com a enzima *SpeI* (figura 11).

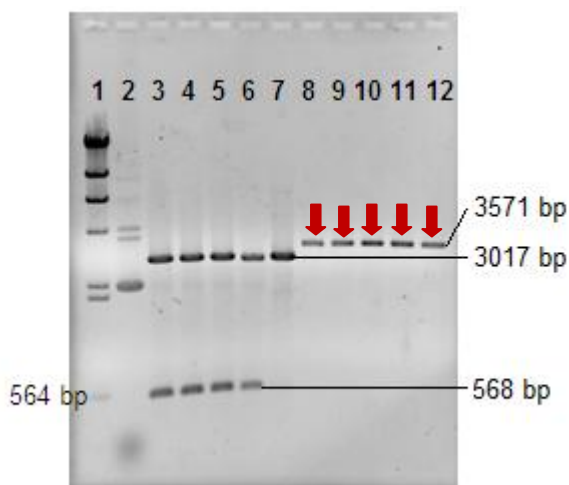


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose de clones de pGEM-5'UTR digeridos com *SpeI*. Amostra 1: DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*; 2: pGEM-5'UTR invertido não digerido (controle); 3 a 7: 5 DNA de clones independentes de pGEM-5'UTR (colônias maiores) digeridos com *SpeI*; 8 a 12: DNA de 5 clones independentes de pGEM-5'UTR (colônias menores) digeridos com *SpeI*. Setas vermelhas indicam os clones em que o inserto 5'UTR foi inserido na orientação correta.

Este resultado demonstrou que os clones com o inserto no sentido correto eram aqueles cujas colônias eram menores (amostras 8 a 12 da figura anterior). Um dos clones com inserto na direção correta foi sequenciado, confirmando sua orientação, para que as etapas seguintes de clonagem pudessem ser iniciadas.

4.4. Construção de pGEM-5'UTR-3'UTR

Com o vetor pGEM-5'UTR pronto, a etapa seguinte foi a clonagem as regiões 3'UTR nesse vetor. No caso da construção da região 3'UTR WT, os oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-F e 3'UTR-R (Tabela 1) foram utilizados para amplificar uma região de aproximadamente 600 pares de base. Já nos casos das 3'UTR contendo CICS, tivemos que fazer uma etapa a mais. Utilizamos a técnica de *Assembly PCR*, onde um amplicon serve como molde para extensão de outro e também como oligonucleotídeo iniciador para sua própria extensão. Essa técnica é

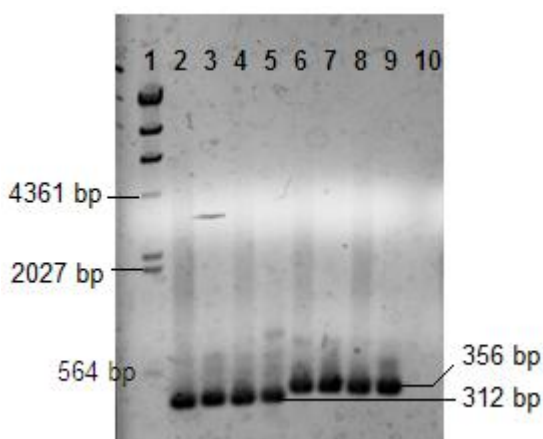


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR 3'UTR do locus *dhfrts*. Amostra 1: DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*; 2 e 3: Amplicon construído com os oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-F e 3'UTR-1722-R; 4 e 5: Amplicon construído com os oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-F e 3'UTR-4405-R; 6 e 7: Amplicon construído com os oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-R e 3'UTR-1722-F; 8 e 9: 3'UTR-R e 3'UTR-4405-F; 10: controle negativo da PCR.

Os amplicons de 312 e 356 pares de base foram purificados do gel com o kit da Axygen, quantificados e utilizados para realizar uma segunda PCR. Como descrito anteriormente, além de servirem como molde para produzir uma nova molécula, os amplicons servem como oligonucleotídeo iniciador para alongar a fita de DNA que hibridizar com eles. Foram testadas duas concentrações dos amplicons da PCR anterior para realizar a próxima PCR (20 e 40 ng) de cada amplicon. Além dos amplicons, os oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-F e 3'UTR-R foram utilizados na reação para amplificar os híbridos formados. O produto das PCRs foi fracionado em gel de agarose 1% para avaliar se experimento fora desempenhado com sucesso (figura 14).

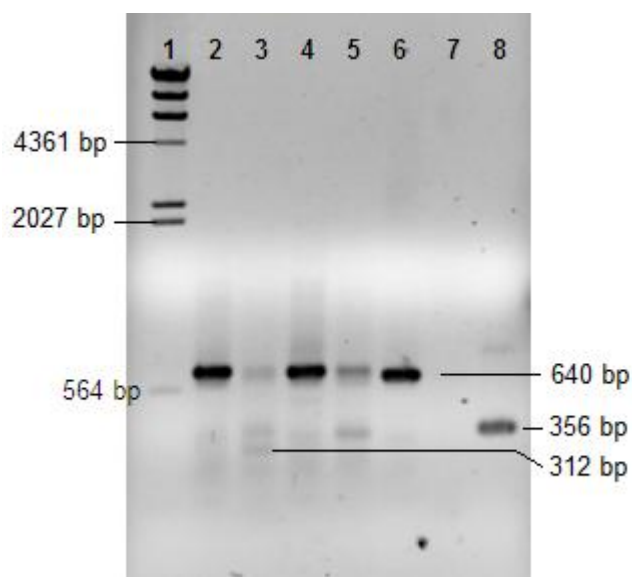


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose dos amplicons 3'UTR mutados e WT. Amostra 1: DNA do fago Lambda digerido com *HindIII*; 2 e 3: 3'UTR-1722 usando 20 e 40 ng de DNA, respectivamente; 4 e 5: 3'UTR-4405 usando 20 e 40 ng de DNA; 6: amplicon 3'UTR WT usando gDNA como *template*; 7: controle negativo; 8: Amplicon 3'UTR produzido com os oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-F e 3'UTR-1722-R.

