



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento de plasmídeo para expressão protéica
dependente da fase do ciclo de vida em *Leishmania***

Leonardo Vicentini Arruda

**Salvador – Bahia – Brasil
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia

**Desenvolvimento de plasmídeo para expressão protéica
dependente da fase do ciclo de vida em *Leishmania***

Leonardo Vicentini Arruda

Orientadores: Manoel Barral-Netto
Daniel Ruiz Abánades
Manuel Soto

Tese apresentada ao colegiado do curso de pós-graduação
em Patologia, como requisito para obtenção do grau de doutor.

Salvador – Bahia – Brasil
2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Arruda, Leonardo Vicentini
A773d Desenvolvimento de plasmídio para expressão protéica dependente da fase do ciclo de vida em *leishmania*. [manuscrito] / Leonardo Vicentini Arruda.- 2013.
76 f.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia, 2013.
Orientador: Dr. Manoel Barral-Netto.

1. Leishmania 2. Plasmídio 3. Ciclo de vida I. Título

CDU 616.993.161

**“DESENVOLVIMENTO DE PLASMÍDIO PARA EXPRESSÃO PROTÉICA DEPENDENTE DA
FASE DO CICLO DE VIDA EM *LEISHMANIA*”.**

LEONARDO VICENTINI ARRUDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

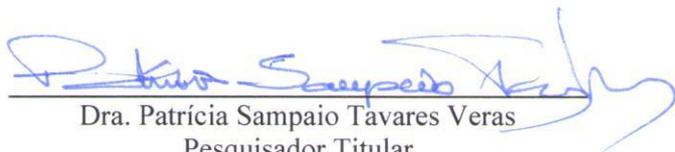
COMISSÃO EXAMINADORA



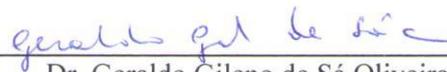
Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
Professor Associado
UFMG



Dra. Lucile M. Floeter-Winter
Professor Titular
USP



Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ/Ba



Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ/Ba



Dr. Manoel Barral Netto
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Às mulheres que vivem entre os Homens mais pobres

AGRADECIMENTOS

À minha esposa.

Aos meus pais.

Aos meus orientadores.

A todos que tiveram participação direta ou indireta na conclusão deste trabalho, que sempre serão lembrados, até quando minha memória permitir.

Aos indivíduos os quais foram isoladas as cepas utilizadas neste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Lista de figuras.....	9
Lista de tabelas.....	11
Lista de abreviaturas.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
I – INTRODUÇÃO	15
1.1 - <i>Leishmania</i>	16
1.1.1 - Leishmanioses	18
1.2 - Biologia molecular da <i>Leishmania</i>	19
1.2.1 – O genoma.....	19
1.2.2 – Transcrição e processamento de RNAm	21
1.2.3 - Regulação da expressão gênica	21
1.2.4 - Expressão diferencial de genes ao longo do ciclo de vida	23
1.3 – Genes repórteres e proteínas fluorescentes.....	24
II – OBJETIVO, HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	27
III – MÉTODOS.....	29
Parasitas.....	30
PCR e clonagem	31
Sub-clonagem	35
pFL Tub e pFL Ama.....	37
Transfecção de promastigotas	37
Citometria de fluxo.....	38
IV – RESULTADOS	39

ÍNDICE

Premissa A – Transfecção	40
Premissa B – Seleção de clones.....	41
Premissa C – Análise da fluorescência de cada clone	42
Premissa D - Teste de estabilidade do plasmídeo	43
Premissa E - Teste da expressão de fluorescência em amastigotas	47
Geração de <i>L. infantum</i> transgênica plasmídios pFL Ama e pFL Tub.....	48
Observação de <i>L. infantum</i> transgênica por microscopia de fluorescência.....	48
Análise de fluorescência em promastigotas e durante diferenciação	49
Expressão dos plasmídios pFL e pX63 simultaneamente	51
V – DISCUSSÃO	53
O plasmídeo pFL.....	54
Perspectivas - Possíveis aplicações e mudanças na construção	56
Droga de seleção.....	56
Expressão em diferentes estágios do ciclo de vida.....	57
Expressão de outras proteínas.....	59
Outras regiões inter-gênicas de interesse.....	59
Estudo da expressão provida por regiões 5' UTR	60
Projeto <i>Leishmania</i> suicida.....	61
Outras aplicações para o plasmídeo pFL.....	61
VI – CONCLUSÕES.....	63
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
VIII – ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	17
Figura 2 – Representação esquemática de região de troca de fita no cromossomo de tripanossomatídeo.	20
Figura 3 - Representação esquemática de regiões codificantes e intra-gências no cromossomo de <i>L. infantum</i> .	24
Figura 4 – Representação esquemática de plasmídios portando regiões inter-gências da tubulina.	32
Figura 5 – Plasmídio portando regiões codificante para Puromicina–N–acetiltransferase.	33
Figura 6 – Plasmídio portando região codificante para proteína fluorescente mCherry.	34
Figura 7 – Representação esquemática do plasmídio pBIs UTR Ama.	34
Figura 8 – Representação esquemática do plasmídio pBIs TubPuro.	35
Figura 9 – Representação esquemática do plasmídio pBIs TubPuroTub.	36
Figura 10 – Representação esquemática do plasmídio pBIs TubPuroTubCherry.	36
Figura 11 – Plasmídios pFL de expressão de fluorescência em <i>Leishmania</i> .	37
Figura 12 – Representação esquemática do plasmídio pX63NeoGFP.	40
Figura 13 – Microscopia de fluorescência de <i>L. infantum</i> expressando o plasmídio pX63NeoGFP.	41
Figura 14 – Placa de meio sólido com clones de <i>L. infantum</i> .	42
Figura 15 – Análise da intensidade de fluorescência em diferentes clones.	43
Figura 16 – Análise da estabilidade do plasmídio sem droga de seleção.	44
Figura 17 – Análise da estabilidade do plasmídio com manutenção da droga de seleção.	44
Figura 18 – Análise da intensidade de fluorescência com diferentes condições de pressão de droga de seleção.	45
Figura 19 – Imagem composta de macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c infectados por <i>L. infantum</i> .	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 20 – Imagem de fluorescência de promastigotas de <i>L. infantum</i> , portando o plasmídeo pFL Tub.	48
Figura 21 – Imagens de <i>L. infantum</i> portando plasmídeo pFL Ama após 48 horas do início da diferenciação em amastigotas.	49
Figura 22 – Análise de fluorescência de parasitas durante diferenciação em amastigotas.	50
Figura 23 – Análise de fluorescência em promastigotas de <i>L. infantum</i> portando dois plasmídios simultaneamente.	51
Figura 24 - Representação esquemática do plasmídeo pBIs Neo.	56
Figura 25 - Representação esquemática do plasmídeo pBIs Hyg.	57
Figura 26 - Representação esquemática do plasmídeo pFL 5' UTR Gp63.	60

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Estabilidade do plasmídio pX63NeoGFP	46
Tabela 2 – Parasitas transgênicos obtidos e seus respectivos plasmídios epissômicos	52

LISTA DE ABREVIATURAS

CFP	Proteína ciano fluorescente
DGCs	Agrupamentos gênicos direcionados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GFP	Proteína verde fluorescente
IF	Intensidade de fluorescência
Kb	Quilobases
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
Mb	Megabases
Neo	Neominina
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Poli-A	Poliadelição
Puro	Puromicina-N-acetiltransferase
RFP (mCherry)	Proteína vermelha fluorescente
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SBFi	Soro bovino fetal inativado
SL-RNA	Sequencia líder de RNA
SSRs	Regiões de troca de fita
UTR	Regiões não traduzidas
WT	Cepa selvagem
YFP	Proteína amarela fluorescente

RESUMO

ARRUDA, LEONARDO VICENTINI. DESENVOLVIMENTO DE PLASMÍDIO PARA EXPRESSÃO PROTÉICA DEPENDENTE DA FASE DO CICLO DE VIDA EM *Leishmania*. Tese (Doutorado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, 2013.

Protozoários do gênero *Leishmania* provocam uma ampla gama de doenças, e passam por um processo de diferenciação entre o inseto vetor e a forma intracelular no hospedeiro mamífero. Apesar das diferenças entre as formas do ciclo de vida, não estava descrita ferramenta para expressar proteínas de modo estágio específico. Neste trabalho apresentamos um plasmídeo para *Leishmania* que expressa proteína recombinante de forma estágio específica. Testamos uma possível construção que usava as região 3' UTR do gene amastina para controlar a expressão de uma proteína fluorescente e a expressar exclusivamente na fase amastigota. Também utilizamos a região 3' UTR de uma tubulina para obter uma fluorescência homogênea em todos os estágios do ciclo de vida do parasita. Assim como esperado, obtivemos uma fluorescência exclusiva para a fase amastigota quando utilizamos a região 3' UTR da amastina, e uma fluorescência constitutiva quando a expressão foi regulada pela região 3' UTR da tubulina. O plasmídeo descrito neste trabalho é versátil, pois a droga de seleção ou a proteína a ser expressa podem ser substituídas com grande facilidade. Adicionalmente, como o plasmídeo pFL expressou um gene repórter exclusivamente no estágio amastigota ou constitutivamente, acreditamos que este plasmídeo pode também ser utilizado para expressar proteínas de forma restrita aos estágios promastigota metacíclico e procíclico. Alguns possíveis usos desta nova ferramenta também são discutidos nesta tese.

Palavras chave: *Leishmania*; plasmídeo; ciclo de vida; expressão proteínas.

ABSTRACT

ARRUDA, LEONARDO VICENTINI. LIFE-CYCLE DEPENDENT GENE EXPRESSION PLASMID FOR *Leishmania*, Tese (Doutorado), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, 2013.

The parasitic protozoan *Leishmania* causes a wide spectrum of diseases and passes through differentiation between the sand fly and the intracellular form. Despite distinction between life-cycle forms of the parasite, there is no described tool to express a protein in a specific stage. Here, we present a plasmid for *Leishmania* that can express recombinant proteins in a specific life-cycle stage. We tested one possible construction that used the 3' UTR region of the amastin gene to control the expression of a fluorescent protein exclusively in the amastigote stage. We also used the 3' UTR of a tubulin to obtain a homogeneous fluorescence in all stages of the parasite life cycle. As expected, was observed a fluorescence exclusive to the amastigote phase with the 3' UTR amastin construction, and a constitutive fluorescence when the expression were regulated by the 3' UTR of a tubulin. The plasmid described here is versatile since the drug that will be used for selection or the protein that will be expressed can be easily changed. Moreover, plasmid pFL have expressed a reporter gene exclusively in the amastigote stage or constitutively, we believe that this plasmid can also be used to express proteins in metacyclic and procyclic promastigote stages only. Some possible uses of this new tool are also discussed.

Keywords: *Leishmania*; plasmid; life-cycle; protein expression

I – INTRODUÇÃO

1.1 - *Leishmania*

O gênero *Leishmania* é composto por mais de 20 espécies de protozoários que pertencem a classe Kinetoplastida e ordem Trypanosomatidae. Dentro do gênero *Leishmania* existe uma divisão em sub-gêneros: *L. (leishmania)*, vulgarmente conhecidas como leishmanias do velho mundo; *L. (viannia)*, vulgarmente conhecidas como espécies do novo mundo; e *L. (sauroleishmania)*, uma forma não infectiva em mamíferos (Bañuls, Hide e Tibayrenc, 2002) (Fraga *et al.*, 2010).

Estes parasitos apresentam um ciclo de vida digenético, alternando uma fase promastigota (flagelada), presente no intestino do inseto vetor, e outra forma com tamanho reduzido, denominada amastigota (com flagelo não aparente), encontrada no fagolisossomo de células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (revisto em Muskus e Marín Villa, 2002).

O ciclo da leishmania (Figura 1) se inicia durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, quando este inocula formas promastigotas no hospedeiro vertebrado junto com saliva. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos residentes ou neutrófilos recrutados pela picada do inseto (Ribeiro-Gomes e Sacks, 2012). No interior do fagolisossomo, as promastigotas se transformam em amastigotas, que possuem tamanho reduzido. Após divisão binária, ocorre infecção de mais células fagocíticas (Naderer e McConville, 2008). Quando um novo inseto vetor se alimentar do mamífero infectivo as formas amastigotas são ingeridas junto às células presentes no sangue. Uma vez no intestino do inseto, a forma amastigota é novamente submetida a importantes mudanças no ambiente (pH e temperatura). Isto dispara o processo de diferenciação que produz mudanças na composição da superfície do parasito, no metabolismo, assim como na própria morfologia do parasito. Esta forma do parasito, denominada promastigota procíclica ou pouco infectante sofre processo de diferenciação denominado metaciclogênese, transformando-se em uma forma altamente infectante (promastigota metacíclica), que migrará para a probóscide do inseto vetor. Ao efetuar novo repasto, o inseto inocula promastigotas no hospedeiro, fechando o ciclo de vida do parasito. (Muskus e Marín Villa, 2002).

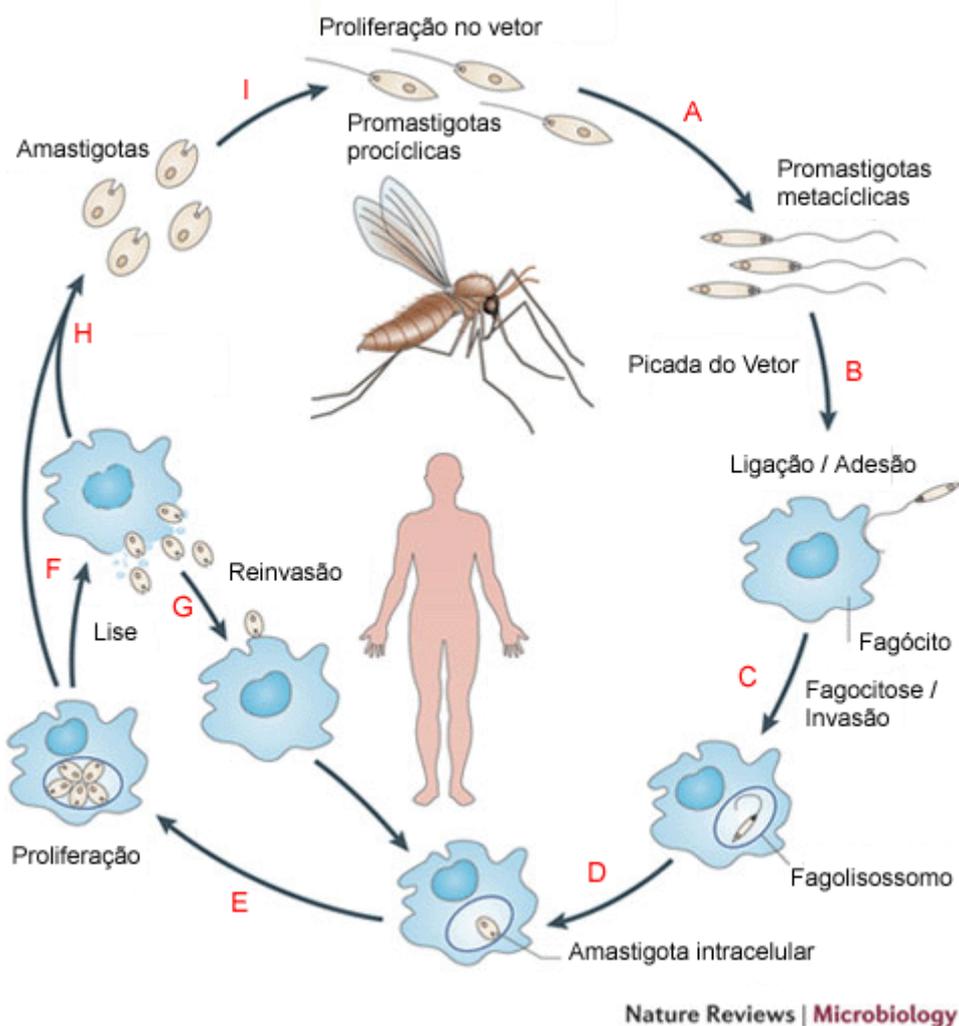


Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* – A) *Leishmania* em forma de promastigotas procíclicas se replicam e diferenciam no inseto vetor para formas infectivas e não replicantes denominadas promastigotas metacíclicas. B) Durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, promastigotas metacíclicas são regurgitadas no hospedeiro junto com a saliva. C) Os parasitos inoculados invadem ou são fagocitados por alguma entre muitas possíveis células de defesa encontradas ou recrutadas ao local da picada. D) Após estabelecer uma resistência intracelular, promastigotas metacíclicas se transformam em uma forma não flagelada denominada amastigota. E) Replicação de amastigotas dentro da célula hospedeira. F) Célula hospedeira se rompe com o excesso de amastigotas. G) Re-infecção de outros fagócitos. H) O ciclo de vida do parasito se completa quando fagócitos infectados são ingeridos por outro inseto vetor durante repasto sanguíneo. I) Amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do inseto (Adaptado de http://www.nature.com/nrmicro/journal/v9/n8/fig_tab/nrmicro2608_F1.html#figure-title).

