ADRIANO CAPPELLAZZO COELHO

Papel do transportador ABC PRP1 na resistência
à pentamidina em *Leishmania* spp.

Tese (Doutorado) apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Parasitologia).

São Paulo

2007

ADRIANO CAPPELLAZZO COELHO

Papel do transportador ABC PRP1 na resistência
à pentamidina em *Leishmania* spp.

Tese (Doutorado) apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Parasitologia).

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Cotrim

São Paulo

2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Coelho, Adriano Cappellazzo.

Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em *Leishmania* spp / Adriano Cappellazzo Coelho. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Paulo César Cotrim.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Genes relacionados com a resistência à drogas em *Leishmania*.

Versão do título para o inglês: Role of the ABC transporter PRP1 in pentamidine resistance in *Leishmania* spp .

Descritores: 1. *Leishmania* 2. Pentamidina 3. Transportador ABC 4. Resistência à drogas 5. Transfecção gênica I. Cotrim, Paulo César II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB098/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a):

Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o (a)

() Aprovado

() Reprovado

Examinador (a) Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a) Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a) Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a) Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente Assinatura:

Nome:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **81** nas fls. **8** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Cotrim, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Papel dos transportadores ABC (ATP binding cassette) na resistência a Pentamidina em Leishmania spp.**" do qual participou(arão) o(s) aluno(s): **Adriano Cappellazzo Coelho**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **28.09.2004**.

São Paulo, 28 de setembro de 2004

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Trabalho realizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, com auxílios financeiros da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Laboratório de Investigação Médica (LIM48) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A Luana, pelo amor, carinho e incentivo durante todos esses anos de união.

Aos meus pais, Marlene e Fernando, pelo grande exemplo de vida, amor e carinho.

Aos meus irmãos, Fabio e Fernanda, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Cotrim, pela oportunidade dada para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade durante todos esses anos. Obrigado pelo apoio e por sempre confiar no meu trabalho.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório Edite, Sueli, Juliana, Luciana, Priscila e Norival, pelos ensinamentos e aprendizados e pela grande amizade.

A Erika Hoffmann, pelas ajudas, sugestões e principalmente pela amizade que cultivamos durante todos esses anos.

A todo pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical, Fabiana, Mônica, Sandra Moraes, Guita, Kelly, Elaine, Edna, Sandra, Fabrício, Ângelo, Mariko, Prianti, Regiane, Beatriz, Mussya, Lívia, Carmem, Bete pela amizade e convivência no dia-a-dia do laboratório e pela disponibilidade de todos. Bem como aos funcionários Arthur, Renato, Eunice e, especialmente, ao Paulo Oliveira e a Ione (*in memmoriám*), pela imensa disposição em sempre ajudar.

Aos professores do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Profa. Dra. Hiro Goto e o Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira.

Ao Prof. Dr. Marc Ouellette do Centre de Recherche en Infectiologie da Université Laval, Québec, Canadá, pela oportunidade de realização de estágio em seu laboratório, pelos conhecimentos obtidos e pela amizade.

A todo o pessoal do laboratório do Prof. Marc Ouellette, Jie Feng, Amin, Danielle, Willfred, Jean-Michel, Suzanne, Marie-Christine, Gaetan, Jolyne, Karima, Philipe, Gina, Laurence, Isabelle, Nadine e Dominique, pela amizade e disponibilidade de todos.

A Luciana Giroto Gentil e a Profa. Dra. Márcia Regina Machado dos Santos da Escola Paulista de Medicina, pela disposição em ajudar e pelas sugestões, além da amizade desde a graduação.

Ao Prof. Dr. José Franco da Silveira da Escola Paulista de Medicina, por disponibilizar a utilização do seu laboratório contribuindo para a realização de alguns experimentos realizados neste trabalho.

A Profa. Dra. Sílvia R. B. Uliana, pelos iniciadores AP e AUAP e pelas sugestões ao longo da realização deste trabalho que vêm desde a minha dissertação de mestrado.

Aos Professores do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, pelo aprendizado e ensinamentos durante a realização dos cursos de pós-graduação.

A secretária de pós-graduação do Departamento de Parasitologia, Wilma, por todos os auxílios, por ser atenciosa e prestativa e pela amizade durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Renato Mortara da Escola Paulista de Medicina, pelo auxílio nos estudos utilizando Microscopia Confocal.

Ao Prof. Dr. Heitor, pelas sugestões dadas para a realização desse trabalho e pela amizade.

A Dra. Luciana Meireles do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelos ensinamentos e o auxílio na manipulação de coelhos.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte do Departamento de Dermatologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por disponibilizar a utilização do seqüenciador automático de seu laboratório.

A Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker, pela oportunidade dada para a realização do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) em sua disciplina e pela amizade.

A todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Aprender com a experiência dos
outros é menos penoso do que
aprender com a própria”.*

José Saramago

Resumo

COELHO A. C. **Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em *Leishmania* spp.** 2007. 222 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação da pentamidina, um composto alternativo utilizado no tratamento das leishmanioses. Com o intuito de se obter uma melhor compreensão do mecanismo de ação desse composto, assim como o mecanismo de resistência à pentamidina, foi isolado recentemente um gene que codifica um membro da família de transportadores ABC, chamado PRP1 capaz de conferir resistência à pentamidina em formas promastigotas de *Leishmania major*. Neste estudo, o gene *PRP1* de *L. major* foi caracterizado molecularmente e identificado em outras espécies do gênero *Leishmania*. O transportador ABC PRP1 mostrou-se funcional em espécies heterólogas de *Leishmania* (formas promastigotas), assim como em formas amastigotas do parasito. Sua localização celular mostrou-se ser intracelular em ambos os estágios evolutivos do parasito, sugerindo que a PRP1 deve acumular a droga no interior de vesículas, que seriam então exocitadas pelo parasito através da região do bolso flagelar. O tratamento dos transfectantes que superexpressam a PRP1 com pentamidina em presença de concentrações não tóxicas de verapamil, indicou que o segundo composto é capaz de reverter a resistência mediada por esse transportador ABC. Similarmente, formas promastigotas e amastigotas selvagens dos parasitos também apresentaram um aumento da suscetibilidade à pentamidina quando tratados com concentrações não tóxicas de verapamil. Foram ainda isolados nesse estudo duas linhagens de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina em concentrações distintas da droga. A análise molecular dos parasitos indicou que esses mutantes não apresentaram nenhuma amplificação de DNA, inclusive do gene *PRP1*, que também não se mostrou superexpresso em ambas as linhagens. As duas linhagens resistentes à pentamidina tiveram sua resistência revertida quando tratadas com concentrações não tóxicas de verapamil, indicando que o mecanismo de resistência nesses mutantes pode estar associado a um transportador ABC. Os resultados obtidos neste estudo fornecem dados para uma melhor compreensão do mecanismo de

ação da pentamidina no parasita, assim como dos mecanismos de resistência e sugerem um provável potencial da associação pentamidina e verapamil no tratamento da doença.

Palavras-chave: *Leishmania*, pentamidina, transportador ABC, resistência à drogas, transfecção gênica.

Abstract

COELHO A. C. Role of the ABC transporter PRP1 in pentamidine resistance in *Leishmania* spp. Ph. D. Thesis (Parasitology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Little it is known about the mechanism of action of pentamidine, an alternative compound used for leishmaniasis chemotherapy. To understand the mechanism of action and resistance of pentamidine, it was isolated recently a gene that codifies a member of ABC transporter family, named as PRP1 able to confer pentamidine resistance in promastigotes forms of *Leishmania major*. In this study, the *PRP1* gene of *L. major* was characterized and identified in other species of genus *Leishmania*. The ABC transporter PRP1 was functional in heterologous species of *Leishmania* (promastigotes forms) and in amastigotes. Its cellular localization was intracellular in both stages of the parasite suggesting that PRP1 may accumulate the drug inside vesicles that would be exocytosed by the parasite through the flagellar pocket. Treatment of transfectants over expressing PRP1 with pentamidine in presence of non toxic concentration of verapamil indicated that the later is able to reverse the drug resistance mediated by this ABC transporter. Similarly, in promastigotes and amastigotes wild-type parasites was also observed an increase in pentamidine susceptibility when parasites were treated with non toxic concentration of verapamil. Two lines of *L. amazonensis* resistant to pentamidine were selected in two distinct concentrations. Molecular analysis of parasites indicated that these mutants do not contain amplified DNA, including the *PRP1* gene either not associated with overexpression in both lines. The two lines resistant to pentamidine had their resistance reversed when treated with non toxic concentration of verapamil, indicating that the mechanism of resistance may be associated to an ABC transporter. The results of this work lead to new insights for a better understanding of the mechanism of action of pentamidine in the parasite, as well as for the mechanisms of resistance suggesting a probably potential of pentamidine and verapamil association in the chemotherapy.

Key words: *Leishmania*, pentamidine, ABC transporter, drug resistance, gene transfection.

Abreviaturas

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
APS	persulfato de amônio
ATP	adenosina-trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano sulfonato
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EPB	tampão de eletroporação
FIGE	<i>Field Inversion Gel Electrophoresis</i>
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GST	glutathione-s-transferase
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
IC ₅₀	concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%
IPTG	isopropil β-D-tiogalactosídeo
LB	Luria Bertani
LBA	LB contendo ampicilina
m	massa
ME	mercaptoetanol
PATH	potássio de antimônio tártaro trihidratado
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>

PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonila
RLU	unidade relativa de luz
RNA	ácido ribonucléico
RNAg	RNA guia
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossômico
RNase	ribonuclease
Sb(III)	antimônio trivalente
Sb(V)	antimônio pentavalente
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	SDS-eletroforese em gel de poliacrilamida
SLS	lauril sarcosinato de sódio
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
TEG	tampão Tris-EDTA-Glicose
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
TPCK	tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TSB	tampão de transformação e estocagem
U	unidade
UV	luz ultravioleta
v	volume

Unidades de Medida

cm	centímetro
<i>g</i>	aceleração da gravidade ($\cong 9,8 \text{ m/s}^2$)
g	grama
kb	quilobase
kDa	quilodalton
KV	quilovolt
L	litro
M	molar
Mb	megabase
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
pb	par de base
pmol	picomol
s	segundo
V	volt
μF	microFaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar

Sumário

1 Introdução	22
1.1 Leishmanioses: agente etiológico, ciclo biológico e epidemiologia	23
1.2 Tratamento	27
1.3 Mecanismos de resistência à drogas em <i>Leishmania</i> spp.	32
1.4 Transportadores ABC em <i>Leishmania</i> spp.	38
2 Objetivos	44
3 Material e Métodos	46
3.1 Organismos	47
3.2 Soluções, tampões e meios de cultura	47
3.2.1 Soluções e tampões	47
3.2.2 Meios de cultura para bactérias	48
3.2.3 Meio de cultura para <i>Leishmania</i> spp.	48
3.3 Vetores	49
3.4 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência a compostos anti- <i>Leishmania</i>	51
3.4.1 Drogas	51
3.4.2 Cultivo de <i>Leishmania</i> spp.	51
3.4.3 Purificação de formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> de lesão de camundongo BALB/c	53
3.4.4 Transfecção por eletroporação em <i>Leishmania</i> spp.	54
3.4.5 Análise de dados	55
3.5 Identificação de genes da família de transportadores ABC de <i>Leishmania</i> spp.	56
3.5.1 PCR	56
3.5.2 Ligação dos fragmentos de DNA amplificados em vetor específico	57
3.5.3 Processo de transformação em bactérias	57
3.5.4 Extração do DNA do plasmídeo de culturas de <i>E. coli</i>	58
3.5.5 Digestão dos DNAs dos plasmídeos com enzimas de restrição	59
3.5.6 Eletroforese em gel de agarose	60
3.5.7 Seqüenciamento de nucleotídeos	60
3.6 Análise da organização genômica do gene <i>PRP1</i> em <i>Leishmania</i> spp.	61
3.6.1 Isolamento de DNA genômico de <i>Leishmania</i> spp.	61
3.6.2 Marcação radioativa de fragmentos de DNA	62
3.6.3 Southern blot	62
3.7 Análise dos transcritos do gene <i>PRP1</i>	63
3.7.1 Isolamento de RNA total de <i>Leishmania</i> spp.	63
3.7.2 Northern blot	64
3.7.3 RT-PCR	66
3.7.4 RT-PCR em tempo real	67

3.8 Anticorpos anti-PRP1	68
3.8.1 Clonagem da proteína recombinante GST-PRP1	68
3.8.2 Expressão e purificação da proteína recombinante GST-PRP1	69
3.8.3 SDS-PAGE	71
3.8.4 Quantificação de proteína pelo método de Bradford	72
3.8.5 Obtenção de soro policlonal de coelho imunizado com a proteína recombinante GST-PRP1	72
3.9 Identificação da PRP1 em extratos protéicos de <i>L. major</i>	73
3.9.1 Purificação de proteínas de membrana de <i>L. major</i>	73
3.9.2 Western blot	74
3.10 Localização celular da PRP1 em formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>Leishmania</i> spp.	75
3.10.1 Construção do vetor pXG-PRP1-GFP	75
3.10.2 Microscopia de fluorescência	76
3.10.3 Microscopia confocal	76
3.11 Seleção e caracterização de mutantes de <i>L. amazonensis</i> resistentes à pentamidina	77
3.11.1 Seleção de mutantes resistentes à pentamidina	77
3.11.2 Preparação de blocos de agarose contendo cromossomos de <i>Leishmania</i>	78
3.11.3 Separação dos cromossomos por <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	78
3.11.4 Separação dos cromossomos de DNAs circulares por <i>Field Inversion Gel Electrophoresis</i> (FIGE)	79
3.11.5 Extração de DNA circulares nos mutantes resistentes à pentamidina	80
4 Resultados	81
4.1 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina e na resistência cruzada a compostos anti- <i>Leishmania</i>	82
4.2 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em espécies heterólogas de <i>Leishmania</i>	85
4.3 Caracterização molecular do gene <i>PRP1</i> de <i>L. major</i>	88
4.4 Identificação de homólogos do gene <i>PRP1</i> em <i>Leishmania</i> spp.	93
4.5 Análise da expressão da PRP1 em formas promastigotas de <i>L. major</i>	101
4.6 Localização celular da PRP1 em formas promastigotas de <i>L. major</i>	106
4.7 Atividade anti- <i>Leishmania</i> da associação pentamidina e verapamil em formas promastigotas	111
4.8 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i>	113
4.9 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	117

4.10 Atividade anti- <i>Leishmania</i> da associação pentamidina e verapamil em formas amastigotas _____	121
4.11 Caracterização dos mutantes de <i>L. amazonensis</i> resistentes à pentamidina _____	122
4.12 Caracterização molecular dos mutantes de <i>L. amazonensis</i> resistentes à pentamidina _____	130
5 Discussão _____	137
5.1 Análise molecular do gene <i>PRP1</i> de <i>Leishmania</i> _____	138
5.2 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em <i>Leishmania</i> _____	143
5.3 Caracterização dos mutantes de <i>L. amazonensis</i> resistentes à pentamidina_	157
6 Conclusões _____	162
Referências bibliográficas _____	164
Anexos _____	186

1 Introdução

1.1 Leishmanioses: agente etiológico, ciclo biológico e epidemiologia

As leishmanioses são parasitoses provocadas pelo parasita do gênero *Leishmania*, um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida). Esta ordem é caracterizada pela presença de flagelo e do cinetoplasto, organela capaz de auto-replicação que contém um DNA característico: o kDNA (REY, 1991). A família Trypanosomatidae é constituída apenas por espécies parasitas todas de caracteres muito homogêneos podendo ser monoxenas, parasitando quase sempre hospedeiros invertebrados ou heteroxenas, alternando seu ciclo de vida entre hospedeiros vertebrado e invertebrado (REY, 1991). O gênero *Leishmania* é constituído apenas por espécies heteroxenas, das quais incluem 30 espécies de mamíferos sendo que 21 infectam o homem (SHAW, 1994; CUPOLILLO et al., 2000). O hospedeiro invertebrado são os insetos flebotomíneos que pertencem ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Ásia e Europa) e ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas), família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae (REY, 1991). De acordo com a localização que as leishmânias habitam o intestino do hospedeiro invertebrado inseto (anterior, médio e posterior), as diferentes espécies são classificadas nos subgêneros *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*). Os parasitos do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) colonizam o intestino anterior e médio, enquanto que as espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) habitam o intestino anterior, médio e posterior.