Este resultado nos mostrou que o experimento funcionou corretamente, dando origem às sequências 3'UTR contendo as CICS 1722 e 4405 em seu interior. Além disso, foi possível observar que a concentração de 20 ng de cada amplicon utilizado no experimento resultou em uma melhor amplificação.

Com as regiões 3'UTR “montadas”, outra PCR foi feita utilizando-as como *template* (figura 15). Os oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-F e 3'UTR-R foram utilizados para amplificar as regiões 3'UTR completas (~640 bp). Desse modo, conseguimos DNA suficiente para digerir com as enzimas *SpeI* e *NdeI*, para inserção das 3'UTRs no vetor pGEM-5'UTR (digerido com as mesmas enzimas). As digestões foram feitas conforme protocolo do fabricante das enzimas (New England Biolabs). Utilizamos a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) para ligar as regiões 3'UTR digeridas ao vetor pGEM-5'UTR. As reações de ligação foram

utilizadas para transformar *Escherichia coli* DH10B, e os clones foram selecionados em meio LB sólido contendo 100 ug de ampicilina por mL. Cinco clones de cada ligação (pGEM-5'UTR + 3'UTR WT, pGEM-5'UTR + 3'UTR 1722 e pGEM-5'UTR +3'UTR 44005) foram triados por extração de seu DNA plasmideal (figura 16).

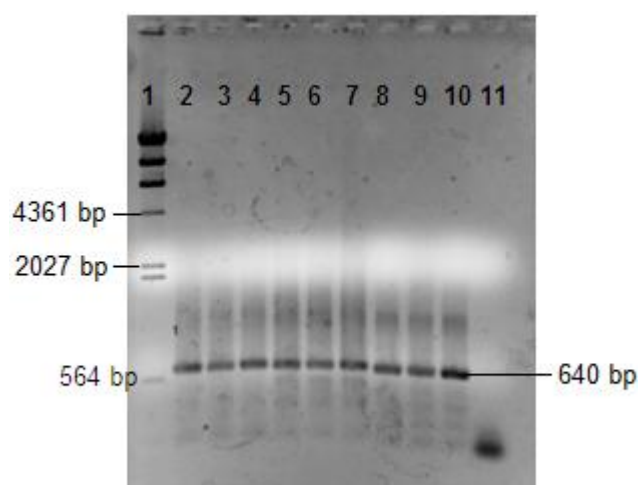


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose dos amplicons 3'UTR WT e mutados. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2, 3 e 4: amplicon 3'UTR WT; 5, 6 e 7: amplicon 3'UTR 17; 8, 9 e 10: amplicon 3'UTR 44.

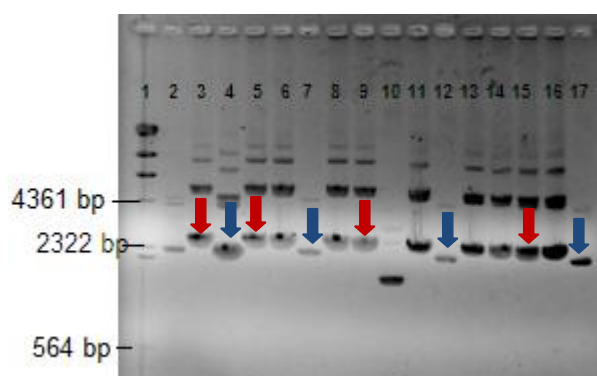


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose de potenciais clones pGEM-5'UTR-3'UTR. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: pGEM-5'UTR (controle); 3 a 7: clones pGEM-5'UTR-3'UTR WT; 8 a 12: clones pGEM-5'UTR-3'UTR; 13 a 17: clones pGEM-5'UTR-3'UTR. Setas vermelhas indicam alguns clones pGEM-5'UTR-3'UTR; setas azuis indicam clones pGEM-5'UTR (sem 3'UTR).

Este resultado nos indicou que havíamos conseguido vários clones pGEM-5'UTR-3'UTR, tanto para a 3'UTR WT quanto para aquelas portando as CICS. Uma vez que o fracionamento de moléculas circulares por eletroforese é pouco informativa quanto ao conteúdo da construção, foi feita digestão dos clones obtidos com as enzimas *NcoI* e *NdeI* para distinguir moléculas de pGEM-5'UTR contendo 3'UTR das que não a continham (veja mapas da figura 17). Quando estes vetores são digeridos com *NcoI* e *NdeI*, o primeiro libera um fragmento de 1191 pares de base, enquanto o segundo, 630 pares de base, tornando-se fácil diferenciar um do outro por uma digestão seguida de eletroforese. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose e o resultado foi analisado (figura 18).