Em condições de diferenciação de amastigotas para promastigotas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a diferenciação e a divisão celular ocorrem coincidentemente. (Bates, 1994). Apesar da apresentação de um fenótipo muito diferente entre as

diferentes fases do ciclo de vida, apenas 0,2% a 5% das proteínas estão diferencialmente expressas quando comparados a expressão nas fases amastigotas e promastigotas (Cohen-Freue *et al.*, 2007). Adicionalmente, Tsigankov *et al.*, (2013) relataram uma diferencial fosforilação em algumas proteínas de *L. donovani* de acordo com a fase do ciclo de vida.

1.1.1 - Leishmanioses

As leishmanioses são doenças provocadas pela infecção de parasitos do gênero *Leishmania*. Possuem um amplo espectro de manifestações clínicas com sintomatologia extremamente variável: Em um extremo pode-se observar uma infecção assintomática, no outro extremo uma doença visceral potencialmente fatal (Pearson e Sousa, 1996).

Algumas espécies de parasitos infectam órgãos viscerais, como *L. infantum*, ao passo que outras espécies, como *L. braziliensis* produzem uma doença tegumentar (cutânea ou mucosa).

1.1.1.1 - Leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana abrange diferentes formas de doença cutânea e mucocutânea. A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma mais frequente entre todas as leishmanioses, cuja doença geralmente produz uma úlcera única com bordas elevadas e centro necrótico (Ministério da Saúde, 2007). A cura é o desfecho mais frequente para esta doença, seguida pela presença de uma imunidade de longa duração. No Brasil a LC é causada majoritariamente por *L. braziliensis* embora também haja casos por *L. amazonensis* (Vieira-Gonçalves *et al.*, 2008). Com menor frequência, aparecem casos de leishmaniose mucosa ou cutânea difusa (Ministério da Saúde, 2007).

1.1.1.2 - Leishmaniose visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença grave, afetando majoritariamente pessoas que vivem em condições de pobreza. Estimam-se mais de 200 mil novos casos anuais em todo mundo, dentre os quais de 20 a 40 mil evoluem a óbito. (Alvar

et al., 2012). Esta doença ceifou a vida de mais de 100 mil refugiados durante a guerra civil no Sudão (Ritmeijer e Davidson, 2003).

No Brasil, a LV afeta mais de 4.500 pessoas anualmente (Karagiannis-Voules *et al.*, 2013) e o agente etiológico é *L. infantum chagasi*. A maioria dos casos aflige crianças com menos de 10 anos, entretanto casos em adultos não são infrequentes (WHO, 2010). Os sintomas da leishmaniose visceral incluem aumento de baço e fígado, febre, perda de peso e pancitopenia (revisto em Murray *et al.*, 2012). Fatores de risco para progressão da doença visceral incluem má nutrição, fatores genéticos do hospedeiro e parasito bem como a co-infecção com outras doenças, em especial HIV (WHO, 2010).

Os fatores determinantes para a geração de uma doença visceral continuam não totalmente compreendidos, apesar dos conhecimentos já acumulados em relação à genética do parasito e as respostas imunológicas do hospedeiro (McCall, Zhang e Matlashewski, 2013). Sabe-se que cepas visceralizantes possuem uma maior resistência a temperaturas altas causadas pela febre, bem como a oxidantes produzidos pelos fagócitos (Sarkar *et al.*, 2012).

1.2 - Biologia molecular da *Leishmania*

Os tripanossomatídeos apresentam uma série de características muito diferentes de outros eucariotos. Além de importantes peculiaridades em sua biologia celular (glicosomo, kinetoplasto), é especialmente chamativa sua biologia molecular em especial ao que se refere à organização gênica, a transcrição e processamento do RNAm (RNA mensageiro), assim como a regulação da expressão gênica.

1.2.1 – O genoma

Algumas espécies de *Leishmania* tiveram seu genoma seqüenciado, o que revelou fatos extraordinários em relação à organização gênica nesses parasitos. O material genético possui aproximadamente 35 Mb, divididos entre 34 a 36 cromossomos de acordo com a espécie (Ivens *et al.*, 2005), (Peacock *et al.*, 2007), que assim como em outros protozoários, não formam cromátides em nenhum momento do ciclo celular, e sendo assim, para visualização do cariótipo, é

necessária a utilização de técnicas específicas, como eletroforese de campo pulsado ou eletroforese bidimensional de campo pulsado (Hernandez-Rivas e Scherf, 1997).

Os genes de tripanossomatídeos não possuem íntrons, com exceção do gene poli(A) polimerase descrito em *T. brucei* e *T. cruzi* (Mair *et al.*, 2000), e se organizam em largos agrupamentos com a mesma orientação transcripcional denominados de agrupamentos gênicos direcionados (DGCs do inglês: *directional gene cluster*). Os DGCs estão separados por regiões de troca de fita, onde o sentido da transcrição poderá ser na fita de DNA convergente ou divergente, ou seja, a transcrição ocorrerá tanto em uma fita de DNA quanto na outra e em direções opostas (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003) (Figura 2). Todas estas características nos remetem as unidades policistrônicas encontradas em procariotos, exceto pelo fato do arranjo gênico não codificar proteínas com funções relacionadas (Kozak, 1983), (Tamames *et al.*, 1997).

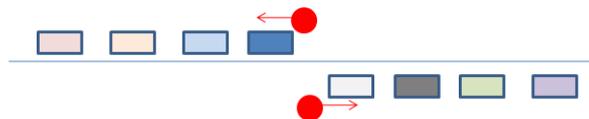


Figura 2 – Representação esquemática de região de troca de fita no cromossomo de tripanossomatídeo. Caixas representam regiões codificantes, e círculos vermelhos com setas indicam a enzima RNA polimerase II com sentido da transcrição.

Alguns genes apresentam somente uma cópia, mas é comum a presença de múltiplas cópias de um mesmo gene de forma agrupada em *tandem* ou dispersa no genoma. Podemos destacar o gene da amastina, que em *L. major* apresenta 55 cópias distribuídas entre 7 cromossomos (Rochette *et al.*, 2005). No genoma da *Leishmania* também existem genes que se agrupam em pares. As regiões codificantes dos genes repetidos são normalmente bem conservadas. Já as regiões não traduzidas (UTR) podem estar conservadas ou apresentar importantes diferenças em suas sequências, que estão relacionadas com uma expressão gênica diferencial, como revisto em Clayton (2002).

1.2.2 – Transcrição e processamento de RNAm

Os tripanossomatídeos apresentam um modo não convencional de transcrição de seus genes, muito em consonância com a organização gênica previamente comentada.

Outra característica que difere *Leishmania* de outros eucariotos é a ausência de sequências promotoras para a RNA polimerase II, responsável pela transcrição da maior parte do RNA mensageiro celular. A RNA polimerase II realiza a transcrição policistrônica (ou poligênica) das unidades gênicas presentes nos cromossomos. Esta enzima inicia a transcrição nas regiões de troca de fita, entre dois agrupamentos gênicos com direção oposta e termina a transcrição novamente nas regiões de troca de fita ou no final do cromossomo (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). Apesar disto, os mecanismos que iniciam a transcrição não estão totalmente elucidados e as sequências de início de transcrição não foram definidas (Clayton, 2002).

O RNA mensageiro policistrônico é processado mediante o acoplamento de dois mecanismos, denominado *trans-splicing*, para gerar formas traduzíveis (monocistrônicas). O *trans-splicing* consiste na adição de um polirribonucleotídeo de com 39pb, denominado miniéxon ou seqüência líder (SL-RNA) no extremo 5' do RNA processado e uma poliadenilação (adição da calda de Poli-A) no gene precedente do policístron. O SL-RNA por sua vez é processado pela adição do denominado CAP4 (Bangs *et al.*, 1992), que tem uma função estabilizadora do RNA mensageiro. Não existem seqüências que determinem o lugar de adição da Poli-A, e esta posição é definida pelo sítio de adição do miniéxon no gene seguinte do policístron (Benz *et al.*, 2005).

1.2.3 - Regulação da expressão gênica

Os níveis de expressão de proteínas possuem uma fraca correlação com os níveis de transcrição (revisto em Cohen-Freue *et al.*, 2007), o que provavelmente está relacionado a eventos pós-transcripcionais. Mais uma vez contrastando com a maior parte dos eucariotos, pode-se especular que *Leishmania* nunca adquiriu ou

perdeu a capacidade de regular a transcrição de genes individuais (revisto em Requena, 2011).

A ausência de regiões promotoras faz com que a regulação gênica ocorra exclusivamente a nível pós-transcricional. Sendo assim, a regulação da expressão gênica é uma dos aspectos mais intrigantes da biologia molecular de *Leishmania*. De forma geral, são as regiões 3' UTR do RNA mensageiro que controlam a regulação dos diferentes genes. Fundamentalmente, através da estabilização do mensageiro bem como pelo controle do início da tradução. Dentre exemplos deste tipo de regulação, temos alguns associados à expressão dependente da fase do ciclo de vida, como os genes codificantes para amastina ou glicoproteína de superfície majoritária GP63. Em ambos os casos, sequências presentes nas regiões UTR foram implicadas como responsáveis pelo controle da expressão gênica (Brittingham *et al.*, 2001).(Yao, Donelson e Wilson, 2003).

Os transcritos de *Leishmania* possuem regiões não traduzidas maiores que a maioria dos outros eucariotos, o que é ainda mais evidente para as regiões 3' UTR (Silva, da *et al.*, 2002). Essa característica está relacionada com o fato da regulação da expressão gênica somente ocorrer em nível pós-transcricional, pois a degradação ou estabilização do mRNA é dependente de fatores protéicos que reconhecem a sequência ou a estrutura secundária formada nas regiões 3' UTR (revisto em Requena, 2011).

Existem evidências de que a regulação específica da tradução e da taxa de degradação de RNA mensageiros em cada fase do ciclo de vida são essenciais para o controle da expressão gênica em *Leishmania*. Tais controles pós-transcricionais são mediados por proteínas que se ligam de forma específica nos elementos regulatórios localizados na sequência das regiões 3' UTR do RNA mensageiro. Entretanto, os mecanismos que promovem ou inibem a tradução ou degradação do RNAm ainda não estão bem estabelecidos (revisto em Requena 2011).

1.2.4 - Expressão diferencial de genes ao longo do ciclo de vida

O estudo da expressão diferencial de genes ao longo das fases do ciclo de vida de *Leishmania* já foi alvo de alguns trabalhos. Aqui destacamos uma seleção de dados sobre a regulação de expressão de tubulinas, amastinas, e outros genes relevantes no desenvolvimento deste projeto.

Tubulinas são proteínas encontradas em todos os eucariotos e foram identificadas a mais de 30 anos como principais componentes dos micro-túbulos celulares e citoesqueleto (revisto em Gull, (2001)). As tubulinas são expressas em todas as fases do ciclo de vida em *Leishmania* (Joshi, Dwyer e Nakhasi, 1995) e a utilização de sua região inter-gênica como controle em estudos de expressão gênica foi sugerido por Purdy, Donelson e Wilson (2005).

Quando as formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro, elas são expostas a uma temperatura maior do que a encontrada no inseto (passando de 24-26°C do inseto até os 37°C do hospedeiro mamífero). Adicionalmente, após fagocitadas, *Leishmanias* passam a um ambiente de pH ácido. Sendo assim, foi estudado qual dessas alterações teriam maior impacto na transformação de promastigotas para amastigotas. Foi reportado que o aumento da temperatura prevalece sobre a acidificação, no que se refere à mudança no perfil de expressão de proteínas definidas como amastigota ou promastigota específicas, respectivamente, amastinas e a glicoproteína GP46 (Alcolea *et al.*, 2010).

Amastinas são proteínas de superfície pertencentes a um grupo de mais de 45 proteínas que são expressas exclusivamente na fase amastigota, em *Leishmania* e *Trypanosoma*. Neste sentido, Boucher *et al.*, (2002) demonstraram a existência de um elemento de 450 pb localizado na região 3' UTR responsável por uma diferença de 20 vezes nos níveis de tradução da amastina durante sua fase amastigota, quando comparado a promastigotas. Esta seqüência também foi encontrada no RNA mensageiros de outros genes, com expressão específica a fase amastigota (Rochette *et al.*, 2005). Além do evento do aumento da tradução, foi demonstrado que esta seqüência de RNA está relacionada a um aumento na estabilidade dos transcritos na fase amastigota (McNicoll *et al.*, 2005). As amastinas e as tubulinas possuem repetição em tandem da seqüência codificante no seu genoma (Figura 3).

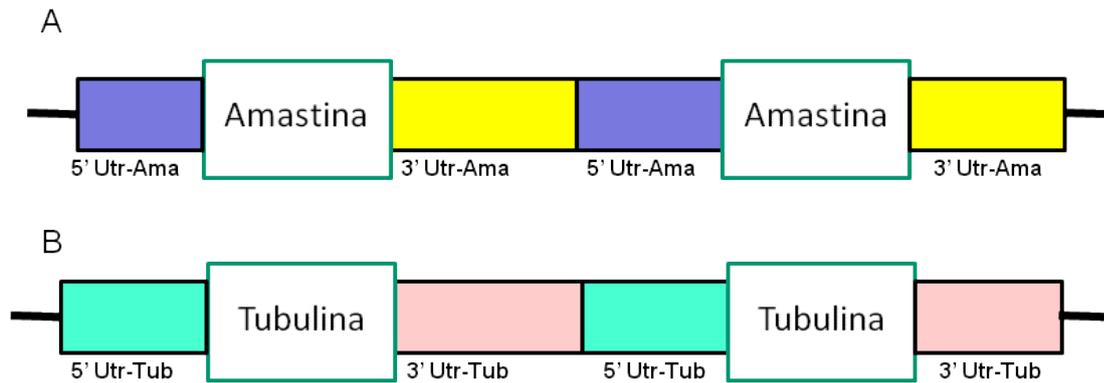


Figura 3 - Representação esquemática de regiões codificantes e inter-gênicas no cromossomo de *L. infantum* A) Detalhe do cromossomo 34, com região codificante de duas amastinas (*LinJ.34.1700* e *LinJ.34.1690*) B) Detalhe do cromossomo 13, com região codificante de duas tubulinas (*LinJ13_V3.1450* e *LinJ13_V3.1460*).