O parasita é mantido em um sistema ecológico constituído por um único ou restrito número de espécies de insetos flebotomíneos e de uma diversidade de

mamíferos selvagens e domésticos ocorrendo desde marsupiais a primatas que constituem reservatórios importantes na transmissão da doença. As infecções em animais silvestres geralmente são benignas, enquanto que no homem e em animais domésticos, como cães, estas podem causar uma doença significativa (MAGILL, 1995).

As leishmânias caracterizam-se por apresentar duas formas morfológicamente distintas: amastigotas, quando os parasitos estão presentes no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado mamífero, e promastigotas, quando se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota tem corpo circular achatado, núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico. O cinetoplasto tem forma discóide e o flagelo encontra-se numa invaginação da membrana, o bolso flagelar. A forma promastigota tem núcleo central e cinetoplasto na região anterior, de onde também emerge o longo flagelo. Ambas as formas multiplicam-se por divisão binária nos respectivos hospedeiros.

O ciclo biológico inicia-se pela picada do inseto flebotomíneo ao hospedeiro vertebrado infectado que, durante a ingestão de sangue, adquire as formas amastigotas contidas no interior dos macrófagos. As formas amastigotas são liberadas no tubo digestivo do inseto, onde se diferenciam em promastigotas procíclicas ficando aderidas ao epitélio do intestino do inseto vetor. Após alguns dias, estas formas passam por outro processo de diferenciação transformando-se em promastigotas metacíclicas infectantes que não se dividem, diferentemente das formas procíclicas. Estas formas infectantes desligam-se do epitélio do intestino e migram para a faringe e cavidade bucal do inseto. Na próxima picada, os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro vertebrado infectando macrófagos. Dentro dos macrófagos, ocorre a formação do fagolisossomo (ou

vacúolo digestivo), onde os promastigotas metacíclicos sobrevivem e diferenciam-se em amastigotas. As formas amastigotas multiplicam-se nos vacúolos dos macrófagos, até que pelo elevado número de leishmânias no interior do macrófago tem-se a destruição da célula hospedeira e a liberação das formas amastigotas no meio intercelular, as quais são novamente fagocitadas por outros macrófagos.

As leishmanioses provocam lesões cutâneas localizadas, e lesões cutâneas, viscerais e nas mucosas (infecção disseminada) devido ao acometimento do sistema fagocítico mononuclear. No homem, as formas de progressão da doença estão relacionadas com a espécie do parasito infectante e a suscetibilidade do hospedeiro, sendo distribuídas em quatro principais formas clínicas (REY, 1991; HERWALDT, 1999; ASHFORD, 2000; MURRAY et al., 2005):

1) Leishmaniose cutânea – produz lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas. Geralmente é causada por *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* ou *L. (V.) braziliensis*;

2) Leishmaniose cutâneo-difusa – produz lesões disseminadas cutâneas, não ulcerativas no corpo do paciente, sendo causada por *L. (L.) aethiopica* ou *L. (L.) amazonensis*;

3) Leishmaniose mucocutânea – produz lesões ulcerosas destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe, sendo geralmente causada por *L. (V.) braziliensis*;

4) Leishmaniose visceral – os parasitos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides, produzindo lesões nesses órgãos e podendo levar a morte se não tratado. É causada por *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*.

Ashford (2000) ainda considera uma quinta manifestação clínica de leishmaniose dérmica manifestada após a cura da leishmaniose visceral causada por *L. (L.) donovani*.

As leishmanioses têm uma prevalência de 12 milhões de pessoas e uma taxa de incidência mundial de 2 milhões de novos casos por ano e 70.000 mortes por ano, sendo endêmicas em 88 países (ASHFORD, DESJEUX, RAADT, 1992; MURRAY et al., 2005). A doença ocorre em países de regiões tropicais e subtropicais abrangendo regiões do norte da Argentina ao sul do Texas nas Américas, sul da Europa, Ásia e particularmente o leste e o norte da África (MAGILL, 1995; HERWALDT, 1999). Segundo Murray et al. (2005), 90% dos casos no mundo de leishmaniose visceral estão em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão, ocorrendo a mesma porcentagem dos casos de leishmaniose cutânea restritos apenas a Afeganistão, Paquistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Algéria e Síria. Esses dados mostram que os casos de leishmaniose concentram-se essencialmente em países pobres como uma doença negligenciada (DESJEUX, 1996; YAMEY; TORRELEE, 2002; ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Dados referentes ao Brasil da Fundação Nacional de Saúde indicaram uma média de 28 mil casos anuais de leishmaniose tegumentar (leishmaniose cutânea, cutânea-difusa e mucocutânea) no período de 1987 a 1996 e de 1980 casos por ano de leishmaniose visceral com mais de 90% dos casos incidentes no Nordeste. (RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003). Os mesmos autores mostram que apenas no ano de 2002, foram notificados 33.720 casos de leishmaniose tegumentar e 4.880 casos de leishmaniose visceral. Entre os anos de 1982 e 2002 a incidência anual do número de casos de leishmaniose variou de 0,96 a 2,66 casos/100.000 habitantes sendo as principais espécies causadoras: *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.)*

guyanensis e *L. (V.) braziliensis* (RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003). Recentemente, o primeiro caso de leishmaniose cutânea difusa autóctone por *L. amazonensis* foi identificado em um paciente do Estado do Rio de Janeiro, o que indica um aumento da distribuição geográfica do parasito no país (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007).

Os casos de leishmaniose associados à infecção por HIV têm aumentado significativamente nos últimos anos (ALTES et al., 1991; ALVAR et al., 1997). Essa co-infecção tem sido considerada uma doença emergente, principalmente no sul da Europa, onde 25 a 70% dos casos de leishmaniose visceral estão relacionados com o vírus da AIDS (LAGUNA, 2003). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), das 17 milhões de pessoas infectadas pelo vírus da AIDS, um terço destas vivem em regiões endêmicas de leishmaniose (World Health Organization, 1995). No Brasil foram notificados quase 100 casos de co-infecção no ano de 2002 (RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003).

1.2 Tratamento

O tratamento das leishmanioses baseia-se ainda na utilização dos antimoniais descobertos por Gaspar Vianna em 1912 (REY, 1991). Os de maior aceitação são os antimoniais pentavalentes [Sb(V)], antimoniato de meglumine (Glucantime) e estibogluconato de sódio (Pentostam), cujas taxas de cura variam dependendo da forma clínica da doença (MURRAY et al., 2005). Estes compostos apresentam uma série de efeitos colaterais, seu tratamento é longo (várias semanas) e são administrados por via intramuscular ou intravenosa, sendo inativos se administrados oralmente (CROFT, 1988; HERWALDT; 1999; MURRAY et al., 2005). O alto grau de

toxicidade destes compostos deve ser considerado quando altas concentrações são utilizadas no tratamento atual (cerca de 4 vezes maiores do que a 20 anos atrás) que têm sido decorrentes de casos de resistência adquirido pelo parasita resultado de uma exposição descontínua a droga, dosagens inadequadas e casos associados à infecção por HIV (ALTES et al., 1991; OLLIARO; BRYCESON, 1993; BERMAN, 1997). Existe ainda uma grande variação das diferentes espécies de *Leishmania* e que pode influenciar na resposta clínica a esses compostos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Dados recentes mostram uma evidente correlação entre a ineficácia no tratamento com os antimoniais com cepas do parasito resistentes a esses compostos isolados de pacientes (MOREIRA; ANACLETO; PETRILLO-PEIXOTO, 1998; LIRA et al., 1999; CROFT, 2001; CARRIÓ; PORTÚS, 2002; DUBE; SINGH; SUNDAR, 2005; HADIGHI et al., 2006). Embora ainda pouco compreendido o mecanismo de ação dos Sb(V), sabe-se que esses compostos estão envolvidos na redução intracelular de ATP devido a inibição da glicólise e da oxidação dos ácidos graxos (BALANÃ-FOUCE et al., 1998), fragmentação do DNA (SERENO et al., 2001) além de induzir o efluxo de tióis intracelulares tripanotiona e glutathione e inibir a enzima tripanotiona redutase (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Segundo Ouellette, Drummelsmith, Papadopoulou (2004), o Sb(V) deve ser convertido para forma trivalente [Sb(III)] para ser ativo contra o parasito. Essa redução deve ocorrer nos macrófagos (SERENO et al., 1998) e em formas amastigotas do parasito (SHAKED-MISHAN et al., 2001) sendo que em *Leishmania* a redução deve ser mediada pelas enzimas: redutase tiol-dependente (TDR1) (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004) e a antimoniato redutase (ACR2) que aumenta a suscetibilidade dos parasitos ao Sb(V) (ZHOU et al., 2004). Considerando que a redução do Sb(V) ocorreria nos macrófagos, a entrada da forma reduzida no

parasito se daria pela aquagliceroporina (AQP1) recentemente descrita e capaz de aumentar a suscetibilidade ao Sb(III) quando superexpressa em três espécies do parasito (GOURBAL et al., 2004). A saída do antimonial se daria por dois sistemas de efluxo dos antimoniais conjugados aos tióis intracelulares glutatona e tripanotiona, sendo um sistema localizado na membrana plasmática mas ainda não identificado (DEY et al., 1996) e um outro mediado pelo transportador ABC MRPA localizado intracelularmente conferindo resistência através do seqüestro dos antimoniais conjugados a tióis para o interior de vesículas que seriam exocitadas pela região do bolso flagelar (LÉGARÉ et al., 2001b; OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Interessantemente, a co-transfecção dos genes *MRPA* e *GSH1* (γ -glutamylcisteína sintetase), uma enzima envolvida na biossíntese de glutatona, mostra uma ação sinérgica de ambos os genes em conferir resistência aos antimoniais conjugados aos tióis em *Leishmania* (GRONDIN et al., 1997).

A pentamidina, uma diamidina aromática, é utilizada principalmente no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea, geralmente em casos refratários ao tratamento com os Sb(V) (SANDS; KRON; BROWN, 1985; OLLIARO; BRYCESON, 1993; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). O mecanismo de ação da droga é pouco conhecido. A entrada da pentamidina na célula ocorre através de um transportador de pentamidina de alta afinidade, dependente de prótons, cuja entrada não é inibida por uma grande variedade de metabólitos como poliaminas, aminoácidos, nucleosídeos e nucleobases dentre outros (BASSELIN et al., 2002; BRAY et al., 2003). Sabe-se que a pentamidina liga-se ao DNA essencialmente às regiões ricas em AT, no qual o DNA mitocondrial (kDNA) de *Leishmania* apresenta maior conteúdo dessas bases do que o DNA nuclear, podendo assim afetar os

processos de replicação e transcrição e provocar a desintegração da rede intercatenada de moléculas de DNA circular que compõe o genoma mitocondrial (BALANÃ-FOUCE et al., 1998; HENTZER; KOBAYASI, 1977; CROFT; BRAZIL, 1982; BASSELIN; ROBERT-GERO, 1998). Outros dados mais recentes vieram a confirmar que a mitocôndria é um importante alvo da pentamidina em *Leishmania* ocorrendo alterações no potencial de membrana mitocondrial em mutantes resistentes à droga (BASSELIN et al., 2002; BRAY et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2006). A pentamidina ainda inibe a síntese de poliaminas e a atividade da topoisomerase I (BASSELIN et al., 1997; JEAN-MORENO et al., 2006). Em mutantes resistentes à pentamidina de *L. mexicana* o efluxo da droga é mediado por um transportador ABC ainda não identificado (BASSELIN et al., 2002; BRAY et al., 2003). No entanto, a pentamidina apresenta uma série de efeitos colaterais podendo provocar náuseas, diarreia, dor de cabeça, taquicardia, hipoglicemia, nefrotoxicidade, dentre outros sintomas (BALANÃ-FOUCE et al., 1998; MURRAY et al., 2005) o que tem levado a síntese de análogos da pentamidina com o intuito de se diminuir a toxicidade assim como melhorar sua eficácia no tratamento (SOEIRO et al., 2005; WERBOVETZ, 2006).

Outros compostos vêm sendo utilizados como segunda linha de tratamento para as leishmanioses como a anfotericina B, paromomicina e o interferon-gama em diversas combinações e formulações, sendo todas essas drogas de uso parenteral (HERWALDT, 1999; ASHFORD, 2000; MURRAY et al., 2005). Assim como a pentamidina, a anfotericina B, é um composto alternativo ao tratamento por antimônios, embora também apresente efeitos colaterais o que restringi sua utilização (CROFT, 1988). Esse composto apresenta alta afinidade ao ergosterol, o esterol predominante da membrana plasmática de *Leishmania* e outros

tripanossomatídeos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Mutantes amastigotas e promastigotas resistentes a esse composto apresentaram alterações significativas na composição dos esteróis de membrana quando comparados com os respectivos parasitos selvagens (MBONGO et al., 1998; AL-MOHAMMED; CHANCE; BATES, 2005). Os azóis cetoconazol e itraconazol são de uso oral e atuam na via de biossíntese do ergosterol, sendo utilizados principalmente nos casos de leishmaniose cutânea (BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999).