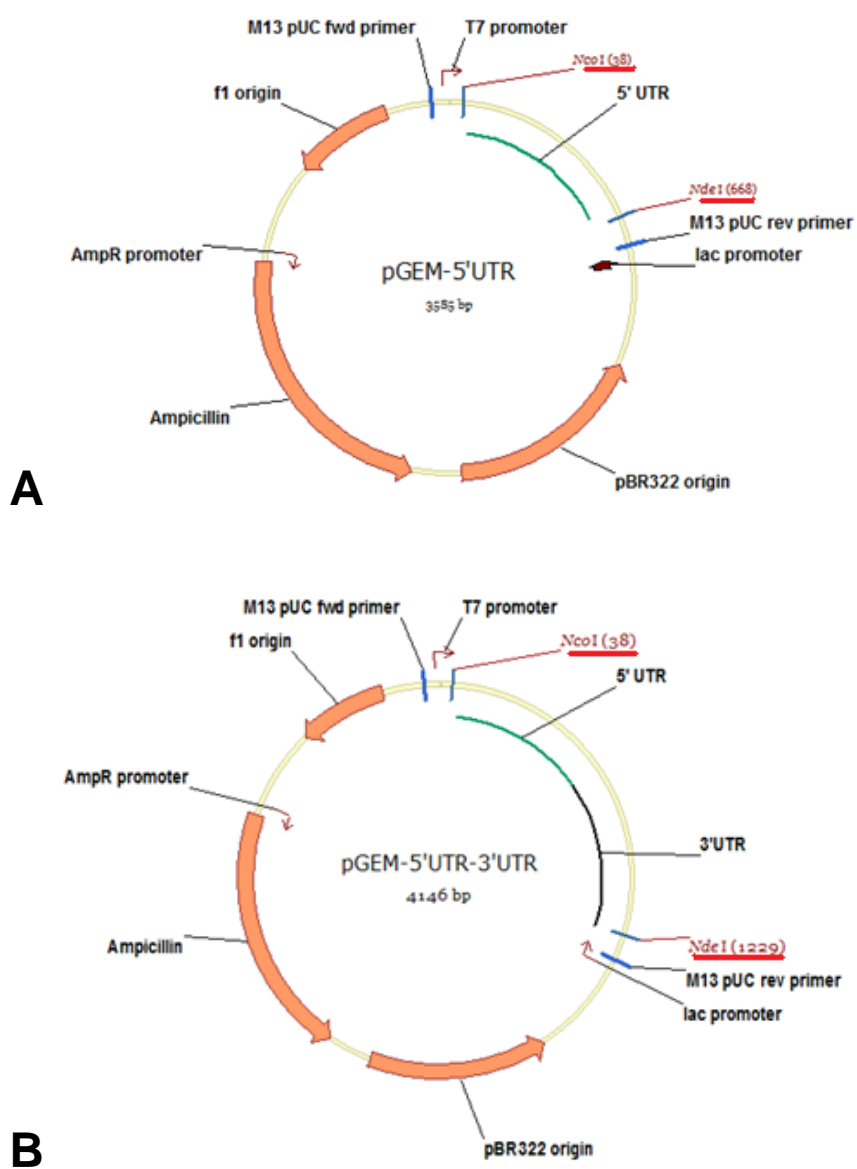


Figura 17: Mapas dos vetores pGEM-5'UTR (A) e pGEM-5'UTR-3'UTR (B).

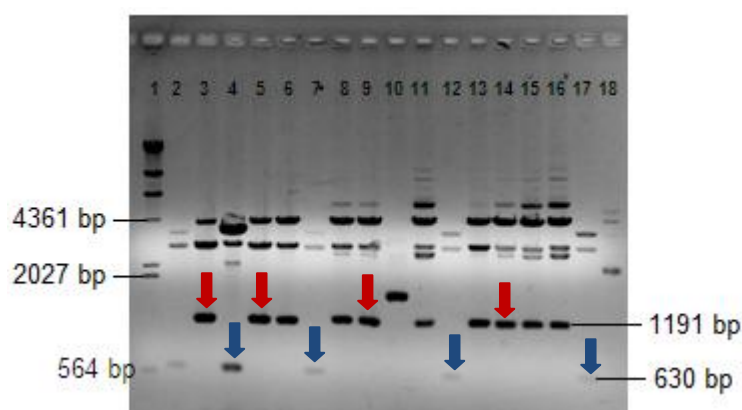


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose do DNA de potenciais clones pGEM-5'UTR-3'UTR digerido com *NdeI* e *EcoRI*. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: digestão pGEM-5'UTR (controle); 3 a 7: digestão de clones pGEM-5'UTR-3'UTR WT; 8 a 12: digestão de clones de pGEM-5'UTR-3'UTR 1722; 13 a 17: Digestão de clones de pGEM-5'UTR-3'UTR 4405; 18: pGEM-5'UTR não digerido (controle). Setas vermelhas indicam clones pGEM-5'UTR-3'UTR; azuis: clones pGEM-5'UTR (sem 3'UTR).

Este resultado pôde confirmar o sucesso da clonagem planejada. Sendo assim, os clones positivos foram sequenciados para confirmar a presença da região 3'UTR nos vetores, bem como, a presença das CICS no interior destas regiões. O oligonucleotídeo iniciador m13 reverso foi utilizado para fazer a reação de sequenciamento. O sequenciamento demonstrou que as sequências 3'UTR foram inseridas no vetor pGEM-5'UTR, formando os vetores pGEM-5'UTR-3'UTR. Demonstrou, também, que as CICS 1722 e 4405 foram inseridas com sucesso nas regiões 3'UTR. Foi feita mais uma eletroforese com os vetores pGEM-5'UTR-3'UTR (figura 19). Sendo assim, foi possível iniciar a última etapa das clonagens, a inserção do gene *neo* entre as regiões UTR dos vetores.