Por sua vez, Rosenzweig *et al.*, (2008) descreveram um aumento na presença de duas diferentes proteínas amastinas 15 horas após início da transformação de promastigotas para amastigotas. Em outro trabalho, Nasereddin *et al.*, (2010) confirmaram a elevada expressão de amastinas pelas formas amastigotas quando comparado a promastigotas e propuseram que este gene pode ser utilizado como marcador para culturas amastigotas axênicas.

Em análise das diferenças no perfil proteômico de *L. major* durante a metaciclogênese, Mojtahedi, Clos e Kamali-Sarvestani, (2008) mostraram que a expressão de proteínas do flagelo está aumentada no processo de transformação da fase promastigota procíclica para metacíclica.

1.3 – Genes repórteres e proteínas fluorescentes

Em alguns celenterados, como águas-vivas, a bioluminescência ocorre quando o cálcio se liga à proteína denominada aequorin gerando luz azul. Esta luz azul, por sua vez, é o substrato necessário para a excitação da proteína verde fluorescente (GFP), que como produto da reação, emite luz verde. Chalfie *et al.*, (1994) foram os primeiros a descrever o uso da GFP como marcador de expressão gênica *in vivo* em células procariotas e eucariotas, o que rendeu aos autores o prêmio Nobel. Com a indução de mutações aleatórias na seqüência codificante para proteína GFP,

Cormack, Valdivia e Falkow (1996) obtiveram variantes cuja fluorescência estava aumentada em mais de 100 vezes quando comparada à proteína selvagem.

A partir de uma GFP estável com vida média superior a 24 horas, Qazi *et al.*, (2001) produziram variedades instáveis e com vida média curta, úteis como repórteres para certos estudos de expressão gênica. Jung e Zumbusch (2006) estudaram oito formas mutantes da proteína GFP e observaram que a forma eGFP (GFP mais intensa, do inglês *enhanced*) é a melhor variante para utilização em modelos biológicos devido sua estabilidade e intensa fluorescência.

Apesar das proteínas fluorescentes selvagens serem estáveis, o comprimento de onda que as excita está muito próximo do ultravioleta. Esta foi uma importante questão para sua utilização, devido à possibilidade de geração de dano celular durante a observação. Para sobrepor esta limitação, foram produzidas formas mutantes de proteínas fluorescentes com diferentes espectros de emissão, portanto, com comprimento de onda maior que o necessário para visualização da proteína GFP selvagem. Como exemplo, pode-se citar a eGFP, a proteína fluorescente amarela (YFP), a proteína fluorescente ciano (CFP) e a proteína vermelha mCherry (revisto em Dube, Gupta e Singh, (2009).

Diversos estudos utilizaram proteínas florescentes e genes repórteres em tripanossomatídeos e, particularmente, em *Leishmania*. Ha *et al.*, (1996) foram os primeiros a produzir uma leishmania transgênica que expressa a proteína GFP, utilizando um plasmídeo episomal. DaRocha *et al.*, (2004) desenvolveram vetores para expressão de genes repórter, como GFP, luciferase e proteína vermelha fluorescente (RFP) para *Trypanosoma cruzi*. Em outro estudo, Singh e Dube, (2004) relataram que o uso de *L. donovani*-GFP facilitou a avaliação de resistência do parasito a diferentes drogas, quando associada à análise de integridade celular por citometria de fluxo. Em outro trabalho, Ashutosh *et al.*, (2005) produziram uma cepa de *L. donovani* que expressava a luciferase, também com objetivo de facilitar ensaios de resistência a fármacos. Além disso, Balmer e Tostado, (2006) foram capazes de diferenciar sub-espécies de *T. brucei* em camundongos infectados com múltiplas sub-espécies que amplificavam eGFP, RFP e YFP por análise em FACS.

A construção de proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes permite o estudo da localização de proteínas no parasito. Em exemplo deste tipo de estudo, Katta, Sahasrabuddhe e Gupta, (2009) foram capazes de fusionar a sequência codificante de proteínas do flagelo do parasito a GFP revelando detalhadamente a localização destas proteínas no parasito. Singh *et al.*, (2009) integraram a sequencia codificante para GFP na região promotora do ribossomo 18S de *L. donovani*. Não houve perda da fluorescência mesmo após um ano sem a utilização de droga de seleção. Com objetivo de testar uma vacina inovadora, Mizbani *et al.*, (2009) desenvolveram uma cepa de *L. tarentolae*, não infectiva a mamíferos, que expressou GFP associada à proteína A2. Apesar desta proteína ser expressa exclusivamente na fase amastigota de *L. infantum*, a construção gênica foi feita de modo que a proteína A2 fosse expressa de forma constitutiva no parasito transgênica.

Até o momento, não foi descrita a expressão de proteínas em *Leishmania* de forma dependente da fase do ciclo de vida.

II – JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVO

Justificativa

Não estão disponíveis ferramentas para super expressar proteínas em *Leishmania* de forma dependente do estágio do ciclo de vida. Tal ferramenta poderá ser utilizada para diversos ensaios, como localização, diferenciação ou isolamento de parasitos em distintos estágios do ciclo de vida *in vivo*, bem como facilitará a investigação do status funcional, distribuição e expressão de proteínas provida pelo controle de regiões gênicas do parasito *in vivo*. Além disto, o plasmídio poderá ser utilizado para geração de uma vacina viva "suicida". Esta estratégia levaria a geração de uma cepa de *Leishmania* que ao se transformar em amastigota expressaria uma proteína tóxica, levando a morte do parasito. Adicionalmente, a produção de uma *Leishmania* mutante que expresse proteína fusionada a outra proteína fluorescente de forma ciclo de vida dependente poderá servir para estudos de interação do parasito com células hospedeiras.

Hipótese

Considerando os conhecimentos já acumulados em relação à regulação da expressão gênica em *Leishmania* bem como as técnicas e plasmídios disponíveis para a expressão de proteínas recombinantes no parasito, acreditamos ser possível o desenvolvimento de um novo plasmídio para expressão de proteínas de forma dependente da fase do ciclo de vida em *Leishmania*.

Objetivo

Expressar proteínas recombinantes em *Leishmania* de forma dependente da fase do ciclo de vida.

Objetivos específicos

Expressar uma proteína fluorescente em *L. infantum* somente na fase amastigota.

III – MÉTODOS

Parasitos

Promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* (M/CAN/ES/96/BCN150) foram cultivados a 26 °C, em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, U.K.), suplementado com 10% (v/v) Soro Bovino Fetal Inativado (SBFi) (ICN Pharmaceuticals, Basingstoke, Hants, U.K.), penicilina G (100 U/ml) e estreptomicina (0.1 mg/ml). Culturas de parasitos foram iniciadas com 10^6 promastigotas/ml e utilizadas para estudo em fase exponencial do crescimento ($< 10^7$ promastigotas/ml). Culturas foram passadas indefinidamente sem passagem por animal para manutenção da infectividade.

Os pesquisadores possuem registrado termo responsabilidade para projetos envolvendo organismos geneticamente modificados, conforme norma da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio. (Anexos 1 e 2)

Crescimento de parasitos em meio sólido

O crescimento de parasitos em meio sólido foi baseado em protocolo previamente descrito com modificações (Quijada *et al.*, 2003). Para isto, placas foram formuladas com 1,4% Agar, 0,6% NaCl e 6% de sangue de coelho heparinizado e inativado. Adicionalmente, utiliza-se meio volume de RPMI suplementado com 5% de SBFi e drogas de seleção. Promastigotas de leishmania são semeadas em placa em fase exponencial de crescimento, seguido pela vedação da placa com filme de laboratório (parafilm) e incubação da placa invertida a 26°C até o aparecimento de colônias, que possuem forma de gota quase transparente. Esta etapa final do processo ocorre em aproximadamente 10 dias.

Diferenciação em amastigotas

A diferenciação em amastigotas axênicas da *L. infantum* foi feita de acordo com trabalho anterior que utilizou esta mesma cepa (Larreta *et al.*, 2004). Para isto, parasitos em fase logarítmica tardia ($> 10^7$ células/ml) foram centrifugados e ressuspensos em meio RPMI 1640 (Gibco) acidificado até pH 5.5 pela adição de 20 mM de ácido succínico (Sigma). O meio foi suplementado com 25% SBFi, penicilina G (100 U/ml) e estreptomicina (0.1 mg/ml). Finalmente, os parasitos foram

incubados a 37°C (5% CO₂) e coletados para os experimentos durante a diferenciação ao longo dos dias seguintes.

Extração DNA de *Leishmania*

O DNA total de *Leishmania* foi extraído utilizando kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification Promega. para utilização como molde na amplificação por PCR das regiões não traduzidas, 3' UTR.

Sequenciamento de DNA

O sequenciamento do DNA foi feito através do sistema “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Perkin-Elmer, Foster City), e foi realizado pela plataforma tecnológica de serviços de sequenciamento da Fiocruz / Salvador bem como pelo serviço de sequenciamento interdepartamental da Universidade Autônoma de Madrid.

PCR e clonagem

A reação em cadeia da polimerase (PCR) teve volume final de 50µL, com a seguinte concentração de reagentes: 2,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 10 µmols/µl de cada primer, dez unidades de Taq DNA polimerase; 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM Tris – HCl pH8,0 e 50 ng de DNA molde.

Para amplificação, o DNA foi desnaturado a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de uma extensão final de 72°C por 5 min, em um termociclador (MJ Research PCR thermal cycler). Os produtos do PCR foram visualizados, após eletroforese em gel de agarose, e fragmentos do tamanho esperado foram purificados utilizando um kit (QIAquick PCR purification Kit, Qiagen, Germany), digeridos com o respectivo par de enzimas de restrição. Em seguida, o produto da digestão foi ligado ao vetor de clonagem pBluscript SK(-) (Stratagene), previamente digerido com enzimas de restrição coincidentes seguido por defosforilação.

Os sítios de restrição estão indicados no nome do *primer*, bem como sublinhados na sequência do *primer*. Adicionalmente, sítios de restrição utilizados poderão ser observados nas representações esquemáticas dos plasmídios.

pBIs Utr Tub1, pBIs Utr Tub2 e pBIs Utr Tub3

A primeira região clonada para formar o plasmídio pFL foi a região inter-gênica completa entre duas tubulinas. Clonamos a seqüência de 844pb entre os genes *LinJ13_V3.1450* e *LinJ13_V3.1460*. Esta mesma região foi clonada 3 vezes, utilizando três distintos pares de *primers*, para obter a sequencia com os sítios de restrição de interesse (Figura 4).

Direto: UtrTub1XbaI: GCTCTAGATAAGGTACTACTCGTGCCGCG

Reverso: UtrTub1BamHIr CGGGATCCGTTTTGTGTTTCGCCAGGAGG

Direto: UtrTub2EcoRIId: CGGAATTCTAAGGTACTACTCGTGCCGCG

Reverso: UtrTub2EcoRVr CGGATATCGTTTTGTGTTTCGCCAGGAGG

Direto: UtrTub3HindIIIId: CCCAAGCTTTAAGGTACTACTCGTGCCGCG

Reverso: UtrTub3ClaIr: CCATCGATGTTTTGTGTTTCGCCAGGAGG

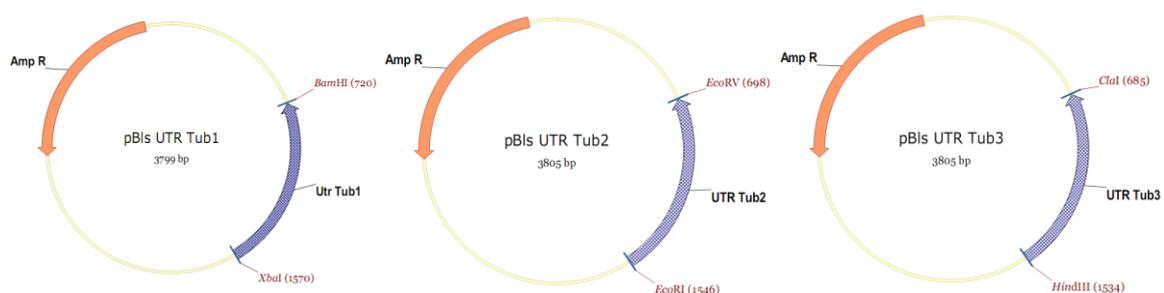


Figura 4 – Representação esquemática de plasmídios portando regiões inter-gênicas da tubulina. A) pBIs Utr Tub1, B) pBIs Utr Tub2. C) pBIs Utr Tub3. Regiões codificantes assim como regiões não traduzidas estão destacadas. Flechas indicam sentido da transcrição e sítios de restrição utilizados para clonagem estão destacados. Fragmento Amp R confere resistência para bactéria portadora desta construção, contra a droga ampicilina.

pBls Puro

A sequência codificante de 600pb para Puromicina-N-acetiltransferase, (Puro), que confere resistência à droga de seleção puromicina, foi amplificada e clonada (Figura 5) utilizando o plasmídio promega pGeneClip™ Puromycin Vector como molde. Para amplificação foram utilizados os seguintes *primers*:

Direto: PuroBamHId: CGGGATCCATGACCGAGTACAAGCCCAC

Reverso: PuroEcoRIr: CGGGAATTCTCAGGCACCGGGCTTGCGG

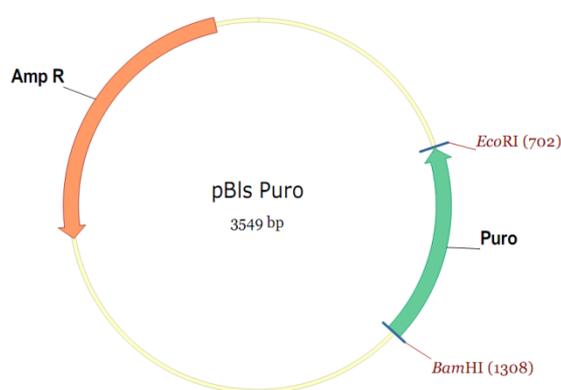


Figura 5 – Plasmídeo portando região codificante para Puromicina-N-acetiltransferase. Regiões codificantes estão destacadas e as flechas indicam o sentido da transcrição. Sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BamHI, utilizados para clonagem, estão destacados.

pBls mCherry

A região codificante da proteína fluorescente mCherry foi amplificada e clonada (Figura 6) utilizando como molde o plasmídeo pmCherry vector (Clontech, Inc., Mountain View, CA). A sequência de interesse possui 711pb e para amplificação foi utilizado o seguinte par de *primers*:

Direto: mCherryEcoRVd: CGGATATCATGGTGAGCAAGGGCGAGG

Reverso: mCherryHindIIIr: CCCAAGCTTTTTACTTGTACAGCTCGTCC

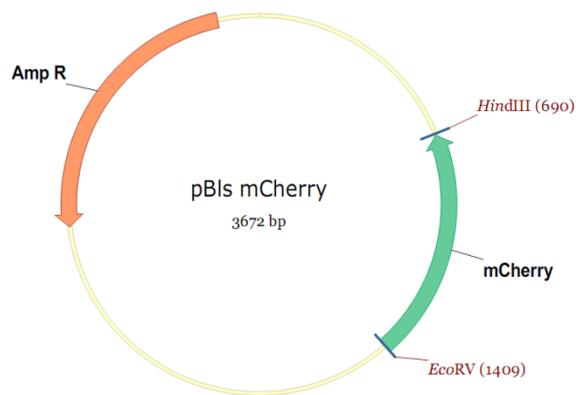


Figura 6 – Plasmídeo portando região codificante para proteína fluorescente mCherry. Regiões codificantes estão destacadas e as flechas indicam o sentido da transcrição. Em detalhe, encontram-se ilustrados os sítios de restrição para as enzimas *HindIII* e *EcoRV* utilizados para clonagem.

pBIs Utr Ama

A sequência escolhida para controlar a expressão gênica na fase amastigota foi a sequência de 2,1Kb localizada entre as regiões codificantes dos genes da amastina, *LinJ.34.1700* e *LinJ.34.1690* (código geneDB). Para amplificar e clonar este fragmento (Figura 7) utilizamos como molde o DNA total de *L. infantum* e os seguintes primers:

Direto: UtrAmaHindIIIid: CCCAAGCTTTAGGATAGAGGTAGGACAGG

Reverso: UtrAmaClaIrr: CCATCGATCATCGTCACAAAAAGGAGCGAC

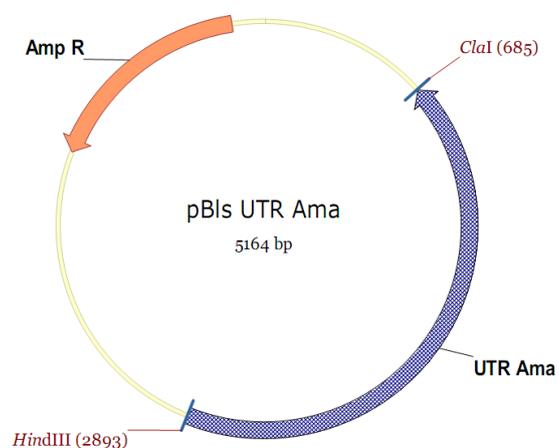


Figura 7 – Representação esquemática do plasmídeo pBIs UTR Ama. Região codificante e região não traduzida da amastina estão destacadas. Flechas indicam sentido da transcrição. Sítios

de restrição para as enzimas *HindIII* e *Clal*, utilizadas para clonagem também estão ilustrados na figura.

Sub-clonagem

Após a confirmação de cada sequência clonada por digestão e sequenciamento, fragmentos foram sub-clonados em um processo com quatro passos:

pBls TubPuro

No primeiro passo, o plasmídio pBls UTR Tub1 foi digerido com *XbaI* e *BamHI*. O fragmento obtido foi introduzido similarmente digerido e defosforilado plasmídio pBls Puro para obter pBls TubPuro (Figura 8).

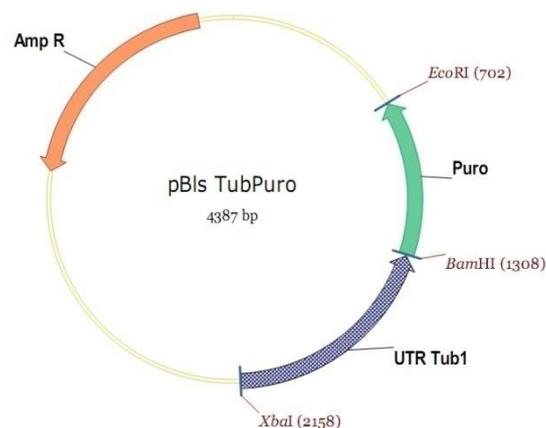


Figura 8 - Representação esquemática do plasmídio pBls TubPuro. Construção contém uma região não traduzida da tubulina e a região codificante Puro que estão destacadas. Flechas indicam sentido da transcrição. Sítios de restrição do plasmídio também estão ilustrados.

pBls TubPuroTub

Em um segundo passo, o plasmídio pBls TubPuro foi digerido com *XbaI* e *EcoRI* e o fragmento obtido foi introduzido pBls UTR Tub2, que havia sido anteriormente digerido e defosforilado, para obter pBls TubPuroTub (Figura 9).

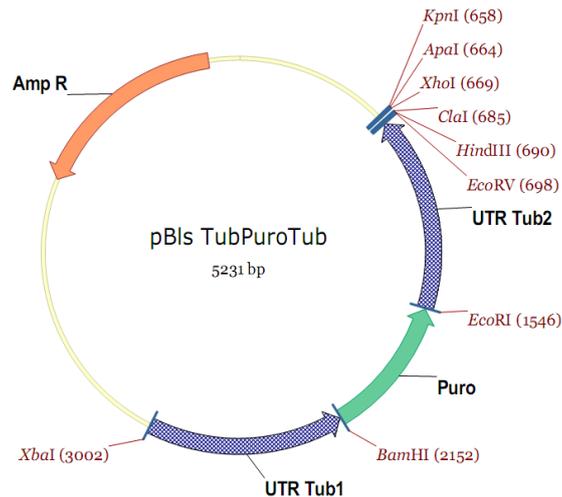


Figura 9 - Representação esquemática do plasmídio pBIs TubPuroTub. Construção contém duas regiões não traduzidas da tubulina e a região codificante Puro que estão destacadas. Flechas indicam sentido da transcrição. Sítios de clonagem, com as respectivas enzimas de restrição, assim como o *polilinker* disponível no plasmídio encontram-se ilustrados.

pBIs TubPuroTubCherry

No terceiro passo, o plasmídio pBIs mCherry foi digerido com *EcoRV* e *HindIII* e o fragmento obtido foi introduzido no plasmídio pBIs TubPuroTub, que havia sido anteriormente digerido com as mesmas enzimas e defosforilado, gerando o plasmídeo pBIs TubPuroTubCherry (Figura 10).

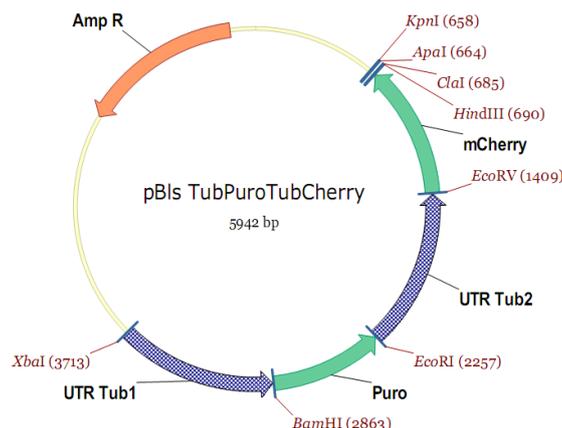


Figura 10 - Representação esquemática do plasmídio pBIs TubPuroTubCherry. Construções contém duas regiões não traduzidas da tubulina e as regiões codificantes Puro e mCherry. Regiões codificantes assim como regiões não traduzidas estão destacadas. Flechas indicam sentido da transcrição. Sítios de clonagem, com as respectivas enzimas de restrição, assim como o *polilinker* disponível no plasmídio encontram-se ilustrados.

pFL Tub e pFL Ama

No último passo da construção, os plasmídios pBIs UTR Ama ou pBIs UTR Tub3 foram digeridos com *Hind*III e *Cla*I e os fragmentos obtidos foram introduzidos no plasmídio pBIs TubPuroTubCherry, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição e defosforilado, para obter as duas construções finais: pFL Ama (pBIs TubPuroTubCherryAma) e pFL Tub (pBIs TubPuroTubCherryTub) (Figura 11).

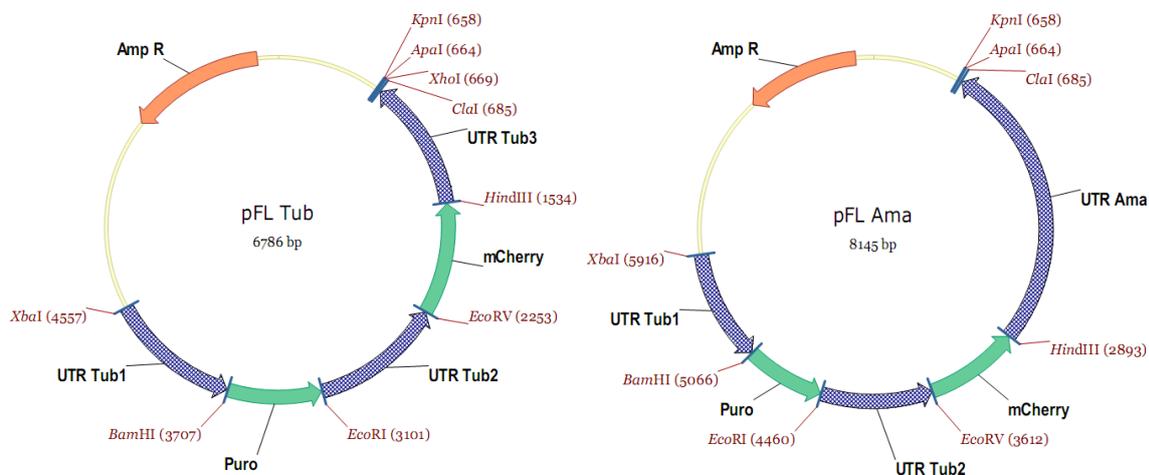


Figura 11 - Plasmídios pFL de expressão de fluorescência em *Leishmania*.

A) Representação esquemática do plasmídio pFL Tub, que provê uma expressão de fluorescência constitutiva. B) pFL Ama cuja expressão de fluorescência é exclusiva a fase amastigota. Regiões codificantes assim como regiões não traduzidas estão destacadas. Flechas indicam sentido de transcrição. Sítios de clonagem com as respectivas enzimas, assim como o *poli*linker disponível no plasmídio também são mostrados.

Transfecção de promastigotas

O DNA plasmidial utilizado para transfecção foi obtido pelo uso do Kit Qiagen Maxiprep (Qiagen Inc., Valencia, CA). Para transfecções, utilizamos o método de alta voltagem previamente descrito (Robinson and Beverley, 2003), como segue: Parasitos em fase exponencial do crescimento são coletados por centrifugação e ressuspensos a uma densidade de 10^8 parasitos/ml em tampão citomix gelado (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl_2 , 10 mM K_2HPO_4 , 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2). Em seguida, 0,5 ml da suspensão de células foram transferidos para uma cubeta de eletroporação com vão de 0,4 cm, e deixadas em gelo por 10 min. Dez

microgramas do DNA plasmidial foram adicionados a suspensão de células que foram pulsadas duas vezes (25 μF , 3.75 kV cm^{-1} , $\Omega = \text{infinito}$) utilizando um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser. Amostras foram transferidas para 10 ml de meio RPMI suplementado com 20% SBFi e incubado a 26°C por 24 h. Após incubação em meio sem antibiótico, as células foram expostas a uma seleção dos clones efetivamente transfectados com 50 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina (Sigma). Culturas transgênicas são obtidas entre 10 a 15 dias após incubação a 26°C.

Análise microscópica

Culturas de promastigotas ou sob processo de diferenciação em amastigotas foram analisadas quanto à fluorescência produzida. Para isto, culturas foram visualizadas utilizando um microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop (Thornwood, NY), com aumento de 40X. Para isto, 30 μl da cultura foram diluídos em PBS 1X e homogeneizados com pipeta. Os comprimentos de onda utilizados para excitar ou adquirir as diferentes cores de fluorescências no microscópio seguem abaixo:

DAPI: Excitação: 405nm / Aquisição 460 nm

GFP: Excitação 488nm / Aquisição: 540nm

mCherry: Excitação: 530nm / Aquisição 590nm

Citometria de fluxo

A fluorescência foi determinada pela excitação da amostra com laser seguida pela detecção da emissão em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.). O citômetro foi calibrado utilizando um controle positivo (linhagem de leishmania transfectada com mCherry) e um controle negativo (linhagem wild type de leishmania). Foram adquiridos 10^5 eventos para cada amostra analisada.

IV – RESULTADOS

Como etapa preliminar deste projeto, nos certificamos da viabilidade da proposta através da padronização dos protocolos, bem como dos ensaios baseados na expressão da proteína verde fluorescente (GFP) em *L. infantum*. Os resultados desta seção estão apresentados dentro de cada tópico.

Premissa A – Transfecção

Para padronizar a transfecção utilizamos o plasmídeo pX63NeoGFP (Figura 12), gentilmente cedido pela Prof^a Dra. Lucile Maria Floeter-Winter (USP), construído a partir do plasmídeo pX63Neo (Cruz, Coburn e Beverley, 1991). A linhagem transgênica obtida foi utilizada nos estudos preliminares de viabilidade do projeto.

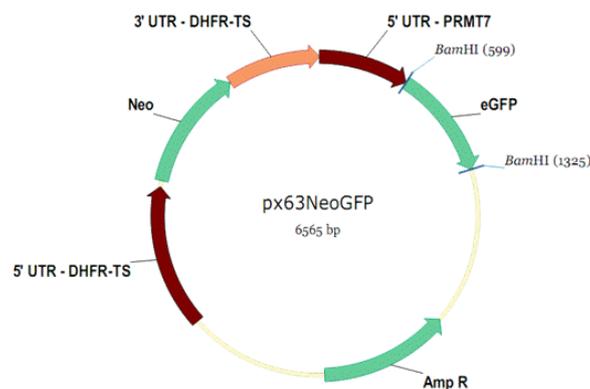


Figura 12 – Representação esquemática do plasmídeo pX63NeoGFP.

Na padronização da transfecção, foram testados diversos protocolos com repetições em distintos momentos, entretanto a taxa de sucesso se mantinha baixíssima. Em 71 tentativas de transfecção somente duas foram frutíferas, produzindo parasitos fluorescentes (Figura 13). Entre os problemas encontrados durante a transfecção listamos a precipitação de sais dentro do tampão de eletroporação, a utilização de uma resistência inadequada no eletroporador e o tamanho da cuba de eletroporação utilizada. A transfecção é um processo que demanda duas semanas para obtenção de resultado. A quantidade de material utilizado como meio de cultura, garrafas plásticas e espaço físico na estufa são limitantes para a repetição indefinida do experimento. A transfecção foi finalmente padronizada no período do doutorado sanduíche no CBM – Espanha, com alta

eficiência e reprodutibilidade.