A paramomicina, um aminoglicosídeo, tem sido utilizada no tratamento de leishmaniose visceral e cutânea, porém pouco se conhece sobre o mecanismo de ação e de resistência à esse composto em *Leishmania* (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), um derivado de fosfolipídios, se apresenta como o mais novo composto utilizado no tratamento das leishmanioses, sendo de administração oral. Esse composto mostrou-se claramente efetivo e tolerado para o tratamento da leishmaniose visceral ocorrente na Índia (JHA et al., 1999), sendo descrito recentemente como eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea (SOTO et al., 2001). A miltefosina atua no metabolismo de alquil-lipídios e na biossíntese de fosfolipídios (LUX et al., 2000). Parasitos resistentes a esse composto já foram obtidos *in vitro* (SEIFERT et al., 2003), e apresentaram redução dos fosfolipídios insaturados de membrana plasmática além de alterações na biossíntese de esteróis (RAKOTOMANGA; SAINT-PIERRE-CHAZALET; LOISEAU, 2005).

Os dados apresentados mostram a necessidade de se buscar melhorias nas formas de tratamento das leishmanioses. Parte dessas drogas utilizadas no tratamento foram descobertas de forma empírica, pouco se conhecendo sobre o mecanismo de ação dessas drogas, bem como dos mecanismos de resistência

adquirido pelo parasita. Além disso, a resistência à drogas vem sendo um dos maiores obstáculos para o tratamento e controle das doenças provocadas por protozoários parasitas (BORST, OUELLETTE, 1995; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Diante desse quadro, novas abordagens terapêuticas são necessárias, ou ainda, tentar atuar sinergisticamente no sentido de melhorar a ação dos compostos já existentes. O tratamento com butionina sulfoximina, um inibidor específico da γ -glutamylcisteína sintetase, enzima essencial para a biossíntese de glutatona, foi capaz de reduzir a resistência aos antimonias *in vitro* (HAIMEUR et al., 1999; EL FADILI et al., 2005) e *in vivo* (CARTER et al., 2003) através da redução de tióis intracelulares do parasito (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004). Inibidores dos transportadores ABC como o verapamil e as fenotiazinas já foram descritos como capazes de reverter a resistência à drogas mediada por esses transportadores em células tumorais, *Plasmodium falciparum*, bactérias e outros parasitos (ENDICOTT; LING, 1989; GOTTESMAN; PASTAN, 1993; MARTIN; ODUOLA; MILHOUS, 1987; GRÁCIO et al., 2003). Mais recentemente, inibidores como sesquiterpenos e flavonóides também foram descritos como possíveis inibidores da resistência mediada por transportadores ABC em *Leishmania* (PÉREZ-VICTORIA et al., 2001a; PÉREZ-VICTORIA et al., 2001b; PÉREZ-VICTORIA et al., 2002; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006b).

1.3 Mecanismos de resistência à drogas em *Leishmania* spp.

Os protozoários parasitos são capazes de desenvolver resistência às drogas usadas contra eles. Os mecanismos de resistência estão relacionados com a

adaptabilidade genética destes organismos, cujas principais estratégias seriam: a amplificação gênica e a conseqüente superexpressão do produto codificado pelo gene da enzima alvo da droga ou de um gene que codifica uma proteína capaz de transportar a droga, alterando sua concentração na célula e mutações nos genes cujo produto protéico tem afinidade com a droga (BORST, OUELLETTE, 1995; PAPADOPOULOU et al., 1998; OUELLETTE, 2001). Essas mutações podem gerar uma grande variabilidade de mecanismos como: diminuição do acúmulo da droga, aumento de sua eliminação pela célula, inativação da droga pelo metabolismo ou seqüestro, diminuição de afinidade do alvo da droga ou perda completa do alvo associado a um mecanismo de desvio (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Em *Leishmania* spp., a amplificação gênica constitui um importante mecanismo relacionado com células resistentes às drogas (BEVERLEY, 1991; OUELLETTE, BORST, 1991; SEGOVIA, 1994; BORST, OUELLETTE, 1995). Os produtos oriundos da amplificação de DNA apresentam-se em múltiplas cópias de DNAs extracromossomais lineares e/ou circulares e podem constituir de 5 a 10% do DNA genômico total (CODERRE et al., 1983; BEVERLEY et al., 1984; OLMO et al., 1995). Existem ainda, algumas amplificações lineares ou circulares (LD1 e CD1 respectivamente) de função desconhecida que não estão relacionadas com a resistência à drogas (SEGOVIA, 1994; SEGOVIA, ORTIZ, 1997). Seqüências de DNA repetitivas são consideradas como as principais mediadoras desses rearranjos de DNA, mesmo considerando a pequena quantidade dessas seqüência repetitivas distribuídas no genoma do parasito (BEVERLEY, 1991; IVENS et al., 2005).

A amplificação do gene da Dihidrofolato redutase timidilato sintetase (*DHFRTS*) em *L. tropica* foi a primeira indicação que a resistência ao metotrexato era mediada por amplificação gênica (CODERRE et al., 1983). Linhagens clonais resistentes a

esse composto podem ser induzidas em *Leishmania* spp. por seleção com concentrações crescentes da droga, nas quais a amplificação de DNAs circulares é observado a partir de dois sítios distintos: a região R e a região H (BEVERLEY et al., 1984). O círculo R contém o gene da *DHFRTS* amplificado de um segmento cromossomal de 30 kb (CODERRE et al., 1983; BEVERLEY et al., 1984). O círculo H contém o gene da pteridina redutase (*PTR1*), que foi caracterizado utilizando técnicas de transfecção gênica (CALLAHAN, BEVERLEY, 1992; PAPADOPOULOU; ROY; OUELLETTE, 1992; BELLO, 1994; CHIQUERO et al., 1994). Ambos os genes são capazes de conferir resistência ao metotrexato quando amplificados seu número de cópias e superexpressos. O círculo H contém também o gene de um transportador ABC (*MRPA*), cuja amplificação e superexpressão confere resistência ao arsenito e aos antimoniais em *Leishmania* spp. (OUELLETTE, FASE-FOWLER, BORST, 1990; CALLAHAN, BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU et al., 1994; CHIQUERO et al., 1994; ANACLETO et al., 2003) e o gene *HTBF* envolvido na resistência à terbinafina (MARCHINI et al., 2003). A formação do círculo H está associado a presença de DNAs repetitivos que favorecem essas amplificações e já foram descritos em várias espécies do subgênero *Leishmania* (ELLENBERGER; BEVERLEY, 1989; OUELLETTE; FASE-FOWLER; BORST, 1990; OUELLETTE et al., 1991; OUELLETTE; PAPADOPOULOU, 1993; GRONDIN; PAPADOPOULOU; OUELLETTE, 1993; CHIQUERO et al., 1994; BORST; OUELLETTE, 1995; GRONDIN; ROY; OUELLETTE, 1996), porém em *L. braziliensis*, espécie do subgênero *Viannia*, não foi observado a amplificação da região H, envolvida na resistência aos antimoniais, ao metotrexato e a terbinafina em outras espécies de *Leishmania* (DIAS et al., 2007). Mutantes de *L. braziliensis* resistentes aos antimoniais e a terbinafina foram facilmente obtidos nesta espécie, porém o mesmo

fenômeno não foi observado quando os parasitos foram selecionados em presença de metotrexato (DIAS et al., 2007).

Outros círculos já descritos e envolvidos em resistência são: o círculo V relacionado com a resistência à vinblastina e outras drogas hidrofóbicas em várias espécies de *Leishmania spp.* mediado pela superexpressão de um outro transportador ABC, a MDR1 (ABCB4) (HENDERSON, 1992; CHOW et al., 1993; WONG; CHOW; WIRTH, 1994; GUEIROS-FILHO et al., 1995; KATAKURA et al., 1999), e o ODC70-C um amplicon circular que juntamente com o amplicon linear ODC140-L são formados em células de *L. donovani* resistentes ao DFMO (α -difluormetilornitina), um inibidor da enzima ornitina descarboxilase, envolvida na biossíntese de poliaminas (HANSON et al., 1992). A amplificação gênica já foi observada em parasitos resistentes aos Sb(V): Glucantime e Pentostam, porém o respectivo gene associado com a resistência não foi identificado (Glucantime) ou ainda corresponde a uma proteína de função desconhecida (Pentostam) (ARANA et al., 1998; HAIMEUR; OUELLETTE, 1998). Em dois mutantes de *L. tarentolae* resistentes à anfotericina B, DNAs amplificados distintos foram isolados, embora os respectivos genes envolvidos na resistência ainda não foram identificados (SINGH; PAPADOPOULOU; OUELLETTE, 2001). Em mutantes de *L. amazonensis* resistentes à tubercidina foi observado a presença de DNAs amplificados e o gene *TOR* (*toxic nucleoside resistance*) foi associado ao mecanismo de resistência (KERBY; DETKE, 1993; DETKE, 1997). O mecanismo de resistência à tubercidina mediado por altos níveis da proteína TOR, seria pelo redirecionamento de uma permease de adenosina da membrana plasmática para o elemento multivesicular tubular lisossomal levando a sua degradação (DETKE, 2007). Além do gene *TOR*, mutações no gene de um transportador de nucleosídeos (*LdNT1.1*) também confere

resistência à tubercidina em *L. donovani* (IOVANNISCI et al., 1984; VASUDEVAN et al., 1998; VASUDEVAN; ULLMAN; LANDFEAR, 2001).

Estudos mais recentes têm mostrado outros mecanismos, além da amplificação gênica como capazes de mediar resistência à drogas. Dados por microarray de DNA têm demonstrado que parasitos resistentes à drogas em diferentes espécies de *Leishmania*, podem apresentar genes superexpressos envolvidos na resistência ao Sb(III) e ao metotrexato mas não associados a amplificação gênica (GUIMOND et al., 2003; EL FADILI et al., 2005; MARQUIS et al., 2005). Também foi demonstrado uma alteração no processamento do RNAm que codifica uma enzima envolvida na biossíntese do ergosterol em mutantes resistentes à anfotericina B (POURSHAFIE et al., 2004). Mutantes resistentes à pentamidina de *L. major* também foram selecionados, mas nenhuma amplificação de DNA foi observada sugerindo que nesse caso esse mecanismo não parece como responsável em mediar resistência (ELLENBERGER; BEVERLEY, 1989). Em mutantes promastigotas resistentes à miltefosina de *L. donovani*, nenhuma amplificação gênica foi observada (SEIFERT et al., 2003). Nesse caso, o mecanismo de resistência se dá por um defeito na internalização da droga (PÉREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003a) que é causado por mutações pontuais no transportador LdMT, uma ATPase tipo P pertencente a uma subfamília de translocases de aminofosfolipídios que afeta o acúmulo da droga pelo parasito (PÉREZ-VICTORIA et al., 2003b). Posteriormente, esse mesmo grupo demonstrou que uma subunidade β do transportador LdMT, chamada de LdRos3, também atua como um fator para a atividade de translocação, sendo também responsável pelo acúmulo da droga no parasito (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006a).

O estudo dos aspectos moleculares e bioquímicos relacionados com a resistência à drogas seria um campo promissor para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos compostos anti-*Leishmania* bem como o controle da doença (CROFT, 2001; OUELLETTE, 2001). Atualmente, este estudo é possível através do uso de técnicas moleculares de transfecção gênica que utilizam vetores capazes de se propagar tanto no parasito, quanto em profagos (*shuttle vectors*) (LE BOWITZ et al., 1990; RYAN; DASGUPTA; BEVERLEY, 1993; DESCOTEAUX et al., 1994). Através desta abordagem, Cotrim, Garrity e Beverley (1999) demonstraram que ao transfectar uma biblioteca de DNA genômico de *L. major*, poderia ser isolado um cosmídeo que contém um gene que codifica para uma proteína cuja superexpressão confere resistência a um determinado composto. A viabilidade deste protocolo foi confirmada isolando cosmídeos que continham genes sabidamente conhecidos e que geram resistência via amplificação gênica: os genes da *DHFRTS* e da *PTR1* e o *TOR* envolvidos na resistência ao metotrexato e a tubercidina respectivamente (CODERRE et al., 1983; CALLAHAN; BEVERLEY, 1992; KERBY, DETKE, 1993; DETKE, 1997). Utilizando essa mesma metodologia, foram isolados dois cosmídeos: cosPEN1-A e cosPEN1-B, pertencentes ao mesmo *locus* e capazes de conferir resistência à pentamidina quando transfectados e amplificado seu número de cópias em *L. major*. A análise prévia desse *locus* indicou que esse não correspondia àqueles previamente descritos relacionados com resistência à drogas em *Leishmania*: metotrexato, terbinafine, itraconazol e tubercidina (COTRIM; RYAN; BEVERLEY, 1999). O gene relacionado com a resistência à pentamidina, contido nesse *locus*, foi identificado e corresponde a um membro da família de transportadores ABC, nomeado como PRP1 (*Pentamidine Resistance Protein 1*)

(COELHO, 2002), recentemente classificado como ABCC7 (LEPROHON et al., 2006).

1.4 Transportadores ABC em *Leishmania* spp.

Os membros da família de transportadores ABC (ATP-binding cassette) constituem a maior família de proteínas transmembrana e são encontradas em todos os seres vivos (HIGGINS, 1992). Possuem uma estrutura bastante conservada, constituída por uma duplicação em tandem constituídas cada unidade da duplicação por regiões transmembrana de α -hélices e um domínio de ligação de ATP essencial para a atividade de ATP com uma função fisiológica importante no transporte de metabólitos e de drogas tóxicas através de membranas contra o gradiente de concentração, cujo processo é dependente de energia (ATP-dependente) (ENDICOTT; LING, 1989; HIGGINS, 1992; GOTTESMAN; PASTAN, 1993; TURCO, 1995). Além dessa estrutura duplicada dos transportadores ABC, têm sido encontrado no genoma dos mais diversos organismos, a presença de uma única unidade da duplicação, ou ainda proteínas ABC não envolvidas no transporte, mas associadas a processos celulares que não apresentam o domínio transmembrana e apenas um ou dois domínios de ligação de ATP fundidos. Toda essa diversidade estrutural dos transportadores ABC já foi encontrada em *Leishmania* (Tab. 1) (LÉGARÉ et al., 2001a; LEPROHON et al., 2006). O domínio de ligação de ATP é altamente conservado sendo constituído pelos motivos Walker A e B, além do motivo C que está localizado entre os motivos Walker e que corresponde à assinatura dos transportadores ABC (HIGGINS, 1992). Baseando-se na sequência de aminoácidos

do domínio de ligação de ATP, as proteínas ABC foram divididas em oito diferentes subfamílias (ABCA a ABCH), sendo sete subfamílias encontradas no homem (ABCA a ABCG) (ALLIKMETS et al., 1996) e todas as oito encontradas em *Leishmania* (LEPROHON et al., 2006). Na tabela 1, estão representados os 42 membros dessa família de transportadores em *Leishmania*, conforme descrito previamente (LEPROHON et al., 2006). Nos outros tripanossomatídeos também causadores de doenças no homem, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*, os transportadores ABC também estão presentes com 22 e 28 membros respectivamente (LEPROHON et al., 2006), embora o conhecimento sobre o papel desses transportadores ABC na resistência à drogas nestes parasitos seja mais restrito (KLOKOUZAS et al., 2003).