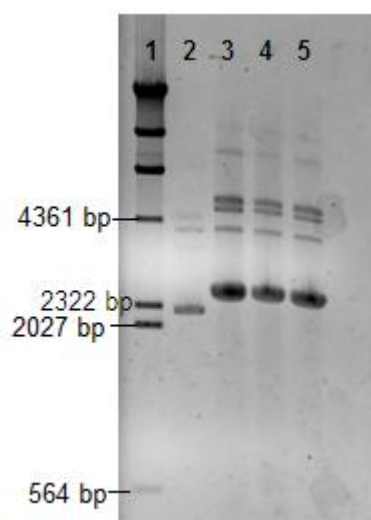


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos pGEM-5'UTR-3'UTR WT e mutados. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: pGEM-5'UTR (controle); 3: pGEM-5'UTR-3'UTR WT; 4: pGEM-5'UTR-3'UTR 1722; 5: pGEM-5'UTR-3'UTR 4405.

4.5. Construção de pGEM-5'UTR-neo-3'UTR

Como não foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar *neo*, esse gene foi isolado através da digestão enzimática do vetor pX63-Neo (Kapler *et al.*, 1990). Dois sítios de restrição para a enzima *SpeI* flanqueiam a sequência de *neo* neste vetor, portanto, uma digestão com esta enzima foi realizada, de acordo com o protocolo do fabricante (New England Biolabs), para isolar *neo*. Todo o volume da digestão foi fracionado em gel de agarose 0,8% para separar os fragmentos digeridos, e posteriormente, purificar o fragmento desejado (*neo*) (figura 20).

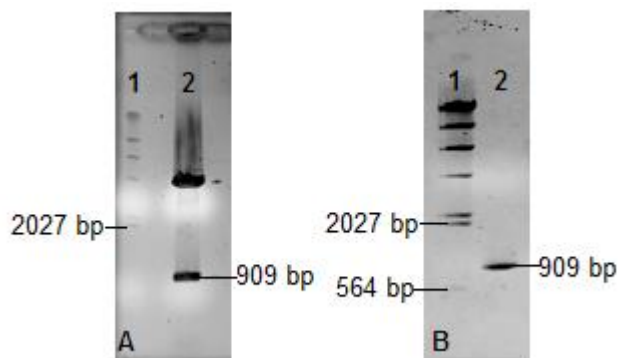


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose de pX63neo digerido com *SpeI*. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*, em ambos painéis; 2: digestão de pX63-Neo com *SpeI* em A, e purificação de *neo* em B.

Neo foi utilizado para fazer uma ligação com os vetores pGEM-5'UTR-3'UTR, previamente digeridos com *SpeI*. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH10B, por eletroporação. As primeiras triagens em busca de clones recombinantes foram realizadas por meio de extração de plasmídeos seguida de eletroforese. Como a eficiência de ligação foi baixa, resolvemos utilizar outra técnica para essas triagens, que nos permitisse analisar um número maior de clones por vez. Esta técnica é conhecida como *screening* de colônias recombinantes e é feita misturando-se uma colônia bacteriana a Fenol:Clorofórmio:Álcoolisoamílico (25:24:1) e tampão de amostra (glicerol, azul de bromofenol e Tris-EDTA). A amostra é misturada com vigor (pelo uso de *vortex*) e submetida a centrifugação. Na fração sobrenadante encontra-se, entre outras moléculas, o DNA das células, que pode então ser analisado por eletroforese. A figura 21 mostra o *screening* de pGEM-5'UTR-neo-3'UTR WT, 1722 e 4405.