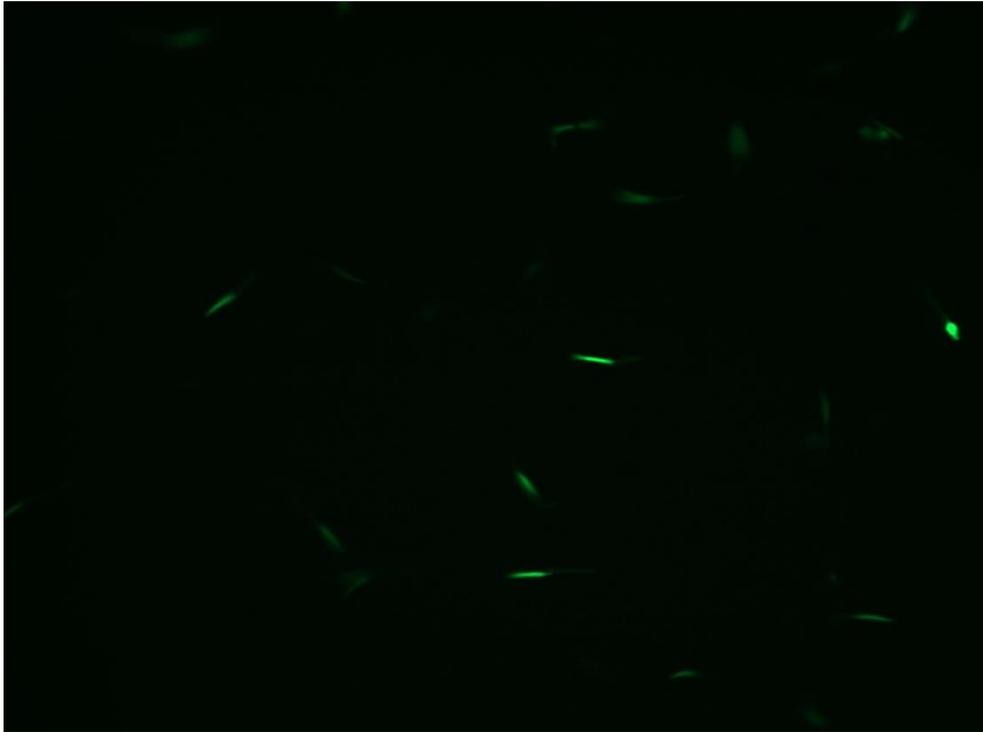


Figura 13 – Microscopia de fluorescência de *L. infantum* expressando o plasmídio pX63NeoGFP. Imagem adquirida excitando a amostra com laser de 540 nm

Premissa B – Seleção de clones

A seleção clonal de parasitos transgênicos visa à obtenção de uma linhagem cuja expressão gênica provida pelo plasmídio seja homogênea. Para realizar a seleção clonal, parasitos transgênicos foram semeados em meio seletivo sólido ágar schneider sangue (Figura 14). Seis dos clones obtidos foram amplificados em meio líquido para sua posterior caracterização.



Figura 14 – Placa de meio sólido com clones de *L. infantum*. 10^4 parasitos transfectados com o plasmídeo pX63NeoGFP foram plaqueadas em médio sólido ágar-sangue contendo $50\mu\text{g/ml}$ de geneticina. Após crescimento na placa, parasitos formam colônias em forma de gota.

Premissa C – Análise da fluorescência de cada clone

Culturas de cada clone selecionado a partir da placa de meio sólido tiveram sua intensidade de fluorescência (IF) analisada por citômetro de fluxo (Figura 15), onde o clone de *L. infantum* pX63NeoGFP número 3 foi o que apresentou maior valor de IF, ao passo que o clone número 6 apresentou a menor. A cultura original, a que foi utilizada para o plaqueamento no meio sólido apresentou uma IF intermediária quando comparada aos clones 3 e 6. Tal fato provavelmente se deve ao número de cópias do plasmídeo no interior do parasito.

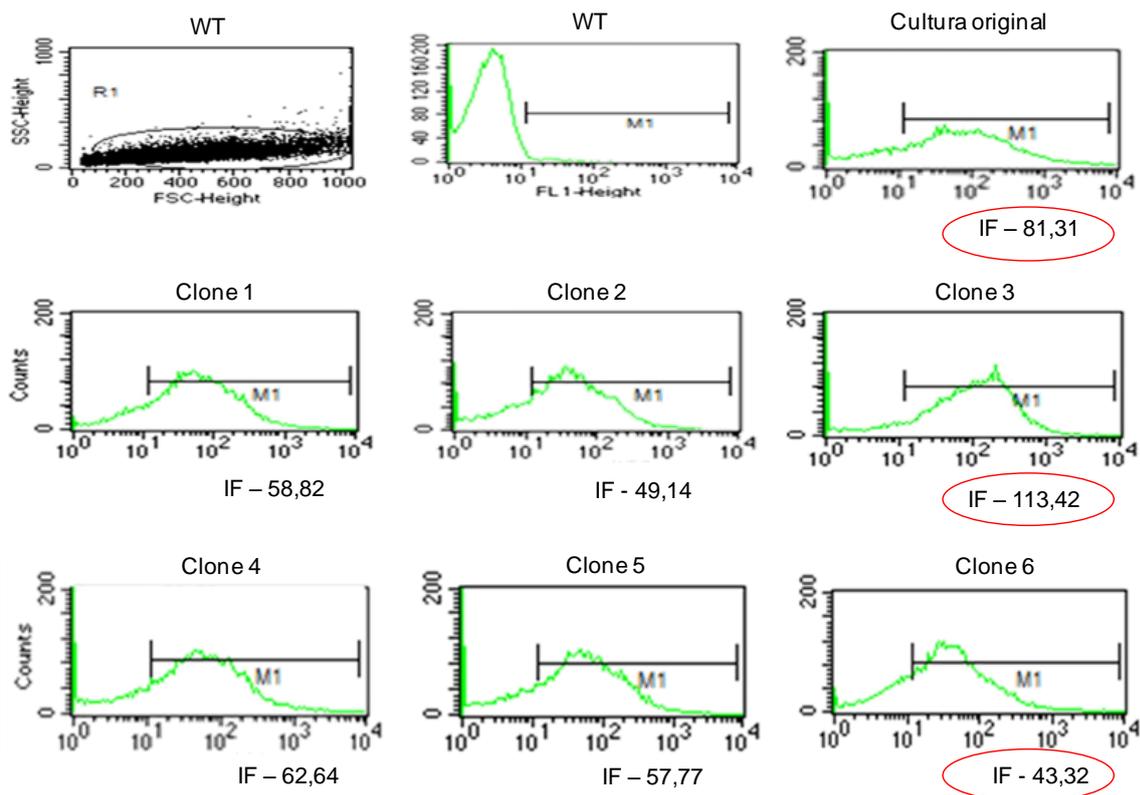


Figura 15 – Análise da intensidade de fluorescência em diferentes clones. Aquisição por citômetro de fluxo de 10^5 eventos da cultura selvagem (WT), da cultura inicialmente transfectada com o plasmídio pX63NeoGFP (Cultura original) e de seis clones selecionados em placa de meio sólido. Pode-se observar que a heterogeneidade da intensidade de fluorescência da cultura original foi reduzida após seleção clonal. Intensidade de fluorescência dos clones com maior e menor fluorescência estão destacados.

Premissa D - Teste de estabilidade do plasmídio

A estabilidade de plasmídio epissômico em *L. infantum* era premissa essencial para o desenvolvimento da nova construção proposta. Sendo assim, para os clones 3 e 6, que tinham as respectivas maior e menor IF, analisamos a estabilidade do plasmídio de diferentes formas, como segue:

Retirada de droga de seleção

Retiramos a droga de seleção da cultura de promastigotas e a cada passagem foi analisada a intensidade de fluorescência por citometria de fluxo (Figura 16) onde foi observado um decréscimo na intensidade de fluorescência com o passar das passagens.

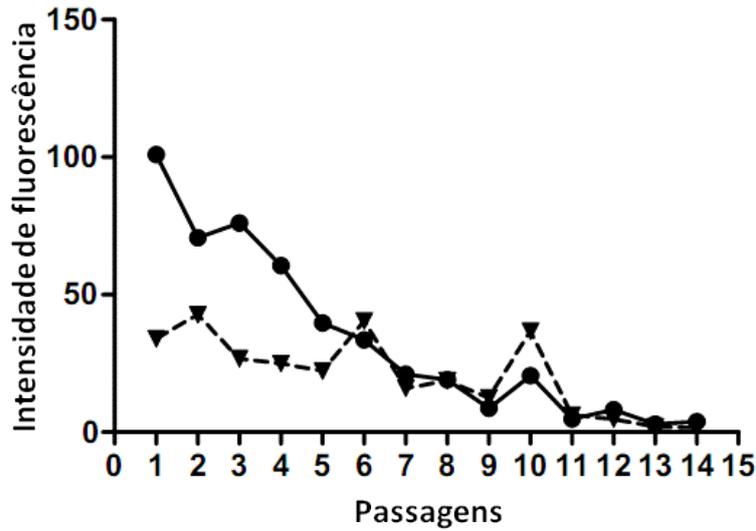


Figura 16 – Análise da estabilidade do plasmídeo sem droga de seleção. A intensidade de fluorescência adquirida por citômetro de fluxo ao longo de 14 passagens sem droga de seleção foi analisada nos parasitos com maior (clone 3) ou menor (clone 6) intensidade de fluorescência inicial e estão respectivamente representados por círculos ou triângulos no gráfico. Dados obtidos demonstram um decréscimo na intensidade de fluorescência na ausência de droga de seleção.

Manutenção da droga de seleção

Mantivemos a concentração de droga de seleção constante em 30µg/ml e a cada passagem foi analisada a intensidade de fluorescência por citometria de fluxo na cultura de promastigotas (Figura 17) e foi observado uma manutenção da intensidade de fluorescência ao longo das passagens.

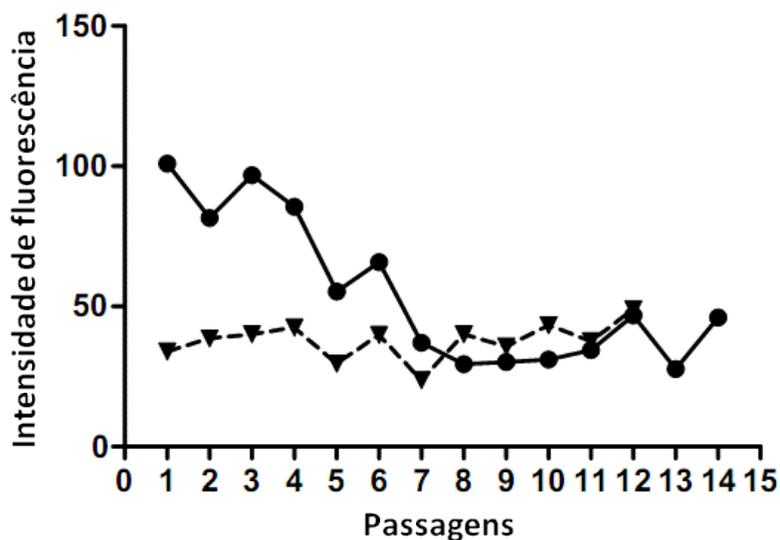


Figura 17 – Análise da estabilidade do plasmídio com manutenção da droga de seleção. A intensidade de fluorescência adquirida por citômetro de fluxo ao longo de 14 passagens mantendo 30µg/ml de droga de seleção para os clones com maior (clone 6) ou menor (clone 3) intensidade de fluorescência inicial e estão respectivamente representados por círculos ou triângulos no gráfico. Dados obtidos demonstram uma manutenção na intensidade de fluorescência ao longo das passagens na presença de droga de seleção.

Incremento de droga de seleção

Após cada passagem, a quantidade da droga de seleção foi incrementada gradualmente. Os ensaios realizados utilizaram crescentes concentrações de droga (30, 60, 90, 120, 250, 500 e 750 µg/ml), seguida pela retirada total da droga após alcançar a maior concentração. Adicionalmente, após alcançar cada concentração citada também mantivemos a nova concentração da droga ao longo das passagens. A intensidade de fluorescência foi adquirida por citômetro de fluxo em cada ponto (Figura 18) e os resultados demonstraram que há um aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da exposição de droga de seleção, ao longo do tempo.

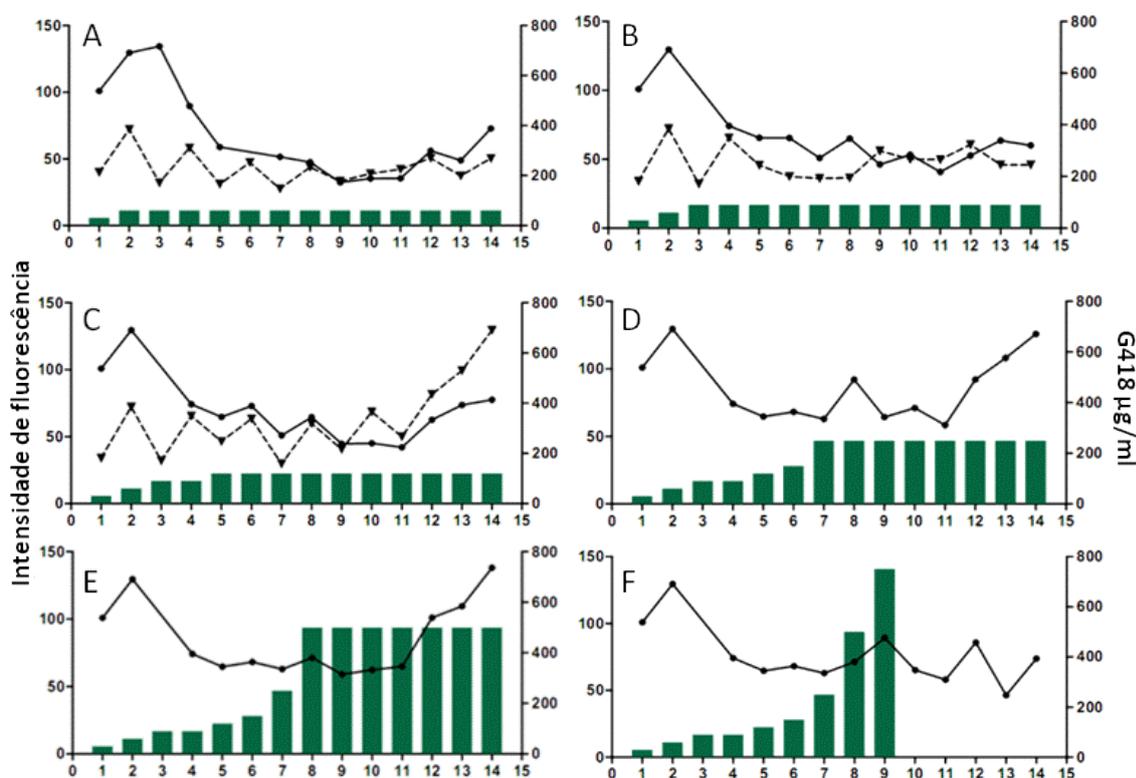


Figura 18 – Análise da intensidade de fluorescência com diferentes condições de pressão de

droga de seleção. Aquisição feita por citômetro de fluxo ao longo de 14 passagens. A) Incremento da droga até 60 µg/ml e estabilização B) Incremento gradual da droga até 90µg/ml e estabilização C) Incremento gradual da droga até 120 µg/ml e estabilização D) Incremento da droga de seleção até 250 µg/ml e estabilização E) Incremento da droga de seleção até 500 µg/ml e estabilização F) Incremento da droga de seleção até 750 µg/ml seguido por sua retirada total. Parasitos com maior ou menor intensidade de fluorescência inicial estão respectivamente representados por círculos ou triângulos no gráfico. Barras representam concentração da droga.

Alternativamente, valores absolutos com resultados para cada ponto analisado também estão disponíveis (Tabela 1).