O primeiro transportador ABC caracterizado em *Leishmania* spp. foi a MRPA (ABCC3), pertencente a subfamília ABCC, que está relacionada com a resistência ao arsenito e aos antimoniais, mas não as drogas hidrofóbicas vinblastine e puromicina (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; OUELLETTE; FASE-FOWLER; BORST, 1990; PAPADOPOULOU et al., 1994; OUELLETTE et al., 1998; LÉGARÉ et al., 2001b). Seu ortólogo em *T. brucei* confere resistência ao melarsoprol (SHAHI; KRAUTH-SIEGEL; CLAYTON, 2002). Outro membro dessa família, a PRP1 (ABCC7) está relacionada com a resistência à pentamidina (COELHO, 2002). A subfamília ABCC, conhecida por fornecer proteção contra agentes tóxicos, possui ainda mais seis membros, porém nenhum deles foi associado a resistência à drogas em *Leishmania* até o momento (LÉGARÉ; HETTEMA; OUELLETTE, 1994; LEPROHON et al., 2006). A subfamília ABCB é composta por 4 membros sendo que dentre elas a MDR1 (ABCB4) de *Leishmania* spp., homóloga a MDR1 de mamíferos, confere resistência à drogas hidrofóbicas como a vinblastina, a daunomicina e a puromicina (HENDERSON et al., 1992; CHOW et al., 1993; WONG; CHOW; WIRTH,

1994; GUEIROS-FILHO et al., 1995; CHIQUEIRO et al., 1998; KATAKURA et al., 1999) e resistência cruzada à miltefosina e à edelfosina (PEREZ-VICTORIA et al., 2001a). Parasitas resistentes a esses compostos apresentam esse gene amplificado e superexpresso em DNAs circulares extracromossomais de tamanho de 25 a 48 kb (círculo V) (HENDERSON et al., 1992; PEREZ-VICTORIA et al., 2001b). Além da MDR1, a superexpressão da MDR2 (ABCB2) promove um decréscimo na acumulação de 5-fluorouracil in *L. amazonensis* (KATAKURA et al., 2004). Outros dois membros da subfamília ABCA já caracterizados, a LtrABC1.1 (ABCA8) e a LtrABCA2 (ABCA4) não estão envolvidos na resistência à drogas e estão associados ao transporte de fosfolipídios (PARODI-TALICE et al., 2003; ARAUJO-SANTOS et al., 2005). Recentemente, um membro da subfamília ABCG, o primeiro dessa subfamília também associado a resistência à drogas, foi descrito como capaz de também conferir resistência à miltefosina em *L. infantum* (CASTANYS-MUÑOZ et al., 2007). Esses dados indicam uma função importante dos transportadores ABC na suscetibilidade e resistência às drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses (LEANDRO; CAMPINO, 2003). O fenótipo de resistência conferido por esses transportadores foi observado principalmente na forma promastigota do parasita e não na amastigota, forma esta do ciclo evolutivo do parasita em que ele é tratado com a droga. Porém, El Fadili et al. (2005) observaram que formas promastigotas transfectadas com o gene *MRPA*, infectam e sobrevivem dentro de macrófagos e são resistentes aos antimoniais. Resultados similares foram observados com isolados de pacientes resistentes aos antimonias de *L. donovani* que apresentaram o gene *MRPA* amplificado e superexpresso (MUKHERJEE et al., 2007).

O uso de inibidores clássicos como, por exemplo, o verapamil e a quinidina são capazes de reverter a resistência à drogas mediada pelos transportadores ABC tanto

de células de mamíferos quanto em células de *Plasmodium falciparum* (ENDICOTT; LING, 1989; GOTTESMAN; PASTAN, 1993). As proteínas pertencentes a esta família de transportadores descritas até então em *Leishmania* spp., e envolvidas na resistência à drogas não têm sua resistência revertida por esses inibidores, como foi o caso da MRPA de *L. major* (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991) e da MDR1 de *L. donovani* (HENDERSON et al., 1992). Apenas os parasitas transfectados que superexpressam a PRP1 tiveram sua resistência revertida quando tratados com concentrações não tóxicas de verapamil (COELHO, 2002). Além dos inibidores clássicos dos transportadores ABC, alguns flavonóides e sesquiterpenos foram descritos como capazes de reverter a resistência mediada pela MDR1 em *Leishmania* (PÉREZ-VICTORIA et al., 2001a; PÉREZ-VICTORIA et al., 2001b; PÉREZ-VICTORIA et al., 2002; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006b).

Tabela 1. Proteínas ABC de *L. major* segundo LEPROHON et al. (2006) (modificado).

Nomenclatura gênica	Gene e cromossomo em <i>L. major</i>	“Apelido” do transportador ABC em <i>Leishmania</i> spp.	Topologia gênica	Função (resistência)	Seqüências ortólogas em <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>
ABCA1	LmjF2.0300 (2)		[TM-NBD] ₂		
ABCA2	LmjF11.1220 (11)		[TM-NBD] ₂		
ABCA3	LmjF11.1240 (11)		[TM-NBD] ₂		
ABCA4	LmjF11.1250 (11)	LtrABCA2 ^a	[TM-NBD] ₂		
ABCA5	LmjF11.1270 (11)		[TM-NBD] ₂		
ABCA6	LmjF11.1290 (11)		[TM-NBD] ₂		
ABCA7	LmjF15.0760 (15)		[TM-NBD] ₂		
ABCA8	LmjF27.0970 (27)	LtrABC1.1 ^b	[TM-NBD] ₂		
ABCA9	LmjF27.0980 (27)		[TM-NBD] ₂		
ABCA10	LmjF29.0620 (29)		[TM-NBD] ₂		Sim
ABCB1	LmjF25.0530 (25)		TM-NBD		Sim
ABCB2	LmjF26.2670 (26)	MDR2 ^c	[TM-NBD] ₂	Sim	
ABCB3	LmjF32.3080 (32)		TM-NBD		Sim
ABCB4	LmjF34.0990 (34)	MDR1 ^{d, e, f}	[TM-NBD] ₂	Sim	
ABCC1	LmjF23.0210 (23)	PGPC ^g	[TM-NBD] ₂		
ABCC2	LmjF23.0220 (23)	PGPB ^g	[TM-NBD] ₂		
ABCC3	LmjF23.0250 (23)	MRPA ^{g, h, i}	[TM-NBD] ₂	Sim	
ABCC4	LmjF31.1270 (31)	PGPE ^g	[TM-NBD] ₂		
ABCC5	LmjF31.1280 (31)	PGPD ^g	[TM-NBD] ₂		
ABCC6	LmjF31.1290 (31)		[TM-NBD] ₂		
ABCC7	LmjF31.1430 (31)	PRP1 ^j	[TM-NBD] ₂	Sim	
ABCC8	LmjF34.0670 (34)		[TM-NBD] ₂		
ABCD1	LmjF27.0470 (27)		TM-NBD		Sim
ABCD2	LmjF31.0540 (31)		TM-NBD		Sim
ABCD3	LmjF33.1860 (33)		TM-NBD		Sim
ABCE1	LmjF21.0710 (21)		[NBD] ₂		Sim
ABCF1	LmjF3.0160 (3)		[NBD] ₂		Sim
ABCF2	LmjF19.0800 (19)		[NBD] ₂		Sim
ABCF3	LmjF33.0310 (33)		[NBD] ₂		Sim
ABCG1	LmjF6.0080 (6)		NBD-TM		
ABCG2	LmjF6.0090 (6)		NBD-TM		
ABCG3	LmjF6.0100 (6)		NBD-TM		
ABCG4	LmjF15.0890 (15)	LiABCG4 ^l	NBD-TM	Sim	Sim
ABCG5	LmjF23.0380 (23)		NBD-TM		Sim
ABCG6	LmjF36.2890 (36)		NBD-TM		Sim

Continua na próxima página.

Tabela 1. Continuação.

Nomenclatura gênica	Gene e cromossomo em <i>L. major</i>	“Apelido” do transportador ABC em <i>Leishmania</i> spp.	Topologia gênica	Função (resistência)	Seqüências ortólogas em <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>
ABCH1	LmjF11.0040 (11)		NBD		Sim
ABCH2	LmjF29.1640 (29)		NBD		Sim
ABCH3	LmjF30.1330 (30)		NBD		Sim
Outros	LmjF12.1190 (12)		NBD		Sim
Outros	LmjF32.2060 (32)		TM-NBD		
Outros	LmjF33.3040 (33)		NBD		Sim
Outros	LmjF33.3260 (33)		NBD		Sim

Os nomes das subfamílias estão de acordo com a nomenclatura HUGO (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature). O número de acesso dos genes foram obtidos do banco de dados do GeneDB (www.genedb.org) e a localização do gene nos cromossomos de *L. major* está indicado em parênteses. Os nomes dos genes já estudados em *Leishmania* estão incluídos na terceira coluna. O envolvimento do respectivo transportador ABC na resistência à drogas em *Leishmania* é indicado na penúltima coluna por “Sim”. Potenciais seqüências ortólogas entre os tripanossomatídeos *T. brucei* e *T. cruzi* e *Leishmania* são indicados por “Sim” na última coluna. Legenda: TM, domínio transmembrana; NBD, domínio de ligação de nucleotídeo.

^a (ARAUJO-SANTOS et al., 2005);

^b (PARODI-TALICE et al., 2003);

^c (KATAKURA et al., 2004);

^d (HENDERSON et al., 1992);

^e (HENDRICKSON et al., 1993);

^f (PEREZ-VICTORIA et al., 2001a).

^g (LÉGARÉ; HETTEMA; OUELLETTE, 1994);

^h (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991);

ⁱ (PAPADOPOULOU et al., 1994);

^j (COELHO; BEVERLEY; COTRIM, 2003);

^l (CASTANYS-MUÑOZ et al., 2007).

2 Objetivos

Objetivo geral:

Determinar a função do transportador ABC PRP1 (ABCC7) na resistência à pentamidina em formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. em transfectantes que superexpressam tal gene assim como determinar se em mutantes resistentes à pentamidina esse transportador exerce papel importante na resistência.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar molecularmente o gene *PRP1*;
- 2) Determinar a localização celular da PRP1 em formas promastigotas e amastigotas axênicas;
- 3) Determinar o papel desse transportador ABC na resistência à pentamidina em formas promastigotas e amastigotas assim como na resistência cruzada a outros compostos anti-*Leishmania*;
- 4) Isolar e caracterizar mutantes resistentes à pentamidina de *Leishmania*;
- 5) Verificar se o transportador ABC PRP1 exerce algum papel na resistência à pentamidina em mutantes resistentes a esse composto.

3 Material e Métodos

3.1 Organismos

Leishmania (Leishmania) major cepa Friedlin A1 (MHOM/IL/1980/Friedlin).

Leishmania (Leishmania) major cepa LV39.

Leishmania (Leishmania) amazonensis (MHOM/BR/1973/M2269).

Leishmania (Leishmania) chagasi (MCER/BR/1981/M6445).

Leishmania (Leishmania) infantum (MHOM/MA/67/ITMAP-263).

Leishmania (Viannia) braziliensis (MHOM/BR/1975/M2903).

Escherichia coli [DH5- α].

Escherichia coli [DH10- β].

3.2 Soluções, tampões e meios de cultura

3.2.1 Soluções e tampões

EPB (Tampão de eletroporação): 21 mM de HEPES (pH 7,5); 137 mM de NaCl; 5 mM de KCl; 0,7 mM de Na₂HPO₄; 6 mM de glicose.

PBS: 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM de Na₂HPO₄.7H₂O; 1,4 mM de KH₂PO₄; pH 7,3.

TAE 1x: 40 mM de Tris acetato; 2 mM de EDTA.

TBE 1x: 0,1 M de Tris; 83 mM de Ácido Bórico; 1 mM de EDTA.

TE RNase: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM de EDTA (pH 8,0); 10 µg/mL de RNase.

TE: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM de EDTA (pH 8,0).

3.2.2 Meios de cultura para bactérias

LB (Luria Bertani) líquido: 10 g/L de bacto triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl (pH 7,2). Esterilizado por autoclavação.

LB sólido: LB líquido contendo 15 g/L de ágar bacteriológico. Esterilizado por autoclavação.

LBA líquido: LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para seleção das bactérias recombinantes.

LBA super caldo: 35 g/L de bacto triptona; 20 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl (pH 7,2). Esterilizado por autoclavação. Após a esterilização era adicionado ampicilina numa concentração final de 100 µg/mL.

LBA sólido: LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina.

TSB (Tampão de transformação e estocagem): 10 g/L de bacto triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl (LB – pH 6,1); 10% de PEG (PM 8.000) (m/v); 5% de DMSO (v/v); 10 mM de MgCl₂; 10 mM de MgSO₄. Esterilizado por filtração.

TSB glicose: TSB contendo 20 mM de glicose.

3.2.3 Meio de cultura para *Leishmania* spp.

M199: contendo soro fetal bovino 10%, previamente inativado por uma hora a 56°C e suplementado com 100 µM de adenina; 40 mM de HEPES (pH 7,4); 10 µg/mL de hemina; 50 U/mL de penicilina; 50 µg/mL de estreptomicina; 4 µM de biotina (KAPLER; COBURN; BEVERLEY, 1990). Esterilizado por filtração. Utilizado

para o cultivo de formas promastigotas de *Leishmania* spp. Para o cultivo de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, o meio descrito foi suplementado com 2% de urina humana (ARMSTRONG, PATTERSON, 1994).

SDM-79: contendo 10% de soro fetal bovino previamente inativado por uma hora a 56°C e suplementado conforme previamente descrito (BRUN; SCHÖNENBERGER, 1979). Utilizado para o cultivo de formas promastigotas de *L. infantum* e *L. major* (LV39).