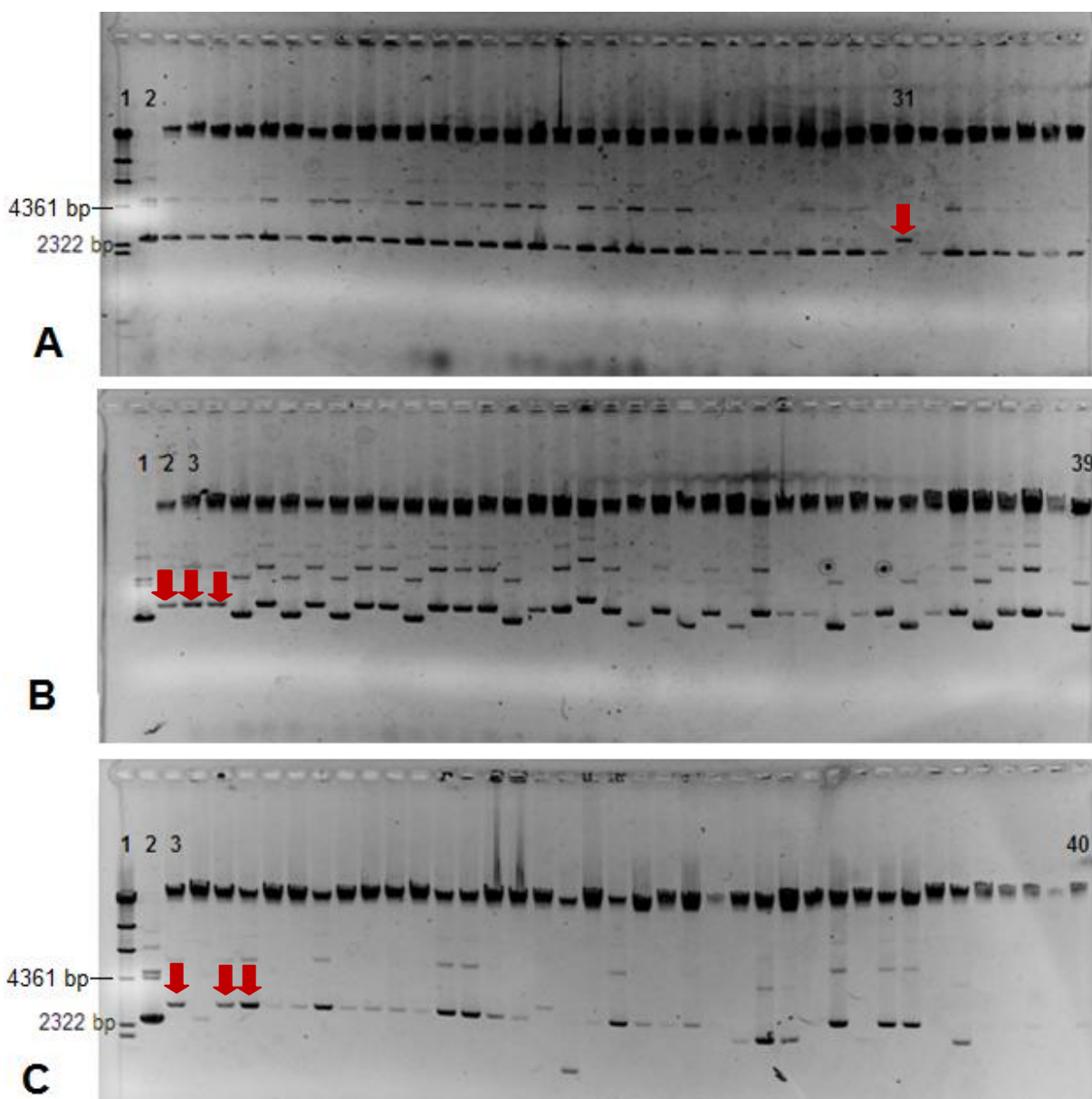


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose de *screening* de clones recombinantes. **(A)** Amostra 1: DNA de fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: pGEM-5'UTR-3'UTR WT (controle); 3 a 40: possíveis clones pGEM-5'UTR-neo-3'UTR WT. **(B)** Amostra 1: pGEM-5'UTR-3'UTR WT (controle); 2 a 39: possíveis clones pGEM-5'UTR-neo-3'UTR 1722. **(C)** Amostra 1: DNA de fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: pGEM-5'UTR-3'UTR WT (controle); 3 a 40: possíveis clones pGEM-5'UTR-neo-3'UTR 4405. Setas vermelhas indicam clones positivos (com *neo* inserido entre as regiões UTRs).

Embora inúmeros clones pGEM-5'UTR-neo-3'UTR 1722 e 4405 tenham sido obtidos, apenas um clone pGEM-5'UTR-neo-3'UTR WT foi observado. Alguns destes clones foram escolhidos para fazer uma extração de DNA plasmideal, uma

vez que era ainda necessário confirmar a orientação de *neo*. Ao analisarmos os mapas dos vetores produzidos (figura 22), a enzima *Nco*I foi escolhida para digerí-los, uma vez que seria possível distinguir clones com *neo* na orientação correta de clones errados. Digerindo-se estes vetores com *Nco*I, o primeiro libera um fragmento de 1197 pares de base, enquanto o segundo, 874 pares de base. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (figura 23).