Passagem	Clone 3 - [] G418 em µg/ml									
	0	30	60	90	120	150	250	500	750	750 - 0
1	-	100,9	-	-	-	-	-	-	-	-
2	70,7	81,6	129,5	-	-	-	-	-	-	-
3	76,0	96,8	134,4	-	-	-	-	-	-	-
4	60,6	85,6	89,7	74,2	-	-	-	-	-	-
5	39,7	55,3	58,9	65,6	64,7	-	-	-	-	-
6	33,6	65,8	nd	65,4	72,9	68,2	-	-	-	-
7	21,0	37,0	51,6	50,9	50,9	55,2	62,9	-	-	-
8	19,1	29,4	47,5	65,1	64,6	68,4	92,0	71,3	-	-
9	8,7	30,2	32,4	46,2	44,7	55,4	64,3	59,0	89,3	-
10	20,5	31,1	35,3	53,3	45,1	68,9	71,0	62,3	-	65,2
11	4,8	34,4	35,4	40,8	42,1	52,3	58,4	64,9	-	58,1
12	8,2	46,8	56,0	52,7	62,5	74,1	92,0	101,1	-	85,8
13	2,9	27,7	48,9	63,5	73,7	103,3	108,0	109,5	-	46,4
14	3,8	46,1	72,8	60,0	77,5	91,7	125,8	138,1	-	73,8

Tabela 1 – Intensidade de fluorescência em diferentes condições de pressão de droga de seleção. Aquisição de fluorescência em citômetro de fluxo de cultura de *L. infantum* transfectada com o plasmídeo pX63NeoGFP, sendo este o clone o de maior fluorescência inicial, em cada passagem e com cada concentração da droga de seleção. Traços e espaços em branco indicam ausência de experimento para esta condição.

Passagem da cepa por hamster

Para passagem das cepas por animal, inoculamos 10^6 promastigotas de leishmania transfectadas com o plasmídeo pX63NeoGFP em hamster siberiano. Para isto, utilizamos o clone 3, o de maior intensidade de fluorescência inicial, quando este apresentava 134 unidades de fluorescência ou cepa selvagem (WT) como controle. No plano inicial deveríamos aguardar 75 dias para eutanasiar os animais, entretanto após 54 dias os animais estavam muito doentes e a eutanásia foi antecipada. Cultivamos 1mg do baço de cada animal em meio líquido com

30µg/ml de droga de seleção ou sem esta. Após crescimento, formas promastigotas tiveram sua intensidade de fluorescência adquirida por citômetro de fluxo. A cultura que foi passada com a droga apresentou 27% da fluorescência do momento da inoculação ao passo que a cultura passada sem pressão de droga possuía 4% da intensidade de fluorescência original.

Premissa E - Teste da expressão de fluorescência em amastigotas

As diferenças de pH entre o meio de cultura para promastigotas ou amastigotas, ou o pH ácido do interior do fagolisossomo do macrófago, poderiam inibir a expressão da proteína fluorescente na fase amastigota. Sendo assim, parasitos transfectados com o plasmídeo pX63NeoGFP foram cultivados com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com a respectiva razão de 10:1. Após 72 horas de infecção, a viabilidade da expressão de fluorescência foi analisada mediante microscopia de fluorescência. A proteína verde fluorescente foi expressa também na fase amastigota, conforme mostrado em imagem de fluorescência composta (Figura 19).

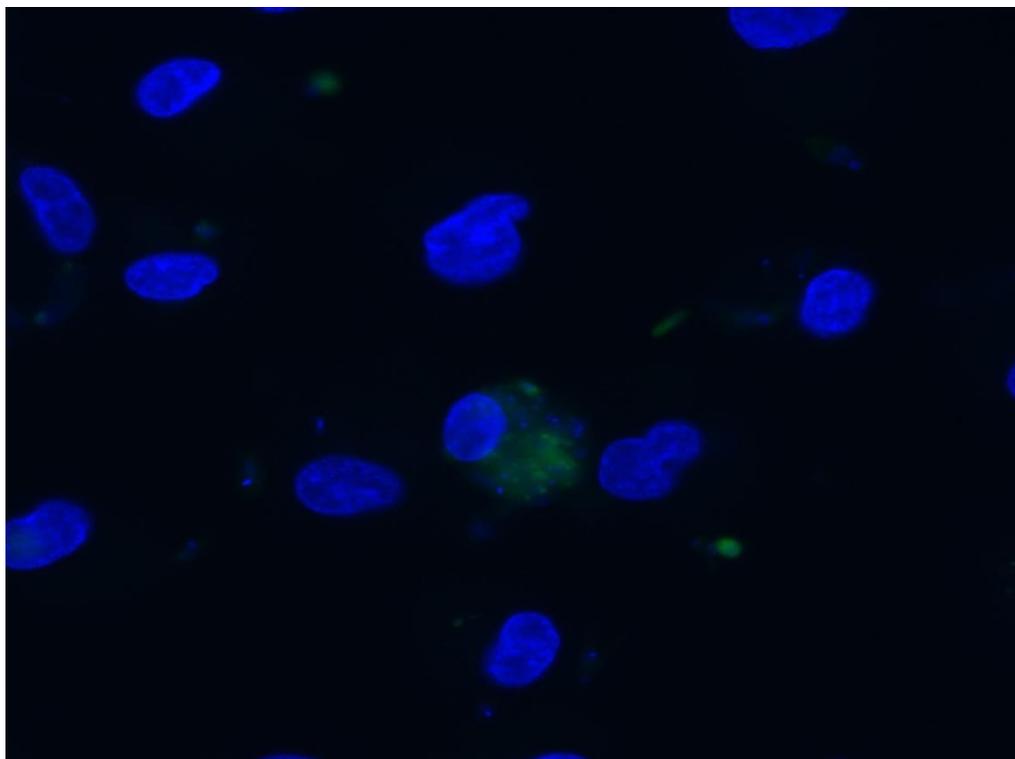


Figura 19 - Imagem composta de macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c infectados por *L. infantum*. Cepa portando o plasmídio pX63NeoGFP em verde. Material nuclear corado por DAPI em azul. Imagem capturada 72 horas após infecção.

Considerando os achados descritos até aqui, vimos ser possível expressar proteínas em *L. infantum* utilizando plasmídios epissômicos, desde que não se estenda por muitas passagens o tempo do cultivo sem o uso da droga de seleção. Estes dados não estavam disponíveis para *L. infantum*.

Geração de *L. infantum* transgênica plasmídios pFL Ama e pFL Tub

Culturas estáveis foram geradas introduzindo as construções pFL Ama ou pFL Tub em *L. infantum* por eletroporação. Os dois plasmídios testados neste estudo foram transfectados com sucesso em três de quatro tentativas, muitas vezes produzindo diversos clones na placa de seleção, fato que indica boa eficiência da eletroporação. Os plasmídios pFL possuem construção baseada no plasmídio bacteriano pBluescript e podem ser usados rotineiramente na transfecção de *Leishmanias*.

Observação de *L. infantum* transgênica por microscopia de fluorescência

Parasitas que foram transfectados com o plasmídio pFL Tub obtiveram notável intensidade de fluorescência no estágio promastigota, assim como durante a diferenciação em amastigotas. A expressão de pFL Tub foi confirmada pela visualização de promastigotas fluorescentes (Figura 20).

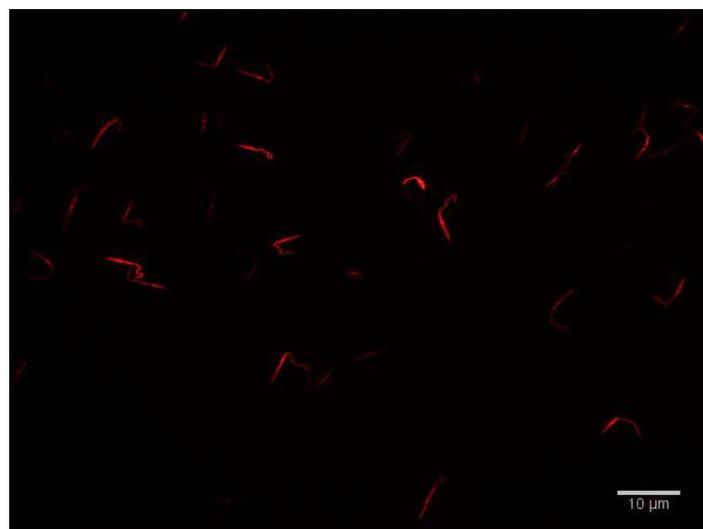


Figura 20 – Imagem de fluorescência de promastigotas de *L. infantum*, com o plasmídio pFL Tub. Imagem adquirida por microscopia de fluorescência excitando a amostra com laser de 530nm.

A presença do plasmídio pFL Ama foi confirmada pela amplificação dos fragmentos Puro e mCherry por PCR, e posterior visualização de parasitos fluorescentes durante a diferenciação em amastigotas (Figura 21).

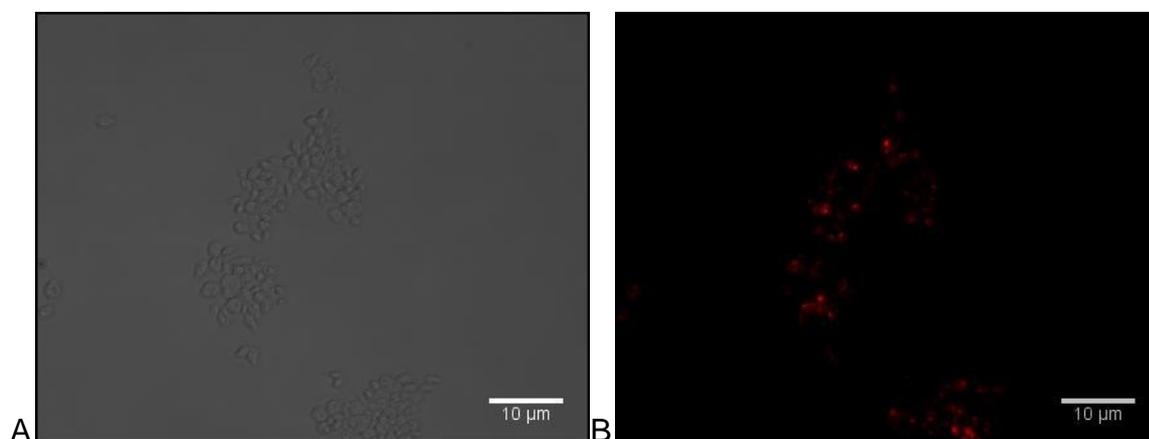


Figura 21 – Imagens de *L. infantum* portando plasmídio pFL Ama após 48 horas do início da diferenciação em amastigotas. A) Campo claro B) Imagem adquirida por microscopia de fluorescência excitando a amostra com laser de 530nm.

As mudanças morfológicas que ocorrem durante a diferenciação de promastigotas para amastigotas em condições axênicas, com diminuição do tamanho e arredondamento da célula, foram as mesmas observadas por Larreta *et al.*, (2004), que utilizaram a mesma cepa e o mesmo método para diferenciar os parasitos em amastigotas axênicas.

Análise de fluorescência em promastigotas e durante diferenciação

Resultados obtidos pelo FACS corroboram as observações feitas por microscopia de fluorescência, onde *L. infantum* transgênica, portando o plasmídio pFL Tub expressa fluorescência no estágio de promastigota e também durante a diferenciação em amastigota.

Durante a fase promastigota, a cepa que recebeu o plasmídio pFL Ama não apresentou fluorescência (fundo equivalente ao adquirido pela cepa WT). Após o segundo dia de diferenciação em amastigotas, formou-se uma população mista de células fluorescentes e não fluorescentes. Este fato é observado ao analisar o deslocamento da população de células com fluorescência negativa para positiva, pela análise por FACS. No quarto dia de diferenciação para amastigotas, o plasmídio pFL Ama proveu uma expressão

da proteína fluorescente ainda mais intensa do que a obtida pelo plasmídio pFL Tub. (Figura 22).

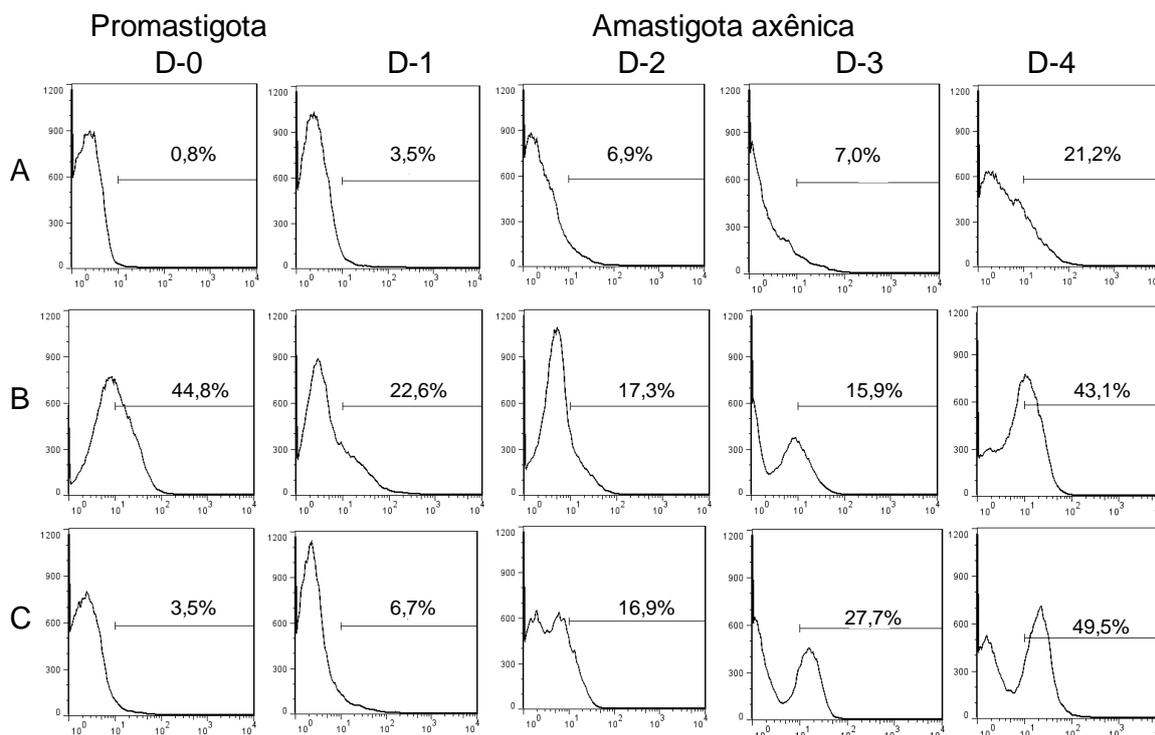


Figura 22 – Análise de fluorescência de parasitos durante diferenciação em amastigotas.

A) *L. infantum* WT, B) *L. infantum* transfectedada com o plasmídio pFL Tub, C) *L. infantum* transfectedada com o plasmídio pFL Ama. D-0 corresponde a forma promastigota. D-1 a D-4 correspondem ao número de dias após o início da diferenciação.

Também é notável, que a expressão de fluorescência produzida pelo plasmídio pFL Tub durante os três primeiros dias de diferenciação está reduzida, quando comparada as formas promastigotas ou no quarto dia da análise. Especulo que tal fato se deva a região inter gênica Tub escolhida. Apesar de existirem múltiplas regiões codificantes para tubulinas no genoma de *leishmania*, as regiões inter gênicas responsáveis pelo controle da expressão de tubulinas é distinta para cada região codificante (comunicação durante defesa por Lucile). Sendo assim, a região Tub escolhida para uso neste plasmídio poderia produzir grandes quantidades de transcritos nas fases promastigota e amastigota, entretanto durante a diferenciação, a manutenção de altos índices de transcritos para tubulinas poderia advir do controle gerado por outras regiões inter gênicas Tub, não utilizadas neste plasmídio.