MAA/20: é constituído de uma modificação do meio M199 com sais de Hanks', suplementado com 0,5% de tripto caseína de soja, 0,01 mM de ácido bactocuproinedisulfônico, 3 mM de L-cisteína, 15 mM de D-glicose, 5 mM de L-glutamina, 4 mM de NaHCO₃, 0,023 mM de hemina bovina e 25 mM de HEPES em um pH final de 5,5 e 20% de soro fetal bovino (SERENO; LEMESRE, 1997a). Utilizado para o cultivo de formas amastigotas axênicas de *L. infantum*.

RPMI 1640: suplementado com 10% de soro fetal bovino previamente inativado por uma hora a 56 °C, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

3.3 Vetores

Os vetores utilizados foram os *shuttle vectors* cLHYG, pSNBR, pXG-/GFP+ e pSP1.2LUCαHYGα capazes de se propagar tanto em *Leishmania* spp. quanto em *E. coli* (RYAN, DASGUPTA, BEVERLEY, 1993; HA et al., 1996; ROY et al., 2000). Tais vetores possuem como genes marcadores de resistência à antibióticos, o gene higromicina fosfotransferase (*HYG*) que confere resistência à higromicina B no

cLHYG (CRUZ, COBURN, BEVERLEY, 1991) e no pSP1.2LUC α HYG α (ROY et al., 2000) ou o gene neomicina fosfotransferase (*NEO*) que confere resistência ao antibiótico G418 (neomicina) no pSNBR (CRUZ, BEVERLEY, 1990) e no pXG-/GFP+ (HA et al., 1996) ambos os marcadores para seleção em *Leishmania* spp. Esses vetores são capazes de se replicar e se manter extracromossomalmente após transfecção e podem ser induzidos a amplificar seu número de cópias após passagens sucessivas em concentrações crescentes dos respectivos aminoglicosídeos (KAPLER, COBURN, BEVERLEY, 1990; LEBOWITZ et al., 1990; RYAN, DASGUPTA, BEVERLEY, 1993). Para os transfectantes contendo o vetor cLHYG foram utilizadas concentrações crescentes de 25, 50, 100, 250 e 500 μ g/mL de higromicina B e para o pSNBR concentrações de 6, 12, 25, 50, 100 e 200 μ g/mL de G418. Os vetores descritos acima contêm ainda uma origem de replicação e um gene marcador de resistência à ampicilina para propagação em *E. coli*.

Para a localização celular da PRP1, o vetor pXG-/GFP+ (HA et al., 1996), gentilmente cedido pelo Prof. Stephen M. Beverley, foi utilizado para a fusão gênica do gene *PRP1* com o gene *GFP* (Green Fluorescent Protein). Ainda foi utilizado o vetor pXGFP5 (S65T) (GUEVARA et al., 2001) que expressa o gene *GFP* em *Leishmania* spp. utilizando o promotor ribossomal de *L. amazonensis* (ULIANA et al., 1996). Os transfectantes para esse vetor apresentam a GFP distribuída por todo o citoplasma do parasito. Ambos os vetores possuem ainda o gene neomicina fosfotransferase (*NEO*) que confere resistência ao antibiótico G418 para seleção dos parasitos transfectados.

Para a análise de viabilidade e quantificação de formas amastigotas de *Leishmania*, formas promastigotas dos parasitos foram transfectados com o vetor pSP1.2LUC α HYG α , sendo então utilizados na infecção de macrófagos THP-1. Este

plasmídeo contém o gene reporter de vaga-lume luciferase além do gene de resistência higromicina B fosfotransferase para seleção dos parasitos transfectados. (ROY et al., 2000).

3.4 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência a compostos anti-*Leishmania*

3.4.1 Drogas

As drogas utilizadas foram: pentamidina, verapamil, vinblastina, ciclosporina A e os antimoniais trivalentes [Sb(III)], SbCl_3 e potássio de antimônio tártaro trihidratado (PATH), todos da Sigma; miltefosina da Zentaris/ASTA Medica AG e Glucantime da Rhodia.

3.4.2 Cultivo de *Leishmania* spp.

As formas promastigotas de *Leishmania* spp. foram mantidas *in vitro* em meio de cultura M199 ou SDM-79 e incubadas em estufa a 26 °C em frascos de 25 cm³ contendo 5 a 10 mL de meio de cultura ou em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura. Para a análise da inibição do crescimento *in vitro*, cerca de 5×10^5 parasitos eram incubados separadamente em concentrações crescentes da droga em estudo, além de uma incubação em ausência da droga. Após um período de 48 a 72 horas, amostras das culturas eram retiradas para a contagem em Câmara de

Neubauer em diluições de 1:10 e/ou 1:20 ou medindo a absorbância de amostras das culturas a 600 nm (OUELLETTE; FASE-FOWLER; BORST, 1990).

As formas amastigotas axênicas de *L. infantum* foram mantidas *in vitro* em meio de cultura MAA/20 (SERENO; LEMESRE, 1997a). Estas foram mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂ por passagens semanais em garrafa de 25 cm² com 5 mL do meio MAA/20. Para a análise da inibição do crescimento *in vitro*, cerca de 5x10⁵ parasitos eram incubados separadamente em concentrações crescentes da droga em estudo, além de uma incubação em ausência da droga. Após um período de 96 a 120 horas, amostras das culturas eram retiradas, medindo-se a absorbância das culturas a 600 nm (OUELLETTE; FASE-FOWLER; BORST, 1990).

Os macrófagos THP-1 cultivados em RPMI 1640 foram inicialmente plaqueados em placas de 24 poços na quantidade de 200.000 células por poço e diferenciados através da incubação por 2 dias com 20 ng/mL de forbol miristato de acetato. Após esse período, as células foram lavadas uma vez com RPMI e infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de crescimento na proporção parasita/macrófago de 15:1. Após 2-3 horas de infecção, parasitas não internalizados foram removidos através de 3 lavagens com EPB e então a droga a ser analisada foi adicionada juntamente ao meio de cultura. Para as infecções com *L. amazonensis* a cultura foi mantida em estufa a 34 °C em atmosfera de 5% de CO₂ enquanto que para as infecções com *L. major* (LV39) e *L. infantum* as culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Para a análise da inibição do crescimento as formas amastigotas intracelulares transfectadas com o gene da luciferase (plasmídeo pSP1.2LUC α HYG α) tiveram a atividade da enzima determinado após 4 a 5 dias de infecção. O meio de cultura foi removido e adicionado então 100 μ L de Tampão de Lise por poço (125 mM de Tris-fosfato [pH

7,8]; 10 mM de DTT; 5% de Triton X-100; 50% de glicerol). Após ressuspensão dos macrófagos infectados, a placa era incubada por 1 hora a -80 ° C antes da leitura no luminômetro (Dynex MLX Microtiter Plate luminometer) que utilizava 100 µL do seguinte tampão de reação (20 mM de Tricina; 1,07 mM de $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2,67 mM de MgSO_4 ; 0,1 mM de EDTA; 220 µM de coenzima A; 4,07 µM de sal de potássio D-luciferina; 530 µM de ATP; 33,3 mM de DTT) juntamente com uma alíquota de 20 µL do lisado de macrófagos infectados de cada poço (ROY et al., 2000). A atividade da luciferase era expressa em unidades relativa de luz (RLU).

Para os estudos de reversão da resistência à pentamidina, utilizou-se o verapamil. As curvas de inibição de crescimento foram realizadas conforme descrito acima. Incubou-se os parasitos separadamente em concentrações crescentes de pentamidina associado a uma concentração constante e não tóxica de verapamil. Esta concentração de verapamil foi determinada através de uma curva de inibição de crescimento com as diferentes espécies do parasito conforme descrito acima. A concentração não tóxica é aquela incapaz de inibir a taxa de crescimento quando comparada com as células controle não tratadas.

3.4.3 Purificação de formas amastigotas de *L. amazonensis* de lesão de camundongo BALB/c

Formas amastigotas foram obtidas de lesão do coxim plantar traseiro de camundongos BALB/c. Após o sacrifício por deslocamento cervical, a pata foi removida deixada em álcool iodado por 10 minutos. A lesão foi devidamente limpa retirando as partes necrosadas, passada para M199, macerada, filtrada em gaze

estéril e o conteúdo passado 4 a 5 vezes em agulha para lise dos macrófagos. A suspensão foi centrifugada a 1.000xg a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante coletado e centrifugado a 2.500xg a 4 °C por 30 minutos. O sedimento celular foi ressuspenso com M199 e uma amostra da ressusensão era corado com violeta cristal e contado em câmara de Newbauer. Cerca de 1×10^7 parasitos eram inoculados na pata dos camundongos.

3.4.4 Transfecção por eletroporação em *Leishmania* spp.

Este processo foi baseado no protocolo descrito por Kapler, Coburn e Beverley (1990); Beverley e Clayton (1993) e Descoteaux et al. (1994). Para cada transfecção gênica eram utilizadas 4×10^7 promastigotas em fase logarítmica de crescimento e 10 a 20 µg de DNA a ser transfectado. As células eram centrifugadas por 10 minutos a 1.680xg e o sedimento celular ressuspenso com 10 mL de EPB. A centrifugação era repetida e o sedimento celular era ressuspenso novamente com EPB na densidade de $5 \cdot 10^7$ /mL. Desta suspensão celular eram transferidos 0,8 mL para cada cubeta de transfecção de 0,8 cm³ (Bio-Rad) (mantida no gelo) já contendo o DNA a ser transfectado. O aparelho utilizado para tal procedimento foi o Gene Pulser II (Bio-Rad), regulado para voltagem e capacitância de 500 KV/cm e 500 µF respectivamente. Após 10 minutos de incubação no gelo, os parasitas eram transferidos para um frasco de cultura de células contendo 10 mL de meio M199 ou SDM-79 e cultivados por cerca de 18 a 24 horas a 26 °C. Após esse período de incubação, os parasitas eram centrifugados por 10 minutos a 1.680xg. O sobrenadante era descartado e o sedimento celular ressuspenso com o

sobrenadante residual. As células ressuspensas foram transferidas para 10 mL de M199 ou SDM-79 contendo o antibiótico de seleção de acordo com o vetor utilizado.

3.4.5 Análise de dados

Para cada linhagem do parasito testada, foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes. Através do número de parasitos vivos ou a absorbância das culturas, os valores eram transformados para valores percentuais, considerando um crescimento de 100% a cultura cultivada em ausência de droga. Com o número de parasitas corrigidos, estes valores eram utilizados na elaboração de curvas de inibição de crescimento em que determinava-se o valor de IC_{50} (concentração de droga necessária para inibir o crescimento celular em 50%) para cada experimento independente. A média e o desvio padrão dos valores de IC_{50} de um número (n) experimentos eram calculados para cada linhagem testada. A razão de resistência foi o parâmetro utilizado para os testes estatísticos de resistência à droga, parâmetro este, definido pela razão do valor do IC_{50} da linhagem estudada pelo IC_{50} das células controle medido em um mesmo experimento de um número (n) de experimentos. Valores diferentes dos parasitos controle (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3.5 Identificação de genes da família de transportadores ABC de *Leishmania* spp.

3.5.1 PCR

Para a identificação de genes da família de transportadores ABC foram utilizados iniciadores degenerados baseados nas seqüências que codificam os motivos Walker A/B relacionados com a ligação de ATP (*Nucleotide Binding Domain*). Foram desenhados iniciadores baseados no gene *PRP1* de *L. major* (GenBank accession number AY251609) e outros membros da subfamília ABCC de *Leishmania* spp: *PGPE* de *L. tropica* (U55381); *PGPB* de *L. tarentolae* (L29484); *PGPE* de *L. tarentolae* (L29485) e *PGP2* de *T. cruzi* (Z49222). Os iniciadores degenerados baseados no gene *PRP1* foram: NBD1F 5' GCG gaa ttc CYG CGM GSR MRG YTG ACR GTK GTG 3' e NBD1R 5' GCG gtc gac MGT SGC YAG CAC GCG CGT CTT GCC 3'. Os iniciadores descritos anteriormente contêm os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *SaI* respectivamente (representados em letras minúsculas) com o intuito de facilitar a clonagem dos fragmentos amplificados no vetor pUC19.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,8; 50 mM de KCl; 1,0 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cada primer utilizado; 0,05 U/µL de Taq DNA polimerase (Amershan Pharmacia ou Fermentas) e cerca de 100 ng de DNA genômico de *Leishmania* spp. Sobre a reação foram ainda adicionados cerca de 30 µL de óleo mineral. As amostras foram amplificadas em um Termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.)

com as seguintes condições de reação: 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos seguido de um ciclo final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose e purificados com o kit GeneClean (Bio 101 Inc.). Os produtos purificados foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *SaI* e então ligados no plasmídeo pUC19 também digerido com as mesmas enzimas. Alguns fragmentos obtidos através da PCR continham sítios para as enzimas descritas acima e foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) conforme as instruções do fabricante.

3.5.2 Ligação dos fragmentos de DNA amplificados em vetor específico

Para ligação foi utilizado 100 ng de DNA do vetor pUC19 e 300 ng do produto de DNA amplificado ambos previamente digeridos com as enzimas *EcoRI* e *SaI*, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e 2 µL do tampão de reação da enzima T4 DNA ligase 5x (250 mM de Tris-HCl [pH 7,6]; 50 mM de MgCl₂; 5 mM de ATP; 5 mM de DTT; 25% de PEG-8000 [m/v]) para um volume final de 10 µL. A suspensão foi incubada por 12 horas a 14 °C. Após este período, o produto de ligação era utilizado na transformação de bactérias.

3.5.3 Processo de transformação em bactérias

O processo utilizado foi baseado no protocolo descrito por Chung e Miller (1988) com algumas modificações no processo que torna as bactérias competentes. A bactéria utilizada na transformação foi a *E. coli* (DH10-β). Inicialmente, preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia da bactéria DH10-β em 5 mL de meio LB,

e após 14 horas de incubação a 37 °C, a cultura foi diluída 1/100 em LB. Após mais 2 horas de incubação na mesma temperatura, esta nova cultura foi centrifugada a 1.000xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspensa em 1/10 do volume total com TSB gelado. Cerca de 100 µL desta suspensão bacteriana gelada era adicionada a pelo menos 10 ng de cada DNA a ser transformado. A suspensão contendo o DNA era mantida no gelo por um período de 30 minutos sendo adicionado em seguida 900 µL de TSB glicose incubando por 2 horas a 37 °C com agitação constante. Após a centrifugação da cultura a 2.650xg por 1 minuto, esta foi plaqueada em placa de Petri contendo LBA sólido e incubada por 12-18 horas a 37 °C.