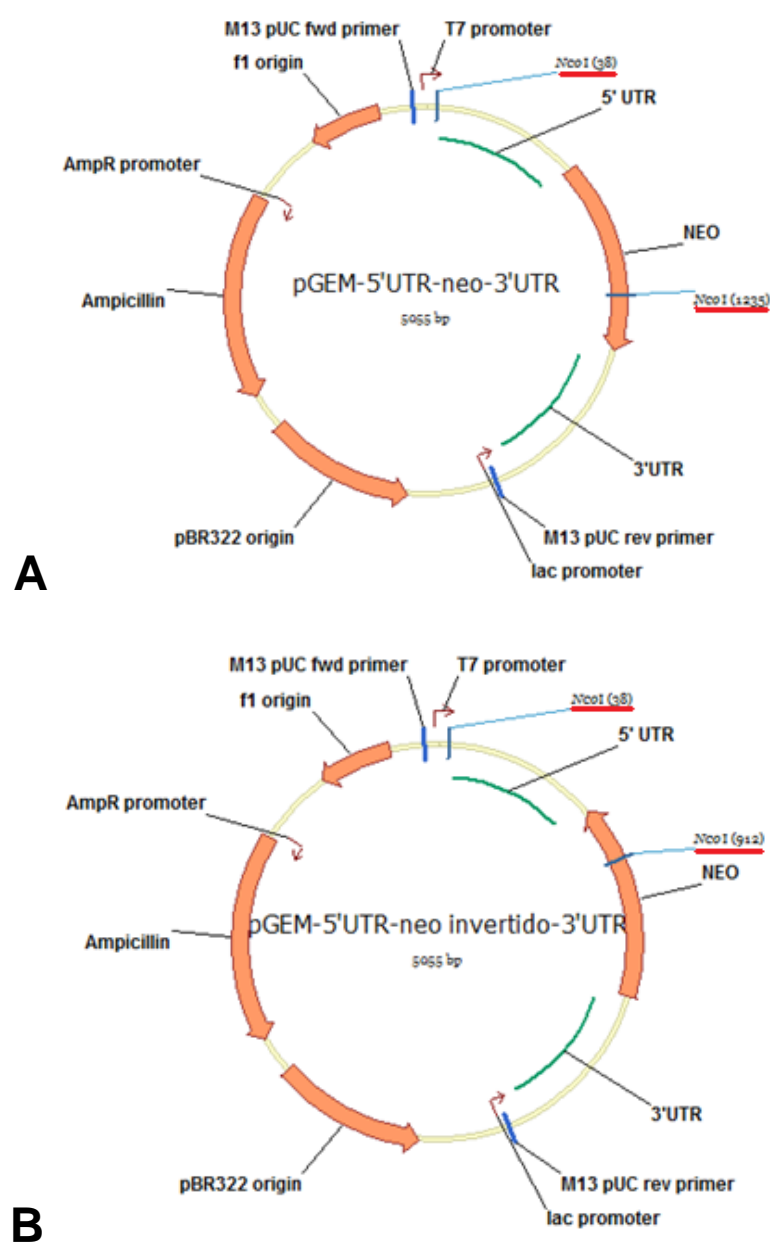


Figura 22: Mapas de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR. A: pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR com *neo* na orientação correta; B: pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR com *neo* na orientação incorreta.

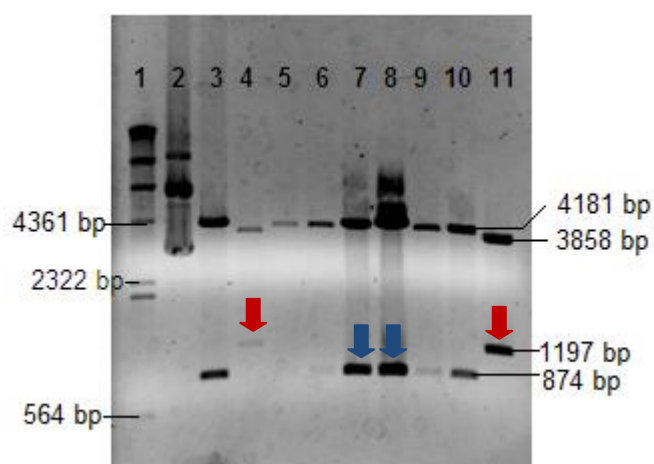


Figura 23: Eletroforese em gel de agarose de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *Hind*III; 2: pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR WT (controle); 3: digestão de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR WT invertido (controle negativo); 4 a 10: digestão de clones pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR 17; 11: digestão do clone pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR WT. Setas vermelhas indicam clones contendo o inserto *neo* na orientação correta; setas azuis indicam clones com o inserto *neo* na orientação incorreta.

Os plasmídeos das amostras 4 e 11 (figura 23) demonstraram portar o inserto *neo* no sentido correto e, juntamente com um clone plasmídeo pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR 4405 foram utilizados para transformar *Escherichia coli* DH10B. As células recombinantes foram cultivadas em 300 mL de meio LB, para podermos fazer uma extração de plasmídeos em maior escala (maxi-prep), visando conseguir DNA suficiente para transfectar *Leishmania donovani* BOB. A maxi-prep foi realizada com o kit Maxi-Prep (Quiagen), conforme protocolo do fabricante. Os plasmídeos extraídos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (figura 24).

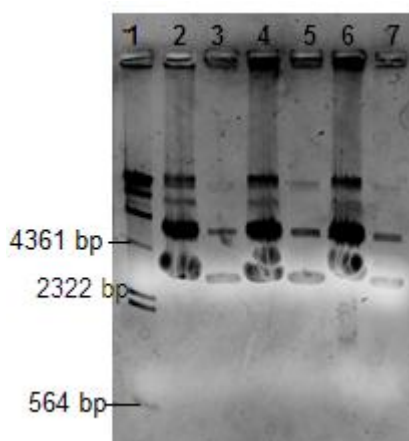


Figura 24: Eletroforese em gel de agarose de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR. Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *Hind*III; 2 e 3: primeira e segunda eluições de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR WT, respectivamente; 4 e 5: primeira e segunda eluições de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR 1722, respectivamente; 6 e 7: primeira e segunda eluições de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR 4405, respectivamente.

O DNA plasmideal extraído foi quantificado por espectrofotometria. 100 ug de cada vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Nde*I, visando liberar o cassete necessário para a recombinação homóloga (5'UTR-*neo*-3'UTR) do restante do vetor. O produto das digestões foi fracionado em gel de agarose 0,8% e os cassetes (aproximadamente 2300 bp de comprimento) foram purificados do gel com kit da Axygen (figura 25).