Expressão dos plasmídios pFL e pX63 simultaneamente

Adicionalmente, verificamos a possibilidade da *L. infantum* conter e expressar dois plasmídios epissômicos simultaneamente. Cepas previamente transfectadas com os plasmídios pFL Ama ou pFL Tub foram re-transfectadas com o plasmídio pX63NeoGFP, e expressaram duas cores de fluorescência simultaneamente, como observado em microscopia de fluorescência bem como citometria de fluxo (Figura 23).

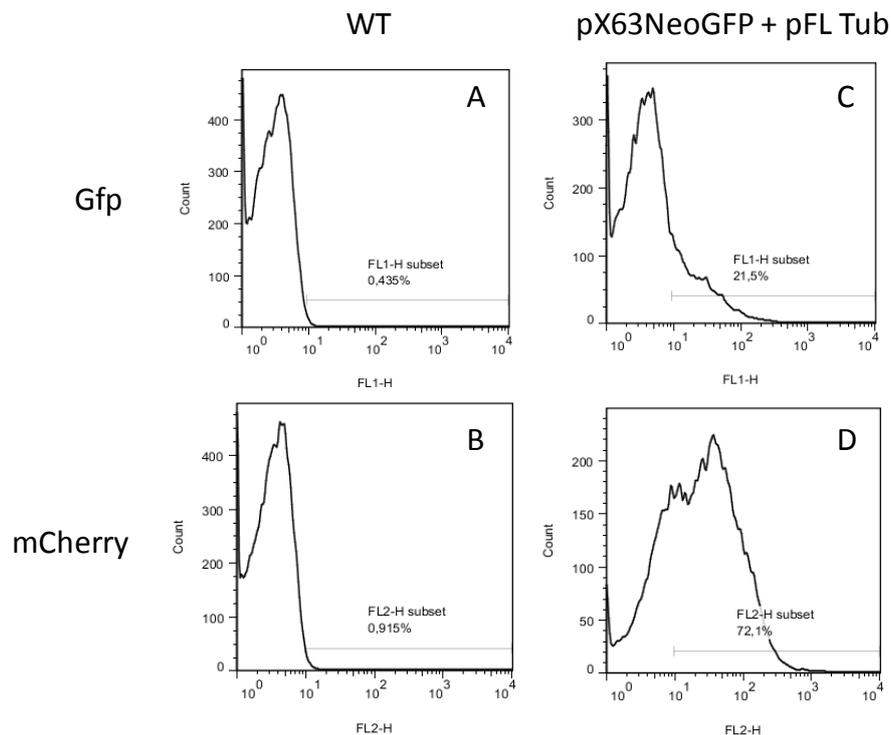


Figura 23 – Análise de fluorescência em promastigotas de *L. infantum* portando dois plasmídios simultaneamente. A) Aquisição de fluorescência em FL1 de cepa WT B) Aquisição em FL2 de cepa WT C) Aquisição em FL1 de cepa portadora dos plasmídios pFL Tub e pX63NeoGFP concomitantemente. D) Aquisição em FL2 de cepa portadora dos plasmídios pFL Tub e pX63NeoGFP concomitantemente.

Construções gênicas em diferentes espécies de *Leishmania*

Além dos parasitos transgênicos que geramos com este projeto, testamos a viabilidade dos procedimentos de transfecção em outras espécies de *Leishmania*, as quais foram crio-preservadas. Sendo assim, a Tabela 2 mostra inventário de parasitos transgênicos relevantes bem como plasmídios utilizados na transfecção.

	<i>L. infantum</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. tarentolae</i>
pX63NeoGfp				
pX63NeoCherry				N.t.
pFL Ama		N.t.	N.t.	N.t.
pFL Tub		N.t.	N.t.	N.t.
pFL Ama + pX63NeoGfp		N.t.	N.t.	N.t.
pFL Tub + pX63NeoGfp		N.t.	N.t.	N.t.

Tabela 2 – Parasitos transgênicos obtidos e seus respectivos plasmídios episômicos. Aqui diferenciamos *L. infantum* de *L. chagasi* por questões didáticas e de origem da cepa: *L. chagasi* foi isolada de paciente no Brasil ao passo que *L. infantum* foi isolada na Espanha. N.t. cepa não transfectada

V – DISCUSSÃO

O plasmídio pFL

Produzimos uma nova construção molecular que chamamos pFL a partir de um vetor comercial, pBluescript SK(-), um plasmídio bacteriano de uso frequente em biologia molecular, que permitiu expressar uma proteína fluorescente em *L. infantum* exclusivamente no estágio amastigota (pFL Ama) ou constitutivamente (pFL Tub). Para isto, utilizamos regiões não traduzidas para regular a expressão gênica nos plasmídios propostos.

Na construção do plasmídio pFL foi utilizado a puromicina como droga para selecionar os parasitos transgênicos, e uma proteína fluorescente vermelha, mCherry, como gene repórter para comprovar o funcionamento da construção.

Em *Leishmania*, muitas proteínas são expressas durante todas as fases do ciclo de vida, como a tubulina, cuja região reguladora para que esta expressão seja constitutiva foi utilizada para controlar a expressão da droga de seleção.

Conforme previamente citado, algumas proteínas possuem especificidade da expressão gênica para determinada fase do ciclo de vida, como a amastina. Para gerar uma construção que provê um controle da expressão de fluorescência exclusiva para a fase amastigota (pFL Ama) nós utilizamos a região inter-gênica situada entre duas regiões codificantes para amastinas. Trabalho anterior com *L. donovani* demonstrou um aumento de 17 vezes na expressão do gene repórter LUC na fase amastigota ao comparar com promastigotas, quando este gene foi posto sob controle da região 3' UTR da amastina (Wu *et al.*, 2000).

O outro plasmídio construído, pFL Tub, gerou uma expressão da proteína fluorescente constitutiva, ou seja, em todas as fases do ciclo de vida. Para o controle da expressão em todas as fases do ciclo de vida, utilizamos a região inter-gênica situada entre as regiões codificantes para duas tubulinas. Da forma como o plasmídio pFL foi construído, esta mesma região inter-gênica controlou a expressão do gene que confere resistência a puromicina durante todos os estágios do ciclo de vida do parasito.

A fluorescência gerada pelo plasmídio pFL Ama durante a diferenciação de promastigotas para amastigotas atestou a confiabilidade destas construções, uma vez que os dados obtidos estão em conformidade com os obtidos por (Wu *et al.*, 2000), que reportaram um máximo nos níveis de transcritos para o gene amastina 3 a 4 dias após o início da diferenciação para amastigota.

Plasmídios epissômicos para *Leishmania* foram descritos por prover uma estável expressão de proteínas desde que os parasitos sejam mantidos em meio seletivo. Kapler, Coburn e Beverley (1990) relataram que o plasmídio epissômico pR-Neo em *L. major* e sob pressão de droga foi estável por mais de 200 passagens. Como não tínhamos segurança da estabilidade de um plasmídio epissômico em *L. infantum*, realizamos os testes preliminares que mostraram uma estabilidade equivalente à encontrada em outras espécies do parasito.

A transfecção de dois plasmídios epissômicos, em *L. infantum*, simultaneamente em uma só transfecção deve ser possível, tendo em vista que expressamos dois plasmídios simultaneamente, e que foi reportado trabalho com transfecção de duas construções de integração distintas em *L. donovani* com duas drogas de seleção em um só passo, economizando assim tempo, materiais e evitando o surgimento de artefatos na cultura (Ommen, Lorenz e Clos, 2009).

O plasmídio pX63 em *L. infantum*

O plasmídio pX63NeoGFP utiliza regiões 3' UTR da dihidrofolato redutase timidase sintase (DHFR-TS) de *L. major* para controlar a expressão gênica da proteína fluorescente durante todas as fases do ciclo de vida. Estudo prévio já havia descrito que esta enzima é constitutivamente expressa em *L. major* (Leifso *et al.*, 2007). Como demonstrado nas premissas deste estudo, tal região 3' UTR também provê uma expressão protéica constitutiva em *L. infantum*.

Utilizando um plasmídio epissômico derivado de pX63Neo para expressar GFP em *L. amazonensis*, Costa *et al.*, (2011) relataram diminuição na quantidade de amastigotas fluorescentes após infecção de camundongos. Resultados de nossas premissas utilizando *L. infantum* com plasmídio pX63NeoGfp encontraram resultados semelhantes, onde ocorreu uma redução da fluorescência da cepa após

sua passagem por animal. Mais uma vez, deve-se ressaltar que não deverá ser prolongado o tempo de cultivo de *Leishmania* que expressam plasmídios epissômicos na ausência de droga de seleção, pois a quantidade de parasitos que a expressam vai diminuindo.

Perspectivas - Possíveis aplicações e mudanças na construção

Droga de seleção

O plasmídio pFL poderá ser construído com modificações na droga a ser utilizada para selecionar os parasitos transgênicos. O plasmídio pFL foi originalmente construído para selecionar parasitos recombinantes com a droga puromicina.

Com apenas um passo de clonagem pode-se mudar a resistência à droga G418, também conhecida como Neomicina (Neo), por exemplo, cuja região codificante para o gene que confere resistência a esta droga não possui sítios de restrição impeditivos (Figura 24). Sendo assim, para construção do plasmídio pFL com a resistência a Neo, a sequência codificante para a proteína que confere a resistência deverá ser amplificada de algum vetor que contenha esta sequência (como o plasmídio pX63Neo) e clonada utilizando os seguintes *primers* para a PCR:

Direto: NeoBamHI: CGGGATCCATGGGATCGGCCATTGAAC

Reverso: NeoEcoRIr: CGGAATTCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG

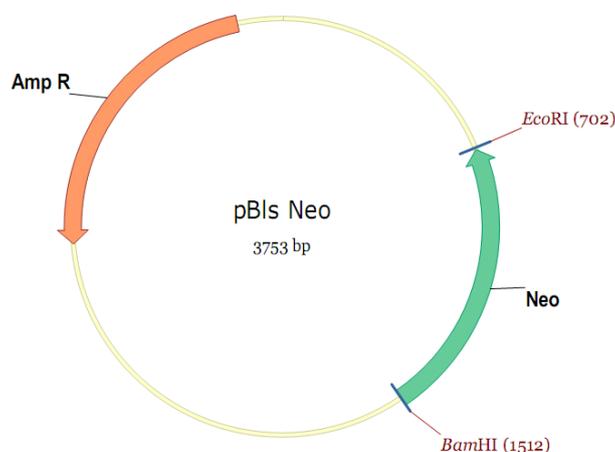


Figura 24 - Representação esquemática do plasmídio pBIs Neo. Regiões codificantes estão destacadas e flechas indicam sentido de transcrição.

Outras drogas deverão ter sua sequência codificante analisadas antes da montagem do novo vetor, já que observamos que a sequência codificante para o gene que confere resistência a higromicina possui um sítio de restrição para *EcoRV* (Figura 25) e sendo assim, esta construção precisaria de métodos alternativos para sua clonagem.

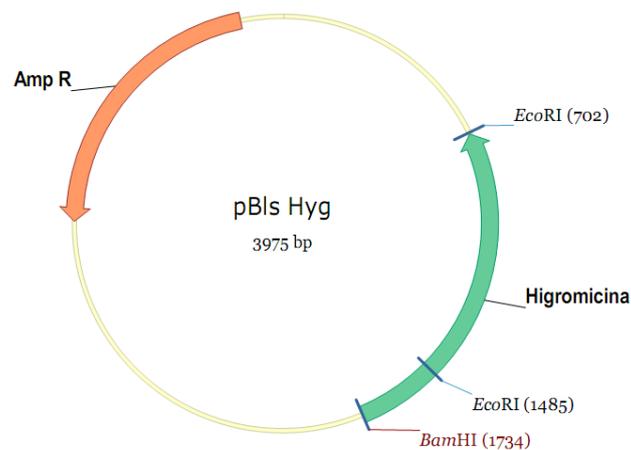


Figura 25 - Representação esquemática do plasmídio pBIs Hyg. Regiões codificantes estão destacadas e flechas indicam sentido de transcrição. Em detalhe, sítio de restrição para *EcoRI* na sequência codificante para resistência a droga higromicina.

Expressão em diferentes estágios do ciclo de vida

Sobre o plasmídio pFL desenhamos outras construções que especulamos expressar o gene repórter exclusivamente nas fases promastigota bem como na fase promastigota metacíclica.

Para a regulação da expressão gênica exclusiva durante as fases promastigotas (procíclico e metacíclico) sugerimos a utilização da região 3' UTR do RNA codificante para proteína do flagelo paraflagelar ROD2, cuja expressão restrita as fases promastigotas em geral estão bem estabelecidas (Rosenzweig *et al.*, 2008). Trabalho utilizando uma cepa de *L. mexicana* descreveu diferenças de mais de 15 vezes na abundância do RNAm codificante para estas proteínas do flagelo na fase promastigota quando comparadas a expressão em fase amastigota (Moore, Santrich e LeBowitz, 1996).

Hipotetizamos que o plasmídio pFL terá expressão exclusiva de fluorescência na fase promastigota (procíclico e metacíclico) quando o controle da expressão for regido pela região 3' UTR do RNAm da ROD2. Sendo assim, a região inter-gênica candidata a controlar a expressão de fluorescência nas fases promastigotas é a seqüência entre duas regiões codificantes para proteínas do flagelo, ROD2, (*LinJ16_V31510* e *LinJ16_V31520* código no genedb). O fragmento possui 1.464pb. Para isto, pode-se utilizar as seguintes seqüências iniciadoras para PCR e posterior clonagem:

Direto: IRRodHindIIIID: CCAAGCTTTAGGGCGGCGTCGCTGG

Reverso: IRRodSalIR: GCGTCGACTGCCGATGCTGTGTGGGGAG

Para regulação da expressão gênica exclusiva a fase promastigota metacíclica, também conhecida como promastigota infectiva, pode-se efetuar uma modificação no plasmídio pFL para utilizar a região 3' UTR da glicoproteína GP63. Existem diferentes trabalhos demonstrando um aumento da expressão de diversos genes da Gp63 ao longo do ciclo de vida. A expressão das GP63 (1-5) foram descritas por serem restritas a fase promastigota. A GP63-6 foi expressa em promastigotas e amastigotas, e a GP63-7 foi majoritariamente expressa em promastigotas estacionárias e amastigotas (Voth *et al.*, 1998). Em outro trabalho, Rosenzweig *et al.* (2008) observaram um aumento na presença das proteínas GP63-2 e GP63-3 durante a diferenciação de promastigotas em amastigotas. Sendo assim, para construção de um plasmídio cuja expressão gênica seja restrita à fase promastigota metacíclica, pode-se utilizar a região entre as seqüências codificantes para as proteínas GP63-1 (*LinJ10_V3.0490*) e a GP63-2 (*LinJ10_V3.0500*). Esta região inter gênica possui 1.252pb e para cloná-la pode-se utilizar as seguintes seqüências iniciadoras para reação em cadeia da polimerase:

Direto: IRgp63HindIIId: CCAAGCTTTAGACGGTGGATAGGACGG

Reverso: IRgp63ClaIr: CCATCGATCATGGCTCTGCAGGCGCGGG

Alternativamente, poderiam ser utilizadas as regiões inter gênicas das proteínas conhecidas como HASP/SHERP, tendo em vista que a expressão destas

proteínas também é majoritária na fase promastigota metacíclica (Knuepfer *et al.*, 2001).

Expressão de outras proteínas

Tendo em vista que o plasmídeo pFL expressou um gene repórter, no caso uma proteína fluorescente, fica evidente que a construção poderá ser modificada para a expressão de outras proteínas. Adicionalmente, acreditamos que este plasmídeo seja conveniente para fusionar uma proteína fluorescente a outra proteína de interesse, desta forma sendo também uma nova ferramenta para o estudo da localização de proteínas no parasito de forma ciclo de vida dependente.