Alternativamente bactérias competentes foram preparadas com cloreto de cálcio e transformadas conforme protocolo descrito (SAMBROOK; FRITISH; MANIATIS, 1989).

3.5.4 Extração do DNA do plasmídeo de culturas de *E. coli*

Inicialmente, coletava-se uma colônia recombinante da placa de Petri contendo o produto de transformação do item anterior. Cada colônia era inoculada em um tubo com 4 mL de LBA líquido, sendo incubado a 37 °C sob agitação constante durante 14 horas. Após a incubação, as células em suspensão eram centrifugadas a 1.300xg durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células eram ressuspensas em 100 µL da solução contendo 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA (pH 8,0) e 50 mM de glicose e transferidas para um tubo de microcentrífuga, onde eram adicionados 200 µL da solução de NaOH 0,2 M; SDS 1%. Homogeneizava-se por inversão e incubava-se a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos. A seguir,

adicionava-se 200 µL de solução de ácido acético glacial 6 M e acetato de potássio 3 M e incubava-se no gelo durante 25 minutos. A suspensão era centrifugada a 13°C a 16.100xg durante 8 minutos, sendo que cerca de 400 µL do sobrenadante era transferido para outro tubo contendo 300 µL de isopropanol. Centrifugava-se novamente a 13 °C a 16.100xg durante 8 minutos. O DNA precipitado era lavado com 500 µL etanol 70% (v/v em água bidestilada, deionizada e autoclavada) e centrifugado durante 8 minutos a 16.100xg a 13 °C. O sobrenadante era removido e o tubo contendo o DNA precipitado era seco em estufa a 42 °C durante 30 minutos. Após esse período, o DNA era finalmente ressuspensão em 40 µL de TE RNase e incubado por 30 minutos a 37 °C.

3.5.5 Digestão dos DNAs dos plasmídeos com enzimas de restrição

Uma vez isolados, os DNAs eram submetidos a digestões totais com as enzimas de restrição. Para a digestão, era utilizado cerca de 1 a 5 µg do DNA obtido da etapa anterior, 1 µL da enzima de restrição a ser utilizada (10 U/µL) (Fermentas), 1 µL do tampão de reação 10x apropriado da enzima utilizada e água bidestilada, deionizada e autoclavada, para um volume final de 10 µL. As digestões foram processadas sempre em um período de 4 horas a temperatura adequada conforme orientação do fabricante. Digestões duplas foram processadas nas mesmas condições das descritas acima em digestões simples, porém foi utilizado um tampão compatível com as duas enzimas selecionadas. Os DNAs digeridos com as enzimas selecionadas eram analisados através de uma eletroforese em gel de agarose.

3.5.6 Eletroforese em gel de agarose

Foi utilizada agarose (Invitrogen) dissolvida em tampão de corrida TAE 1x ou TBE 1x que era solubilizada através do aquecimento em forno microondas. A todas as amostras foi adicionado tampão de amostra de DNA (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). Os padrões de peso molecular utilizados foram o DNA do bacteriófago Lambda (λ) digerido com *Hind* III (Invitrogen) apresentando os seguintes fragmentos de DNA em quilobase (kb): 23,1; 9,4; 6,5; 4,4; 2,3; 2,0 e 0,6, o 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) contendo os seguintes fragmentos em kb: 12; 11; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1,65; 1; 0,85; 0,65; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 ou o O'Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) que contém os seguintes fragmentos em kb: 3,0; 2,0; 1,5; 1,2; 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem e tempo de acordo com o produto a ser analisado. A seguir, o gel era corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) durante 15 minutos ao abrigo de luz. O padrão de bandas obtido era analisado em transiluminador sob fonte de luz UV e o gel fotografado em sistema de documentação fotográfico Polaroid DS34 com filme 667 ou em Câmera Digital Nikon Coolpix 4300.

3.5.7 Seqüenciamento de nucleotídeos

O seqüenciamento foi processado em um seqüenciador automático modelo MegaBACE 1000 (GE Healthcare), em conjunto com o kit DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare), que utiliza processos de química fluorescente para a leitura dos resultados. As condições de reação são fornecidas pelo fabricante e o

método de seqüenciamento segue o processo clássico dos dideoxirribonucleotídeos descrito originalmente por Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

A análise das seqüências foram feitas utilizando os programas DNASTar (Madison, WI) e Clone Manager 6TM e via rede de computadores no *GenBank* através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) no sítio (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), no sítio do Projeto Genoma de *Leishmania major* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/index.shtml), *Leishmania infantum* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_infantum/index.shtml) e no GeneDB (<http://www.genedb.org/>).

3.6 Análise da organização genômica do gene *PRP1* em *Leishmania* spp.

3.6.1 Isolamento de DNA genômico de *Leishmania* spp.

Foi utilizado o protocolo descrito por Medina-Acosta e Cross (1993). Centrifugava-se 1×10^8 células de *L. major* (Friedlin A1) por 10 minutos 1.360xg. O sedimento celular era ressuspenso em 150 µl de TELT (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 62,5 mM de EDTA, pH 9,0, 2,5 M de LiCl, 4% de Triton X-100). Após 5 minutos de incubação, foi adicionado 150 µL de fenol-clorofórmio (v/v) agitando durante 5 minutos. Centrifugava-se a 13.000xg por 5 minutos e a fase superior era transferida para um tubo contendo 300 µL de etanol absoluto. Incubava-se por 5 minutos a temperatura ambiente e então centrifugava-se a 13.000xg por 10 minutos. Descartava-se o sobrenadante e o DNA seco a temperatura ambiente era dissolvido

em 100 µl de TE RNase incubando a amostra a 37 °C por 1 hora e depois armazenado a 4 °C. Alternativamente a extração do DNA genômico de *Leishmania* spp. foi feita através do DNAzol (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante.

3.6.2 Marcação radioativa de fragmentos de DNA

Para o isolamento do fragmento de DNA, este foi digerido com a enzima de restrição de interesse e após a corrida eletroforética da amostra em gel de agarose, purificou-se o fragmento utilizando o kit Gene Clean II (Bio 101, Inc). Para a marcação foi utilizado o kit Rediprime II DNA Labelling System (GE Healthcare) e α -P³²dCTP conforme as instruções do fabricante. Os nucleotídeos radioativos não incorporados foram removidos com o kit ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (GE Healthcare).

3.6.3 Southern blot

Utilizou-se o protocolo descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Cerca de 10 µg de DNA genômico de *Leishmania* spp. foi digerido com a enzima de restrição de interesse conforme descrito no item 3.5.5 de Material e Métodos. Após eletroforese em gel de agarose, este foi corado com brometo de etídio, analisado em luz UV e fotografado. O gel foi transferido para uma cuba e tratado com as seguintes soluções: depurinação (0,2 N de HCl) por 30 minutos, desnaturação (0,5 M de NaOH; 1,5M de NaCl) por 2 vezes durante 20 minutos e neutralização (1,5 M de Tris-HCl [pH 7,0]; 0,5 M de NaCl) por 2 vezes durante 20 minutos. Entre as mudanças de solução, o gel era enxaguado com H₂O destilada. O gel era então

transferido para uma pilha de papel 3MM molhado com SSC 20x (175,3 g/L de NaCl e 88,2 g/L de citrato de sódio). A membrana de náilon era colocada sobre o gel e depois papel 3 MM e papel toalha. Sob a pilha de papel era colocado um peso de cerca de 0,4 kg para aumentar a eficiência da transferência do DNA para a membrana permanecendo por 14 a 18 horas. Após a transferência, fez-se o “*cross-linking*” no aparelho GS Gene Linker UV chamber (Bio-Rad) para a fixação do DNA na membrana.

Para a hibridização, a membrana era incubada com a solução de hibridização (SSC 6X, 0,5% de SDS [m/v], 100 µg/ml de DNA de espermatozoides de salmão, Denhardt's 5x [0,1% de Ficoll (m/v); 0,1% de polivinilpirrolidona (m/v); 0,1% de BSA (m/v)]) a 68°C por 1-2 horas. Após este período a sonda desnaturada a 100 °C por 5 minutos era diluída na solução de hibridização a 68 °C e a membrana incubada por 12 a 18 horas. A solução de hibridização era descartada e lavava-se a membrana de náilon com agitação com solução SSC 2x e 0,1% de SDS a temperatura ambiente por 15 minutos seguida por 3 lavagens de SSC 0,1X, 0,1% de SDS a 65 °C por 15 minutos. A membrana era envolta em filme plástico e exposta a um filme autorradiográfico.

3.7 Análise dos transcritos do gene *PRP1*

3.7.1 Isolamento de RNA total de *Leishmania* spp.

O RNA total dos parasitos foi isolado com fenol/guanidina isotiocianato (Trizol) (Invitrogen). Cerca de 1×10^8 células foram utilizadas para 1 mL de Trizol. Estas eram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, 200

μL de clorofórmio eram adicionados e a amostra era centrifugada 12.000xg por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa era transferida a um novo tubo contendo 500 μL de isopropanol gelado sendo incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugava-se a 12.000xg por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante era descartado e o RNA precipitado lavado com etanol 75%. Misturava-se as amostras no vórtex e centrifugava-se a 7.500xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante era descartado e o RNA seco a temperatura ambiente. Em seguida, ressuspensava-se em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) e a seguir a amostra era armazenada em freezer -80 °C.

Para as amostras de RNA utilizadas em ensaios de PCR em tempo real, o RNA dos parasitos foi purificado através do kit RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) segundo as instruções do fabricante e então analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent).

3.7.2 Northern blot

Foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook, Fritish e Maniatis (1989). Cerca de 15 a 20 μg de RNA total (4,5 μL) foram misturados com 2 μL de tampão de corrida 5x (0,1 M de MOPS [pH 7,0]; 40 mM de acetato de sódio; 5 mM de EDTA [pH 8,0]), 3,5 μL de formaldeído 12,3 M e 10 μL de formamida deionizada (Gibco-BRL). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 65 °C e então colocadas no gelo. A cada amostra foi adicionado tampão de amostra para RNA (50% de glicerol; 1 mM de EDTA, pH 8,0; 0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol). O padrão de peso molecular utilizado foi o RNA ladder (Invitrogen). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% dissolvido em água tratada com 0,1% de DEPC contendo uma concentração final de formaldeído 2,2 M e tampão de corrida 1x

(como descrito acima). As amostras foram submetidas a uma corrida de 80 V por 1 hora. Em seguida, o gel foi tratado com acetato de amônio 0,1 M e corado com brometo de etídio. O gel foi fotografado e então enxaguado com água tratada com DEPC para remoção do formaldeído. O gel era então transferido para uma pilha de papel 3 MM molhado com SSC 20x. A membrana de náilon (Gibco-BRL) era colocada sobre o gel e depois papel 3MM e papel toalha. Sob a pilha de papel era colocado um peso de cerca de 0,4 kg para aumentar a eficiência da transferência do RNA para a membrana ficando por 14 a 18 horas. Após a transferência, fez-se o “*cross-linking*” no aparelho GS Gene Linker UV chamber (Bio-Rad) para a fixação do RNA na membrana.

Para a hibridização com sonda marcada radioativamente (conforme descrito no item 3.6.2), a membrana era colocada em saco plástico devidamente vedado contendo solução de pré-hibridização (SSC 5X, 0,1%, de SDS Denhardt's 2x, 50% de formamida) e incubado a 42 °C por um mínimo de 4 horas. Após este período a sonda previamente incubada a 100 °C por 10 minutos era colocada no saco plástico que era então devidamente vedado incubando a membrana em banho a 42 °C por 16 a 24 horas. A solução de hibridização era descartada e lavava-se a membrana com agitação em solução de SSC 1x, SDS 0,1% a temperatura ambiente por 20 minutos seguida por 3 lavagens de 20 minutos cada de SSC 0,2x, SDS 0,1% a 68°C. A membrana era envolta em filme plástico e exposta a um filme autorradiográfico.

3.7.3 RT-PCR

Para o mapeamento dos sítios de trans-splicing e poliadenilação do RNAm do gene *PRP1* foi utilizado RNA total isolado de células selvagens de *L. major* e de células transfectadas com os cosmídeos cosPen1-A e pSNBR/8kb *Sma* I-A.

Para o mapeamento do sítio de trans-splicing, 2-5 µg de RNA total foi combinado com água DEPC e 1 µL do iniciador (10 µM) *PRP15'2*, 5' TGA CAG CTC GTT CAC AGC 3' para uma mistura de 11 µL que foi incubada a 65 °C por 5 minutos. Este iniciador é *antisense* e corresponde a região 5' do gene *PRP1* (região amino terminal). Em seguida, a mistura foi incubada no gelo por 5 minutos e adicionou-se 4 µL de First-Strand Buffer 5x (250 mM de Tris-HCl, 375 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂), 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de dNTPs (10 mM de cada nucleotídeo dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µL de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µL) (Invitrogen) e 1 µL de Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/µL) (Invitrogen) para um volume final de 20 µL. Essa mistura foi incubada a 42 °C por 50 minutos terminando a reação com uma incubação a 70 °C por 15 minutos. Adicionou-se então 1 µL de RNase H (2 U/µL) (Invitrogen) incubando a amostra por 20 minutos a 37 °C. O tubo de reação era armazenado a -20 °C. Para a amplificação do cDNA sintetizado uma PCR foi feita utilizando 2 µL do produto da reação anterior, 5 µL de PCR buffer 10x, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTPs, 1 µL de cada iniciador (10 µM) *PRP15'1*: 5' CAA CAG AGC GCC ACA GCA CAC 3', este interno ao iniciador *PRP15'2* e SL: 5' CGC TAT ATA AGT ATC AGT TTC 3' este último baseado na sequência de minixon.

Para o sítio de poliadenilação, o mesmo protocolo descrito acima foi utilizado. O iniciador AP constituído por um oligodT: 5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T 3' foi utilizado para a síntese de cDNA. Para a reação da PCR foram utilizados os iniciadores AUAP: 5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3' e *PRP13'2*: 5' TCA GCT ACC TTT CCG ACA 3'.

Os transcritos correspondentes ao gene *PRP1* foram detectados utilizando um primer específico *PRP1R*: 5' GCG GTC GAC GCC TCA TCG CTC TCT AC 3' para síntese de cDNA e os iniciadores *NBD1F* e *NBD1R* para a PCR. As condições utilizadas foram as mesmas para aquelas descritas anteriormente.