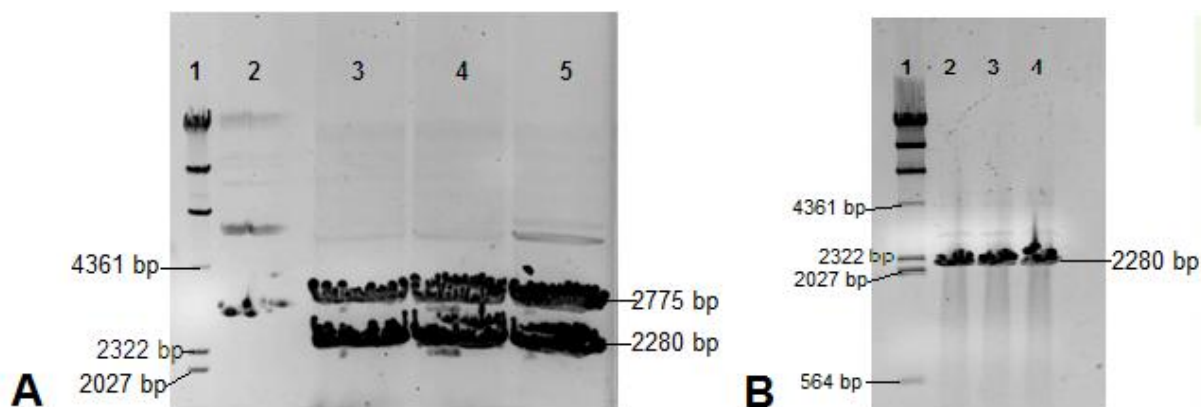


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose de pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR digeridos com *EcoRI* e *NdeI*. (A) Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR WT (controle); 3:pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR WT digerido; 4: pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR 1722 digerido; 5: pGEM-5'UTR-*neo*-3'UTR 4405 digerido. (B) Amostra 1: DNA do fago *Lambda* digerido com *HindIII*; 2: cassete 5'UTR-*neo*-3'UTR WT; 3:cassete 5'UTR-*neo*-3'UTR 1722; 4: cassete 5'UTR-*neo*-3'UTR 4405.

Os cassetes 5'UTR-*neo*-3'UTR (WT, 1722 e 4405) purificados foram quantificados. 3 μg de cada cassete foram utilizadas para transfectar 5×10^7 células de *Leishmania donovani* BOB por eletroporação. As células eletroporadas foram incubadas em meio M199 *overnight* para recuperarem-se do stress causado pelo choque. No dia seguinte, foram plaqueadas em meio M199 sólido contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da droga G418, um análogo da neomicina, visando a seleção de clones recombinantes. As placas foram mantidas em estufa a 25° C por duas semanas. Ao final dessas duas semanas, as placas foram analisadas, mas nenhum clone cresceu. As placas foram deixadas na estufa por mais duas semanas, e duas colônias cresceram, porém ainda não foram analisadas.

5. Conclusões e perspectivas

Foi possível construir moléculas recombinantes, que envolveram diferentes etapas de clonagem e metodologias de mutagênese *in vitro*, como em nossa proposta original. Foi possível ainda transfectar *Leishmania donovani* com os fragmentos lineares contendo o gene repórter acompanhado das UTRs selvagem e mutadas. Duas colônias foram observadas nas placas. As novas etapas deste trabalho serão a obtenção de clones transfectantes e análise da expressão gênica de *neo*.

6. Considerações Finais

O tempo que passei na Universidade de São Paulo foi bastante proveitoso para mim, não somente pelo lado profissional, mas também por representar uma boa experiência de vida. Conheci pessoas dentro e fora da universidade, fiz grandes amigos e tive a oportunidade de trabalhar em um laboratório de ponta na área em que atua. Não tenho dúvidas do quanto esta experiência foi importante pra mim.

7. Referências

ALVAR, J.; BASHAYE, S.; ARGAW, D.; CRUZ, I.; APARICIO, P.; KASSA, A.; ORFANOS G.; PARREÑO, F.; BABANIYI, O.; GUDETA, N.; CAÑAVATE, C. and Caryn BERN. Kala-Azar Outbreak in Libo Kemkem, Ethiopia: Epidemiologic and Parasitologic Assessment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 275-282, 2007.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, Nov 2000.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D. C.; LENNARD, N. J.; CALER, E.; HAMLIN, N. E.; HAAS, B.; BOHME, U.; HANNICK, L.; ASLETT, M. A.; SHALLOM, J.; MARCELLO, L.; HOU, L.; WICKSTEAD, B.; ALSMARK, U. C.; ARROWSMITH, C.; ATKIN, R. J.; BARRON, A. J.; BRINGAUD, F.; BROOKS, K.; CARRINGTON, M.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T. J.; CHURCHER, C.; CLARK, L. N.; CORTON, C. H.; CRONIN, A.; DAVIES, R. M.; DOGGETT, J.; DJIKENG, A.; FELDBLYUM, T.; FIELD, M. C.; FRASER, A.; GOODHEAD, I.; HANCE, Z.; HARPER, D.; HARRIS, B. R.; HAUSER, H.; HOSTETLER, J.; IVENS, A.; JAGELS, K.; JOHNSON, D.; JOHNSON, J.; JONES, K.; KERHORNOU, A. X.; KOO, H.; LARKE, N.; LANDFEAR, S.; LARKIN, C.; LEECH, V.; LINE, A.; LORD, A.; MACLEOD, A.; MOONEY, P. J.; MOULE, S.; MARTIN, D. M.; MORGAN, G. W.; MUNGALL, K.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PAI, G.; PEACOCK, C. S.; PETERSON, J.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; REITTER, C.; SALZBERG, S. L.; SANDERS, M.; SCHOBEL, S.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; SIMPSON, A. J.; TALLON, L.; TURNER, C. M.; TAIT, A.; TIVEY, A. R.; VAN AKEN, S.; WALKER, D.; WANLESS, D.; WANG, S.; WHITE, B.; WHITE, O.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.; WORTMAN, J.; ADAMS, M. D.; EMBLEY, T. M.; GULL, K.; ULLU, E.; BARRY, J. D.; FAIRLAMB, A.