Outras regiões inter-gênicas de interesse

O plasmídeo pFL descrito neste trabalho é uma nova ferramenta para analisar a expressão gênica provida por diferentes regiões gênicas. Avaliar os níveis de expressão após regulação de regiões não traduzidas ou inter-gênicas é uma tarefa laboriosa, que normalmente envolve métodos como Northern Blot, Southern Blot, Western Blot, (Wu *et al.*, 2000) imunoprecipitação ou gradientes de polirribosomos (McNicoll *et al.*, 2005). Com o plasmídeo proposto e um simples passo de clonagem, a fluorescência obtida utilizando a região 3' UTR poderá ser analisada por citômetro de fluxo ou por observação em microscópio de fluorescência durante qualquer tempo do ciclo de vida do parasito, *in vivo*. Resultados serão rápidos e poderão ser comparados com padrões de expressão obtidos neste estudo que utilizaram a região 3' UTR da amastina e tubulina. Apesar de não substituir as técnicas já consolidadas mencionadas aqui, esta ferramenta pode ser facilitadora para estudos de níveis de expressão providos por distintas regiões 3' UTR ou estudos de elementos com atuação em *cis* necessários para a regulação dos genes em *Leishmania*.

O plasmídeo pFL é conveniente para modificações na região 3' UTR que controla a expressão da proteína fluorescente, já que existem sítios de restrição sem uso no plasmídeo aqui proposto. Nós utilizamos a posição entre os sítios de restrição *EcoRV* e *HindIII* do plasmídeo pBluescript para clonar a sequência codificante da proteína fluorescente. Entre os sítios de restrição *HindIII* e *Clal* foi

Projeto *Leishmania* suicida

Uma futura aplicação para o plasmídeo pFL será a expressão de uma proteína letal para *Leishmania* apenas quando for iniciado o processo de diferenciação para o estágio amastigota. Produzir um parasito suicida poderá ser uma inovadora forma de vacina viva atenuada.

A idéia de um parasito suicida poderá ser ainda muito refinada, com a mútua sobre expressão de antígenos conhecidos por prover efeito protetor quando usados como vacina. Já foi relatado que a super expressão do fator de virulência A2 em *L. tarentolae*, uma espécie de *Leishmania* não infectiva a mamíferos, como vacina viva, conferiu proteção parcial a camundongos, que posteriormente foram desafiados com *L. infantum* (Mizbani *et al.*, 2009).

Apesar de não aceitarem o termo apoptose em *Leishmania*, Proto, Coombs e Mottram, (2013), em artigo de opinião, listaram algumas vias de morte celular para estes parasitos, que poderiam ser testadas em uma construção de parasitos suicidas.

Outras aplicações para o plasmídeo pFL

Existe dificuldade em se diferenciar estágios do ciclo de vida em culturas destes parasitos *in vivo*. A avaliação morfológica dos estágios é imprecisa e sua identificação apropriada depende da identificação de moléculas específicas. Contudo, a visualização destas moléculas, até o momento, é feita por métodos indiretos que exigem marcação do parasito (mortos). A construção de plasmídios que codificam proteínas fluorescentes de forma dependente da fase do ciclo de vida provê um novo método para diferenciar os diferentes estágios do parasito. Nestes parasitos é desnecessário o uso de qualquer tipo de marcação, coloração ou fixação na amostra, visto que cada estágio do parasito poderá ser identificado diretamente pela sua fluorescência. Os parasitos podem ser visualizados diretamente, *in vivo*, sem a presença de artefatos gerados pelas técnicas de coloração, ou mesmo poderão ser isolados apenas os parasitos em específica fase do ciclo de vida através de um FACS-Sort.

No caso de culturas amastigotas axênicas, há uma dificuldade adicional para contagem dos parasitos, visto que seu tamanho e formato são equivalentes a artefatos presentes na cultura. Tal limitação também é eliminada com parasitos fluorescentes, e para isto também poderia ser utilizado o plasmídio proposto.

Através da construção de um parasito que expresse dois plasmídios simultaneamente, cuja expressão de diferentes cores de fluorescência seja dependente de distintas fases do ciclo de vida, poderemos observar a mudança de cor de fluorescência do parasito durante as mudanças de fases do ciclo de vida. As possibilidades de construção são muito amplas, devendo-se levar em conta a cor da fluorescência, a droga de seleção a ser usada e a fase do ciclo de vida que se deseja expressar a fluorescência. Parasitos com estas características terão uma mudança no padrão da fluorescência durante a metaciclogênese ou durante a transformação em amastigotas. No caso da metaciclogênese natural, dentro do inseto vetor, após dissecação, formas promastigotas procíclicas poderão ainda ser isoladas por um FACS-Sort.

Adicionalmente, construções sobre o plasmídio pFL são feitas através de clonagem direcional, ao contrário por exemplo do plasmídio pX, onde após a clonagem, deve-se verificar se o sentido o qual o inserto foi clonado está correto.

VI – CONCLUSÕES

1 - Plasmídios epissômicos em *L. infantum* são estáveis, desde que não se estenda por muitas passagens o cultivo na ausência de droga de seleção.

2 - Construimos um novo vetor de expressão gênica para *Leishmania* utilizando como base o plasmídio bacteriano pBluescript SK(-).

3 - Utilizando uma construção no vetor proposto, expressamos um gene repórter exclusivamente na fase amastigota do parasito.

4 - Expressamos de forma concomitante dois plasmídios epissômicos em *L. infantum*.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOLEA, P. J. *et al.* Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC genomics**, v. 11, p. 31, jan. 2010.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, jan. 2012.

ASHUTOSH *et al.* Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3776-83, set. 2005.

BALMER, O.; TOSTADO, C. New fluorescence markers to distinguish co-infecting *Trypanosoma brucei* strains in experimental multiple infections. **Acta tropica**, v. 97, n. 1, p. 94-101, jan. 2006.

BANGS, J. D. *et al.* Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 14, p. 9805-15, 15 maio. 1992.

BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96 Suppl 1, p. S9-13, abr. 2002.

BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 79, n. 2, p. 215-8, set. 1994.

BENZ, C. *et al.* Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 143, n. 2, p. 125-34, out. 2005.

BOUCHER, N. *et al.* A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19511-20, 31 maio. 2002.

BRITTINGHAM, A. *et al.* Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 51-9, 15 jan. 2001.

CHALFIE, M. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science (New York, N.Y.)**, v. 263, n. 5148, p. 802-5, 11 fev. 1994.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO journal**, v. 21, n. 8, p. 1881-8, 15 abr. 2002.

COHEN-FREUE, G. *et al.* Global gene expression in Leishmania. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1077-86, ago. 2007.

CORMACK, B. P.; VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, v. 173, n. 1 Spec No, p. 33-8, jan. 1996.

COSTA, S. D. S. *et al.* Use of in vivo and in vitro systems to select Leishmania amazonensis expressing green fluorescent protein. **The Korean journal of parasitology**, v. 49, n. 4, p. 357-64, dez. 2011.

CRUZ, A.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7170-4, 15 ago. 1991.

DAROCHA, W. D. *et al.* Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology research**, v. 92, n. 2, p. 113-20, jan. 2004.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 9, p. 432-9, set. 2009.

FRAGA, J. *et al.* Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 2, p. 238-45, mar. 2010.

GULL, K. Protist tubulins: new arrivals, evolutionary relationships and insights to cytoskeletal function Keith Gull A distant relative: FtsZ. p. 427-432, [s.d.].

HA, D. S. *et al.* Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 77, n. 1, p. 57-64, abr. 1996.

HERNANDEZ-RIVAS, R.; SCHERF, A. Separation and mapping of chromosomes of parasitic protozoa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 815-9, 1997.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436-42, 15 jul. 2005.

JOSHI, M.; DWYER, D. M.; NAKHASI, H. L. Molecular cloning and characterization of a *Leishmania donovani* alpha-tubulin gene. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 42, n. 5, p. 628-32, [s.d.].

JUNG, G.; ZUMBUSCH, A. Improving autofluorescent proteins: comparative studies of the effective brightness of Green Fluorescent Protein (GFP) mutants. **Microscopy research and technique**, v. 69, n. 3, p. 175-85, mar. 2006.

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 and cellular biology**, v. 10, n. 3, p. 1084-94, mar. 1990.

KARAGIANNIS-VOULES, D.-A. *et al.* Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2213, maio. 2013.

KATTA, S. S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; GUPTA, C. M. Flagellar localization of a novel isoform of myosin, myosin XXI, in *Leishmania*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 164, n. 2, p. 105-10, abr. 2009.

KNUEPFER, E. *et al.* Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. **The Biochemical journal**, v. 356, n. Pt 2, p. 335-44, 1 jun. 2001.

KOZAK, M. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 1, p. 1-45, mar. 1983.

LARRETA, R. *et al.* The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. **BMC molecular biology**, v. 5, p. 3, 3 jun. 2004.

LEIFSO, K. *et al.* Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35-46, mar. 2007.

MAIR, G. *et al.* A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 2, p. 163-9, fev. 2000.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Molecular cell**, v. 11, n. 5, p. 1291-9, maio. 2003.

MCCALL, L.-I.; ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003053, jan. 2013.

MCNICOLL, F. *et al.* Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35238-46, 21 out. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. [s.l.: s.n.]. p. 180

MIZBANI, A. *et al.* Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 53-62, 10 dez. 2009.

MOJTAHEDI, Z.; CLOS, J.; KAMALI-SARVESTANI, E. *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 3, p. 422-9, jul. 2008.

MOORE, L. L.; SANTRICH, C.; LEBOWITZ, J. H. Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 80, n. 2, p. 125-35, 1 out. 1996.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, 2005.

MUSKUS, C. E.; MARÍN VILLA, M. [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*]. **Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 22, n. 2, p. 167-77, jun. 2002.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301-8, fev. 2008.

NASEREDDIN, A. *et al.* Characterization of *Leishmania (Leishmania) tropica* axenic amastigotes. **Acta tropica**, v. 113, n. 1, p. 72-9, jan. 2010.

OMMEN, G.; LORENZ, S.; CLOS, J. One-step generation of double-allele gene replacement mutants in *Leishmania donovani*. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 5, p. 541-6, abr. 2009.

PEACOCK, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 839-47, jul. 2007.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 22, n. 1, p. 1-13, jan. 1996.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 58-66, jan. 2013.

PURDY, J. E.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. *Leishmania chagasi*: the alpha-tubulin intercoding region results in constant levels of mRNA abundance despite protein synthesis inhibition and growth state. **Experimental parasitology**, v. 110, n. 2, p. 102-7, jun. 2005.

QAZI, S. N. A. *et al.* Development of gfp Vectors for Expression in *Listeria monocytogenes* and Other Low G+C Gram Positive Bacteria. **Microbial ecology**, v. 41, n. 4, p. 301-309, fev. 2001.

QUIJADA, L. *et al.* High-efficiency plating method for *Leishmania infantum*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 130, n. 2, p. 139-41, 31 ago. 2003.

REQUENA, J. M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 16, p. 2069-85, jan. 2011.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 59, jan. 2012.

RITMEIJER, K.; DAVIDSON, R. N. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene joint meeting with Médecins Sans Frontières at Manson House, London, 20 March 2003: field research in humanitarian medical programmes. Médecins Sans Frontières interventions against kala-azar in the Sudan, 19. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 609-13, [s.d.].

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 128, n. 2, p. 217-28, maio. 2003.

ROCHETTE, A. *et al.* Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 140, n. 2, p. 205-20, abr. 2005.

ROSENZWEIG, D. *et al.* Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 2, p. 590-602, fev. 2008.

SARKAR, A. *et al.* *Leishmania* strains causing self-healing cutaneous leishmaniasis have greater susceptibility towards oxidative stress. **Free radical research**, v. 46, n. 5, p. 665-73, maio. 2012.

SILVA, E. R. DA *et al.* Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase and its protein structure prediction. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 6, p. 727-37, jun. 2002.

SINGH, N. *et al.* Transgenic Leishmania donovani clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 370-4, ago. 2009.

SINGH, N.; DUBE, A. Short report: fluorescent Leishmania: application to anti-leishmanial drug testing. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 4, p. 400-2, out. 2004.

TAMAMES, J. *et al.* Conserved clusters of functionally related genes in two bacterial genomes. **Journal of molecular evolution**, v. 44, n. 1, p. 66-73, jan. 1997.

TSIGANKOV, P. *et al.* Phosphoproteomic analysis of differentiating leishmania parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 7, p. 3405-12, 5 jul. 2013.

VIEIRA-GONÇALVES, R. *et al.* Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis in Paraty, Rio de Janeiro. **International journal of dermatology**, v. 47, n. 9, p. 926-32, out. 2008.

VOTH, B. R. *et al.* Differentially expressed Leishmania major gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 93, n. 1, p. 31-41, 15 maio. 1998.

WHO. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. xii-xiii, 1-186, back cover, jan. 2010.

WU, Y. *et al.* A new developmentally regulated gene family in Leishmania amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 110, n. 2, p. 345-57, out. 2000.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1-16, nov. 2003.

VIII – ANEXOS

**Anexo 1 - Termo de Responsabilidade para projetos envolvendo
Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e/ou Animais Geneticamente
Modificados (AnGM)**

Eu, Manoel Barral-Netto, matrícula nº _____ pesquisador (a) principal,
responsável pelo projeto Desenvolvimento de Leishmania chagasi GFP e mCherry asseguro à
CIBio que;

- Li as Resoluções Normativas da CTNBio (www.ctnbio.gov.br) que regulamentam o trabalho com organismos e animais geneticamente modificados – OGMs e/ou AnGMs e concordo com suas determinações durante a vigência deste projeto
- A equipe que participa deste projeto também está ciente das referidas Resoluções Normativas e tecnicamente competente, além das instalações serem adequadas à realização do estudo.
- Comprometo-me a solicitar nova aprovação à CIBio sempre que ocorra qualquer alteração nos objetivos /procedimentos/instalações aqui descritos e a fornecer um Relatório Anual do projeto.
- Tudo que foi declarado é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente de que o eventual não cumprimento das Resoluções Normativas da CTNBio é de minha total responsabilidade e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

Local e data: Salvador 15 de março de 2011

Pesquisador principal (assinatura e carimbo)_____

Local e data: Salvador 15 de março de 2011

Chefe do Laboratório (assinatura e carimbo) Cláudia Brodskyn

Observações da CIBio_____

Data da Aprovação pela CIBio_____

Assinatura do Presidente da CIBio_____

Anexo 2 - DECLARAÇÃO

Declaro, para fins do Certificado de Qualidade em Biossegurança CQB, previsto na Lei nº 11.105, de 24/03/2005, a ser emitido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, que on Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz dispõe de infra-estrutura adequada e pessoal técnico competente para desenvolver com segurança atividades com pesquisa em regime de contenção com Leishmania chagasi geneticamente modificados (s) da Classe de Risco 2 (dois).

O Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação dispõe-se a receber os membros da CTNBio a qualquer tempo ou momento, para avaliação das condições físicas, técnicas, de infraestrutura e de pessoal da instituição, com vistas à emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento de CQB.

Local e data: Salvador 15 de março de 2011

Chefe do Laboratório (assinatura e carimbo) Cláudia Brodskyn

Observações da CIBio _____

Data da Aprovação pela CIBio _____

Assinatura do Presidente da CIBio _____