Os produtos amplificados foram separados em um gel de agarose 1,2%, purificado pelo kit GeneClean II (Bio 101, Inc.) e clonados nos vetores pGEM-T e/ou pGEM-T Easy (Promega). Os DNAs isolados foram seqüenciados conforme descrito no item 3.5.7 de Material e Métodos.

3.7.4 RT-PCR em tempo real

Iniciadores para o gene *PRP1* de *L. major* foram desenhados a partir do Programa GeneRunner (<http://www.generunner.com>) (*PRP1F2*: 5' CGGCAGCTCAGCTACC TTTC 3' e *PRP1R2*: 5' CACAGTGTCCAGTGCAAACATG 3'). Os iniciadores do gene *Amastina* de *L. infantum* estavam previamente disponíveis no Laboratório do Prof. Marc Ouellette (*AmastinaF*: 5' TAG CTT GCC CGC GGC CGC CTT CAC TTC ATT e *AmastinaR*: 5' GCA AGT GGG TTT TTT TTT CGC). Para a síntese do cDNA, 50 ng de RNA total foi utilizado em presença da enzima SuperscriptIITM RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) e Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante.

O PCR em tempo real foi realizado em triplicata em volumes de 25 μ L utilizando o SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e detectado no Rotor Gene-3000 (Corbett Research) segundo protocolo previamente descrito (GAGNON et al., 2006; LEPROHON et al., 2006). As condições de reação da PCR em tempo real foram: 95°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 62 °C por 20 segundos e 72 °C por 20 segundos. A quantidade relativa do produto de PCR gerado de cada par de iniciadores foi determinado baseando-se no valor do ciclo limiar (C_t) e na eficiência da amplificação. As reações eram normalizadas dividindo os valores pela quantidade relativa de expressão do gene *GAPDH* utilizado como controle e amplificado com os seguintes iniciadores (*GAPDHF*: 5' GAA GTA CAC GGT GGA GGC TG 3' e *GAPDHR*: 5' CGC TGA TCA CGA CCT TCT TC 3').

3.8 Anticorpos anti-PRP1

3.8.1 Clonagem da proteína recombinante GST-PRP1

A proteína recombinante correspondente ao primeiro domínio de ligação de ATP da PRP1 foi expressa em *E. coli* (DH10- β) em fusão com a GST (Glutathione-S-Transferase de *Schistosoma japonicum*) utilizando o vetor de expressão pGEX-4T1 (Amershan Pharmacia). Para a construção do vetor de expressão pGEX-4T1-(GST-PRP1), iniciadores específicos do gene *PRP1* (*PRP1F* e *PRP1R*) e o DNA do plasmídeo pSNBR/8 kb *Sma*I-B (Fig. 1) foram utilizados em uma reação de PCR. As seqüências dos respectivos iniciadores utilizados foram: *PRP1F* 5' GCG gaa ttc GCG ATG GTG GAC AGG AC 3' e *PRP1R* 5' GCG gtc gac GCC TCA TCG CTC

TCT AC 3' que contêm os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *SaI* respectivamente (representados em letras minúsculas). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer utilizado, 0,05 U/µL de Taq DNA polimerase e cerca de 10 ng do DNA do plasmídeo pSNBR/8 kb *SmaI*-B. O produto amplificado foi purificado com o Kit GeneClean II (Bio 101, Inc.), digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SaI* (conforme item 3.5.5 de Material e Métodos) e então ligado no vetor de expressão previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O produto ligado foi transformado em *E. coli* (DH10-β) e o DNA do plasmídeo obtido foi analisado através da digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SaI*. Para a confirmação da clonagem, o DNA dos clones obtidos utilizados no processo de expressão foram seqüenciados (conforme item 3.5.7 de Material e Métodos) e mapeados por digestão com enzimas de restrição a fim de confirmar a correta clonagem do gene *PRP1* em fusão com o gene *GST* do vetor pGEX.

3.8.2 Expressão e purificação da proteína recombinante GST-PRP1

A expressão e a purificação das proteínas recombinantes foi baseado no protocolo de Lew, Beck e Thomas (1991). Inicialmente uma colônia recombinante contendo o plasmídeo pGEX-4T1-(GST-PRP1) foi inoculada em 5 mL de LBA durante o período de 14 horas a 37 °C com agitação constante. A seguir, a cultura foi transferida para 50 mL de LBA super caldo, agitando por 2 a 3 horas a 37 °C sendo então adicionado IPTG para uma molaridade final de 0,2 mM, incubando em seguida por 3 a 4 horas a 37 °C. Posteriormente a cultura foi centrifugada a 5.000xg

por 10 minutos e o sedimento celular ressuspenso em uma solução de 1,2 mL contendo 10 mM de Tris; 0,5 mM de EDTA; 2,4 mg de lisozima e os seguintes inibidores de protease: 2 mM de PMSF; 100 µg/mL de TPCK, 100 µM de Antipain e 800 nM de Aprotinina. A ressuspenção celular foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e em seguida submetidas a um processo de congelamento em banho de gelo e descongelamento a 42 °C por 3 vezes em intervalos de 3 minutos cada um. Posteriormente foi adicionado 12 µL de MgCl₂ 2M e 1 µL de DNase I (10-50 U/µL) (Invitrogen) sendo posteriormente incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. O extrato protéico foi centrifugado a 15.000xg por 15 minutos.

Uma vez que a proteína recombinante estava presente em corpos de inclusão (porção insolúvel) o sobrenadante foi descartado e a porção insolúvel foi submetida a lavagem com 500 µL de uma solução contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM de EDTA (pH 8,0) e 0,5% de Triton-X-100. Sedimentava-se o extrato protéico insolúvel através de uma rápida centrifugação e então este era solubilizado com 1 mL de uma solução 10 mM de Tris-HCl (pH 6,3); 8 M de uréia e 0,1 M de NaH₂PO₄ por uma hora. As amostras eram centrifugadas a 12.000xg por 10 minutos e o sobrenadante contendo a proteína recombinante armazenado a -80 °C até o momento de uso (SIEMERING et al., 1996).

Para a purificação da proteína recombinante, o extrato protéico presente na solução de solubilização contendo 8 M de uréia era adicionado a uma solução de glutathiona agarose (Amershan Pharmacia) e submetido a agitação por 5 minutos. Em seguida a amostra era centrifugada a 500xg por alguns segundos e lavada por 3 a 5 vezes com PBS. Eluía-se a glutathiona agarose contendo a proteína recombinante em cerca de 0,6 mL de uma solução de 0,05 M de Tris-HCl (pH 9,6) contendo 2 mg/mL de glutathiona reduzida (Gibco-BRL) por 3 vezes. A amostra era centrifugada

a 500xg por alguns segundos e o sobrenadante contendo a proteína recombinante purificada era recolhido e armazenado a -80 °C.

3.8.3 SDS-PAGE

A separação eletroforética das proteínas foi realizada em sistema de mini-gel 8,5 x 5 cm (Bio-Rad) (LAEMMLI, 1970). Inicialmente era preparado um gel de corrida 10% para um volume final de 9 mL onde eram adicionados 1,4 mL de água destilada; 3 mL de uma solução de acrilamida 30% (m/v) e bisacrilamida 0,8% (m/v); 4,5 mL de uma solução 0,75 M de Tris-HCl e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,8). A seguir eram adicionados simultaneamente 0,1 mL de APS 10% (m/v) e 5 µL de TEMED (Invitrogen). Após breve mistura adicionava-se a solução entre as placas, aguardando pela polimerização do gel. A seguir, o gel de empilhamento era preparado em um volume final de 5 mL e constituído por 3,2 mL de água destilada; 0,5 mL de uma solução de acrilamida 30% (m/v) e bisacrilamida 0,8% (m/v); 1,25 mL de uma solução 0,5 M Tris-HCl e SDS 0,1% (m/v) (pH 6,8). Após a adição de 0,05 mL de APS 10% (m/v) e de 5 µL de TEMED (Invitrogen) adicionava-se a solução sobre o gel de corrida, até sua polimerização. O gel era fixado na cuba de corrida contendo o Tampão de Corrida 1x (75 mM de Tris base; 576 mM de Glicina; 0,1% SDS [m/v]). As amostras de proteína foram diluídas (1:1) (v/v) com o Tampão de Amostra/SDS 2x (160 mM de Tris-HCl [pH 6,8]; 5% de SDS [m/v]; 20% de glicerol [v/v]; 50 mM de 2-ME; 0,02% de azul de bromofenol [m/v]), aquecidas por 5 minutos a 100°C e então aplicadas no gel. O Padrão de Peso Molecular de proteína utilizados foram: Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) apresentando proteínas com os seguintes tamanhos em quilodalton (kDa): 116; 66,2; 45; 35; 25;

18,4; 14,4 ou o Page Ruler Protein Ladder (Fermentas) que contém proteínas com os seguintes tamanhos em kDa: 200; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 10. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem e tempo de acordo com as proteínas analisadas. Após a corrida, corava-se o gel com azul de Coomassie (0,05% de azul de Coomassie [m/v], 45% de metanol [v/v]; 7% de ácido acético glacial [v/v]) e descorava-se com uma solução contendo metanol 30% (v/v) e ácido acético glacial 7% (v/v). Alternativamente, as proteínas distribuídas pelo gel eram transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose e visualizadas por Western Blot (item 3.9.2 de Material e Métodos).

3.8.4 Quantificação de proteína pelo método de Bradford

A quantificação da proteína recombinante foi realizada através do método de Bradford conforme descrito por Ausubel et al. (1994).

3.8.5 Obtenção de soro policlonal de coelho imunizado com a proteína recombinante GST-PRP1

Para obtenção de anticorpos anti-PRP1, a proteína recombinante GST-PRP1 foi utilizada na imunização intramuscular e subcutânea de um coelho New Zealand adulto do sexo masculino. Cerca de 2 mL de adjuvante completo de Freund's foi misturado em cerca de 2 mL da solução contendo a proteína recombinante GST-PRP1 purificada (0,5 mg/mL em PBS). A mistura foi emulsificada e transferida para uma seringa de 5 mL sendo inoculado cerca de 2 mL da proteína recombinante emulsificada por coxa traseira (injeção intramuscular). Após intervalos de duas

semanas o mesmo procedimento foi realizado inoculando cerca de 1 mg de proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund's (1:1) na coxa traseira. O coelho foi ainda submetido a imunização subcutânea da proteína recombinante emulsificada em adjuvante incompleto de Freund's (1:1). A imunização foi realizada na região dorsal do coelho em 4 diferentes sítios com cerca de 0,5 a 1 mg de proteína recombinante. A obtenção do soro policlonal foi realizada através da sangria da veia marginal da orelha e posteriormente por sangria total. Amostras do soro também foram obtidas anteriormente ao processo de imunização realizado no animal.

3.9 Identificação da PRP1 em extratos protéicos de *L. major*

3.9.1 Purificação de proteínas de membrana de *L. major*

A purificação das proteínas de membrana foi baseado no protocolo de Hamada e Tsuruo (1988) modificado por Murta et al. (2001). Todo o procedimento foi realizado a 4°C em presença dos seguintes inibidores de protease: 2 mM de PMSF; 100 µg/mL de TPCK, 100 µM de Antipain e 800 nM de Aprotinina. Inicialmente os parasitos foram sedimentados através de uma rápida centrifugação (1.500xg por 10 minutos) e ressuspenso em uma densidade de 10⁹ células/mL em tampão hipotônico (10 mM de Tris-HCl, [pH 7,4]; 10mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1mM de DTT] e incubado por 15 minutos em banho de gelo. A seguir, as células foram lisadas através de 3 ciclos de um processo de congelamento em banho de gelo e descongelamento a 42 °C por 3 vezes em intervalos de 3 minutos cada um. O núcleo celular foi removido pela centrifugação a 400xg por 10 minutos a 4 °C, sendo

as células então submetidas a uma centrifugação a 22.000xg por 30 minutos a 4 °C. O sedimento contendo a fração de membrana foi suspenso em 200 µL de Tampão de Lise (50mM de Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM de NH₄Cl, 2 mM de MgCl₂, e 1% de CHAPS) e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Uma segunda centrifugação a 22.000xg por 30 minutos a 4 °C foi realizada e o sobrenadante obtido foi utilizado como a fração enriquecida de proteínas de membrana. Nessa etapa a concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (item 3.8.4 de Material e Métodos).

3.9.2 Western blot

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, transferiu-se o gel sob base de membrana de nitrocelulose envolvendo-o por papel de filtro, procurando manter toda a montagem sempre úmida com o Tampão de Transferência (3,03 g/L de Tris Base; 14,04 g/L de Glicina; 20% de metanol [v/v]). Após a montagem do gel sob a membrana, este foi colocado na cuba de transferência (Bio-Rad) contendo o Tampão de Transferência descrito acima e submetido a uma corrente constante de 250 mA e voltagem de 100 V por 1 hora. A eficiência da transferência das frações protéicas para a membrana de nitrocelulose foi feita utilizando o corante Ponceau (0,2% de Ponceau-S [m/v]; 1% de ácido acético glacial [v/v]), sendo em seguida descorada com PBS. A seguir, as membranas eram submetidas a um Western blot.

Inicialmente as membranas eram incubadas em Tampão de Bloqueio (5% de leite em pó desnatado diluído em 0,2% de Tween-20 em PBS [Tampão de Lavagem]) por 1-2 horas a temperatura ambiente com agitação. O soro policlonal de coelho anti-GST-PRP1 foi diluído no tampão de bloqueio em 1/50 e incubado com a membrana por 2 horas a temperatura ambiente com agitação. Após a incubação, as

membranas eram lavadas por 3 vezes com o Tampão de Lavagem por 10 minutos, sendo então adicionado anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1/1000 em tampão de bloqueio por 1 hora. As membranas eram então lavadas com o tampão de lavagem por 3 vezes por 10 minutos cada lavagem e a seguir reveladas por solução reveladora (6 mg de 4-cloro-naftol; 2 mL de metanol; 10 mL de PBS; 10 μ L de H₂O₂).

3.10 Localização celular da PRP1 em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania* spp.

3.10.1 Construção do vetor pXG-PRP1-GFP

Para a localização celular do transportador ABC PRP1, o seu gene foi clonado em fusão com o gene *GFP* clonado no plasmídeo pXG-GFP' (HA et al., 1996). Para a construção do plasmídeo pXG-PRP1(GFP), o gene *PRP1* foi amplificado por PCR utilizando a FidelityTaq DNA polymerase (USB) com os iniciadores PRP1-GFP-F (5' GCG AGA TCT TCG ATG AGC AGC CAG CGA CCG GAG 3') e PRP1-GFP-R (5' GCG CCC GGG ACA CTG ACG CAT GAG CGA CGC GAC 3') segundo as instruções do fabricante. As condições de reação da PCR foram: 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto e 68 °C por 5 minutos, seguido por um ciclo a 68 °C por 7 minutos. O produto amplificado de 5,4 kb foi purificado e clonado no plasmídeo pXG-GFP' previamente digerido com a enzima de restrição *Sma*I e tratado com a enzima CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (Amersham Pharmacia) conforme instruções do fabricante. A correta

fusão do gene *PRP1* com o gene *GFP* foi verificado através da digestão com enzimas de restrição e pelo sequenciamento de nucleotídeos da região de junção entre os dois genes.