H.; OPPERDOES, F.; BARRELL, B. G.; DONELSON, J. E.; HALL, N.; FRASER, C. M.; MELVILLE, S. E.; EL-SAYED, N. M. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, 2005.

BRUZIK, J. P.; VAN DOREN, K.; HIRSH, D.; STEITZ, J. A. Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. **Nature**, v. 335, n. 6190, p. 559-62, Oct 6 1988.

BRYCESON, A. Tropical medicine for the 21st century. Tropical medicine should be concerned with medical problems endemic to the tropics. **British Medical Journal**, v. 311, pg. 860–862, 1995.

CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE T.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHERJEE, B., SENGUPTA, S; CHATTOPADHYAY, S.; JAISANKAR, P.; ROY, S.; MAJUMDER, H. K. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. **EMBO Mol Med.**, v. 4, n. 10, p. 1126-1143, 2012.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 425-431, 1996.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 4-6, Jan 2006.

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acessado dia 22/12/2012.

<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>. Acessado dia 22/12/2012

<http://www.who.int/whr/2004/en/index.html>. Acessado dia 22/12/2012.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, 90 K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MULLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHAFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B.; MYLER, P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-42, Jul 15 2005.

JAGER, A. V.; DE GAUDENZI, J. G.; CASSOLA, A.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 7, p. 2035-42, Feb 13 2007.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for

extrachromosomal replication and expression. **Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 1084–1094, 1990.

LAHAV, T.; SIVAM, D.; VOLPIN, H.; RONEN, M.; TSIGANKOV, P.; GREEN, A.; HOLLAND, N.; KUZYK, M.; BORCHERS, C.; ZILBERSTEIN, D.; MYLER, P. J. Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. **Faseb J**, v. 25, n. 2, p. 515-25, 2011.

LAURENTINO, E. C. ; RUIZ, J. C. ; FAZELINIA, G. ; MYLER, P. J. ; DEGRAVE, Wim Maurits ; ALVES-FERREIRA, M. ; RIBEIRO, Jose Marcos C ; CRUZ, A. K. . A survey of *Leishmania braziliensis* genome by shotgun sequencing. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 137, p. 81-86, 2004.

LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Dev**, v. 7, n. 6, p. 996-1007, Jun 1993.

LIANG, X. H.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LUSTIG, Y.; SHEINER, L.; VAGIMA, Y.; GOLDSHMIDT, H.; DAS, A.; BELLOFATTO, V.; MICHAELI, S. Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*. **EMBO Rep**, v. 8, n. 4, p. 408-13, Apr 2007.

MYLER, P. J.; SISK, E.; MCDONAGH, P. D.; MARTINEZ-CALVILLO, S.; CHNAUFER, A.; SUNKIN, S. M.; YAN, S.; MADHUBALA, R.; IVENS, A.; STUART,

K. Genomic organization and gene function in Leishmania. **Biochem Soc Trans**, v. 28, n. 5, p. 527-531, 2000.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464-1488, 2011.

PINTO, M. C.; CAMPBELL – LENDRUM, D. H.; LOZOVEI, A. L.; TEODORO, U. and DAVIES, C.R.. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 132-139, 2001.

PISCOPO, T. V. and MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 982, p. 649–657, 2006.

RANGEL, E. F. e LAINSOH, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 368 p. 2003.

RAVINDER; BHASKAR; GANGWAR, S.; GOYAL, N. Development of Luciferase Expressing Leishmania donovani Axenic Amastigotes as Primary Model for In Vitro Screening of Antileishmanial Compounds. **Curr Microbiology**, Sep 4 2012.

REAL, F.; MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of Leishmania parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1518, 2012.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, Hechmi; PIRMEZ, Claude; ALEXANDER, B. and BROOKER, Simon . Cutaneous leishmaniasis. **THE LANCET Infectious diseases**, v. 7 , n. 9, p. 581-596, 2007.

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; MYLER, P. J.; OLAFSON, R. W.; ZILBERSTEIN, D. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. **Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 1843-1850, 2008.

SILVA, A. M.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; COOMBS, G. H. Metabolic Variation during Development in Culture of *Leishmania donovani* Promastigotes. **PLoS Negl Trop Dis** 5(12): e1451, 2011.

TERRÃO, M. C. Investigação de mecanismos e elementos envolvidos no processo de regulação de expressão gênica em *Leishmania*. Tese de doutorado defendida junto ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo/Campus Ribeirão Preto, 2012.

VASCONCELOS, E. J.; TERRAO, M. C.; RUIZ, J. C.; VENCIO, R. Z.; CRUZ, A. K. In silico identification of conserved intercoding sequences in *Leishmania* genomes: unraveling putative cis-regulatory elements. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 183, n. 2, p. 140-50, 2012.

WU, Y.; EL FAKHRY, Y.; SERENO, D.; TAMAR, S.; PAPADOPOULOU, B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Mol Biochem Parasitol**, v. 110, n. 2, p. 345-357, 2000.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 449-70, 1994.