3.10.2 Microscopia de fluorescência

Após transfectados com o plasmídeo pXG-PRP1(GFP), os parasitos vivos foram lavados com PBS, ressuspensos e imobilizados em *low melting agarose* 1% dissolvida em PBS e então transferidos para lâmina e coberto por lamínula. Os parasitos vivos foram visualizados no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE300 (objetiva de 100x) utilizando filtros apropriados de emissão e excitação para a GFP (HYQ filter cube, Nikon).

3.10.3 Microscopia confocal

Os parasitos transfectados com o plasmídeo pXG-PRP1(GFP) de *L. major* lavados com PBS, foram marcados incubando-os com 0,1 mM de Hoechst 33342 (2,5'-Bi-1H-benzimidazole, 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-trihydrochloride, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) e 50 nM de LysoTracker (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) por 30 minutos. A seguir foram lavados três vezes com PBS, ressuspensos e imobilizados em *low melting agarose* 1% dissolvida em PBS contendo 1% de glicose e então transferidos para lâmina e coberto por lamínula. Os parasitos vivos foram visualizados em um sistema confocal Bio-Rad 1024UV acoplado a um microscópio Zeiss Axiovert 100 (BARROS et al.,

1997). As imagens foram processadas com o programa Image-J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e Adobe Photoshop.

3.11 Seleção e caracterização de mutantes de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina

3.11.1 Seleção de mutantes resistentes à pentamidina

Uma outra abordagem realizada nesse estudo foi a seleção e caracterização de mutantes de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina. Uma vez que o transportador ABC PRP1 está envolvido na resistência à pentamidina quando transfectado e superexpresso, foram selecionados mutantes com o intuito de verificar se o gene *PRP1* estaria envolvido nos mecanismos de resistência à pentamidina em *Leishmania*. Foram selecionados promastigotas de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina mantidos em concentrações constantes de 0,5 µg/mL por mais de 50 passagens correspondendo a um período de cerca de 6 meses (mutante PEN^r 0,5), considerando que o valor de IC₅₀ dos parasitos selvagens é de 0,37 ± 0,06. Selecionou-se também uma outra linhagem independente da mesma espécie do parasito em concentrações crescentes de pentamidina iniciando em 0,5 µg/mL e atingindo valores de até 5 µg/mL de pentamidina (mutante PEN^r 5). Nesse caso a cultura celular de parasitos resistentes era estabilizada após 5 subculturas na mesma concentração de pentamidina antes do aumento da concentração de pentamidina. Os mutantes resistentes foram submetidos a curvas de inibição de crescimento conforme descrito no item 3.4.2 de Material e Métodos.

3.11.2 Preparação de blocos de agarose contendo cromossomos de *Leishmania*

Para a separação de cromossomos de DNAs circulares/lineares foram utilizados blocos de agarose que continham os cromossomos dos parasitos imobilizados. Os parasitos foram lavados com PBS e ressupensos na densidade de 1×10^8 /mL no mesmo tampão. A seguir, as células foram ressupensas com *low melting agarose* 1% em TBE 1x para uma concentração final de 0,5% e então transferido 100 μ L da suspensão em poços de placa de acrílico e incubado no gelo por 5 minutos. Os blocos eram transferidos para uma solução de lise (0,5M de EDTA [pH 9,5], 1% de SLS, 1 mg/mL de proteinase K) e incubados a 42 °C por 48 horas. A seguir, os blocos eram lavados com solução de 200 mM de Tris-HCl e 100 mM de EDTA e estocados a 4 °C. Os blocos foram utilizados nas técnicas de PFGE e FIGE.

3.11.3 Separação dos cromossomos por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

A técnica de PFGE foi utilizada para a separação de grandes fragmentos de DNA através da aplicação de pulsos alternados de corrente por várias horas. Foi utilizado o CHEF MAPPER (Bio-Rad) nas seguintes condições de corrida:

Para separação de cromossomos de 0,2 a 2 Mb utilizou-se tempo de corrida de 16 horas, pulso inicial de 24 s, pulso final 1 min 33 s. Para a separação de DNAs circulares dos cromossomos utilizou-se pulsos de 10 s por 18 horas a 4,5 v/cm. As

corridas foram realizadas em gel de agarose 1% em solução TBE 0,5x com a cuba mantida a 14 °C. Cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* ou concatâmeros do fago λ foram utilizados como marcadores de peso molecular. O gel era corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$, fotografado e transferido para membrana de nylon conforme descrito anteriormente.

3.11.4 Separação dos cromossomos de DNAs circulares por *Field Inversion*

Gel Electrophoresis (FIGE)

A técnica de FIGE foi utilizada para a separação dos cromossomos de DNAs circulares utilizando o FIGE Mapper Electrophoresis System (Bio-Rad). Foram utilizados os cromossomos preparados conforme descrito no item 3.11.2. Os marcadores de peso molecular foram o 8-48 kb ladder (Bio-Rad) e o DNA do fago λ digerido com *HindIII* (Invitrogen) carregados em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. A eletroforese foi realizada utilizando voltagens de 180 V (direta) e 120 V (reversa) com intervalos de pulso de 0,1 a 0,8 s em rampa linear, durante 11 horas a temperatura ambiente. O gel era corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$, fotografado e transferido para membrana de nylon conforme descrito acima.

3.11.5 Extração de DNA circulares nos mutantes resistentes à pentamidina

DNAs circulares foram isolados de *L. amazonensis* através do kit Promega Wizard miniprep (Promega) segundo as instruções do fabricante.

4 Resultados

4.1 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina e na resistência cruzada a compostos anti-*Leishmania*

Recentemente, o gene *PRP1* (*Pentamidine Resistance Protein 1*) foi identificado por clonagem funcional (COTRIM; GARRITY; BEVERLEY, 1999), e sua superexpressão confere resistência à pentamidina em *L. major* (Tab. 2) (COELHO, 2002). O gene *PRP1* de *L. major* foi isolado e identificado a partir de uma biblioteca genômica de *L. major* Friedlin V1 (linhagem virulenta). Esta biblioteca genômica foi transfectada em formas promastigotas de *L. major* Friedlin A1 (linhagem avirulenta) (DA SILVA; SACKS, 1987) e os parasitos transfectados selecionados em meio de cultura contendo pentamidina tiveram o seu DNA episomal, envolvido com a resistência à pentamidina, isolado. Dois cosmídeos foram isolados: cosPEN1-A e cosPEN1-B (Fig. 1A). Ambos os cosmídeos continham insertos que correspondiam ao mesmo *locus* (COELHO, 2002). O inserto de cerca de 40 kb desses cosmídeos que continham a região genômica envolvida com a resistência à pentamidina em *L. major* foi mapeado e caracterizado com o intuito de se isolar o gene contido nesse inserto. O mapa da região genômica assim como das outras construções obtidas está representado na Figura 1 (COELHO, 2002). Através da determinação da sequência de nucleotídeos do fragmento *Sma*I de 8 kb (Fig. 1), foi identificado o gene *PRP1*, constituído por 5.424 pb e que codifica uma proteína de 1.807 aminoácidos (AY251609) (COELHO, 2002).

Os estudos de resistência cruzada dos parasitos transfectados com o plasmídeo pSNBR/8 kb *Sma*I-A com drogas estruturalmente e funcionalmente não

relacionadas com a pentamidina está resumido na Tabela 2. Foi observada resistência cruzada somente para o SbCl_3 e o potássio de antimônio tártaro trihidratado (PATH), dois antimoniais trivalentes (Tab. 2). Não foi observada resistência cruzada ao Glucantime, um antimônio pentavalente, a miltefosina, a ciclosporina-A, ao verapamil e a vinblastina (Tab. 2). Esses dados demonstram que o transportador ABC PRP1 além de conferir resistência à pentamidina, pode conferir resistência aos antimoniais trivalentes, mas não aos antimoniais pentavalentes. Outro dado importante é que a PRP1 tem o seu fenótipo revertido em presença de concentrações não tóxicas de verapamil em transfectantes promastigotas de *L. major* (COELHO, 2002), um agente que reverte à resistência mediada por transportadores ABC, fenômeno este já observado em células tumorais (HIGGINS, 1992; GOTTESMAN; PASTAN, 1993).

Figura 1. Mapa funcional do locus *PRP1*. (A) Mapa de restrição da região genômica relacionada com a resistência à pentamidina. (B) Representação dos dois cosmídeos (cosPEN1-A e cosPEN1-B) isolados por experimentos de seleção por superexpressão gênica (COTRIM; GARRITY; BEVERLEY, 1999). O gene *PRP1* está representado em caixa preta e a seta indica a orientação da transcrição do gene. A caixa em cinza representa o DNA do vetor cLHYG. (C) Localização do gene *PRP1*. O cosmídeo cosPEN1-A foi utilizado para obtenção de deleções a fim de localizar a região que contém o gene relacionado com a resistência à pentamidina (cosPEN1-A Δ HindIII e cosPEN1-A Δ HindIII Δ EcoRV I, II e III). Uma série de fragmentos de restrição obtidos da deleção cosPEN1-A Δ HindIII foram subclonados no vetor pSNBR (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991) e testados quanto sua capacidade de conferir resistência à pentamidina. Os insertos de DNA que conferiram resistência à pentamidina em *L. major* após transfecção estão representados por (+). (D) Organização do locus *PRP1* contido no fragmento *SmaI* de 8 kb. A sonda de DNA *PstI* de 0,8 kb corresponde ao 1º domínio de ligação de ATP da PRP1 e está representado como NBDI. Enzimas de restrição: B, *Bam*HI; E, *Eco*RV; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; M, *Sma*I; N, *Nhe*I; No, *Not*I; P, *Hpa*I; S, *Sal*I; Sa, *Sac*I; X, *Xho*I.

Tabela 2. Padrão de resistência cruzada (valor de IC₅₀) verificado para os transfectantes promastigotas de *L. major* (Friedlin A1) com o plasmídeo pSNBR/8kb *Sma*-A (Fig. 1C).

Drogas	<i>L. major</i>	pSNBR/8kb <i>Sma</i> -A	Razão de resistência	(n)	(p)
Pentamidina (µg/mL)	0,65 ± 0,15	2,25 ± 0,12	3,7 ± 1,11	6	< 0,001
PATH (µg/mL)	8,09 ± 2,83	35,44 ± 10,03	4,57 ± 0,99	8	< 0,001
SbCl ₃ (mg/mL)	0,40 ± 0,11	1,52 ± 0,2	3,87 ± 0,81	6	< 0,001
Ciclosporina-A (µg/mL)	2,62 ± 0,53	2,47 ± 0,16	0,95 ± 0,07	4	ns
Glucantime (mg/mL)	33 ± 3,46	34 ± 3,65	1,05 ± 0,20	4	ns
Miltefosina (µg/mL)	0,64 ± 0,03	0,65 ± 0,03	1,01 ± 0,08	4	ns
Verapamil (µM)	22,5 ± 1,7	24,3 ± 4	1,04 ± 0,2	4	ns
Vinblastina (µg/mL)	18,6 ± 2,8	19,4 ± 2,3	1,06 ± 0,23	4	ns

A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes está representado para cada droga testada.

A Razão de resistência foi definida pela média ± o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com o plasmídeo pSNBR/8 kb *Sma*-A, pelo valor de IC₅₀ das células selvagens de *L. major* medido em cada experimento. Valores significantemente diferentes do valor do tipo selvagem (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student. ns – não significante (*p* > 0,05).

Diferenças não significativas foram observadas entre os transfectantes com o plasmídeo pSNBR vazio e os parasito selvagem de *L. major* em presença de pentamidina (dados não mostrados).

4.2 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em espécies heterólogas de *Leishmania*

O gene *PRP1* de *L. major*, isolado da cepa Friedlin V1 (conforme descrito acima) foi transfectado em formas promastigotas de outras espécies de *Leishmania* através da construção pSNBR/8kb *Sma*-A (Fig. 1). A superexpressão do gene *PRP1* era capaz de conferir resistência à pentamidina em *L. amazonensis* e *L. infantum* além de também conferir resistência em uma outra linhagem de *L. major*, nesse caso

a cepa LV39 (Tab. 3). Esses dados indicaram que o transportador ABC PRP1 de *L. major* era funcional em espécies heterólogas de *Leishmania*.

Tabela 3. Padrão de resistência à pentamidina (valor de IC₅₀) em espécies heterólogas de *Leishmania* e *L. major* LV39 transfectadas com o gene *PRP1* de *L. major* (Friedlin V1).

Espécie	Pentamidina		(n)	(p)
	IC ₅₀ (µg/mL)	Razão de resistência		
La pSNBR	0,36 ± 0,02	1	4	
La PRP1	2,46 ± 0,34	6,8 ± 1,02	4	< 0,001
Li pSNBR	1,58 ± 0,59	1	4	
Li PRP1	5,9 ± 0,42	4,1 ± 1,6	4	< 0,001
Lm pSNBR	1,96 ± 0,15	1	4	
Lm PRP1	10,65 ± 1,37	5,32 ± 0,79	4	< 0,001

A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes está representado para cada linhagem testada.

A Razão de resistência foi definida pela média ± o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ dos parasitos transfectados com o plasmídeo PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*-A) (Fig. 1), pelo valor de IC₅₀ dos parasitos transfectados com o plasmídeo pSNBR (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991). Valores significativamente diferentes do valor do parasito transfectado com o plasmídeo pSNBR (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste t de Student.

Legenda: La – *L. amazonensis*; Li – *L. infantum*; Lm – *L. major* (LV39).

Em células de mamíferos, o verapamil, a ciclosporina A e a quinidina têm sido demonstrados como capazes de reverter à resistência conferida pelos transportadores ABC. (ENDICOTT, LING, 1989; GOTTESMAN, PASTAN, 1993). Para analisar se a resistência conferida pela PRP1 em espécies heterólogas de *Leishmania* seria revertida por verapamil, curvas de inibição de crescimento contendo pentamidina foram testadas contendo concentrações constantes e não tóxicas de verapamil para os transfectantes contendo o plasmídeo PRP1 (pSNBR/8 Kb *Sma*-A). Os valores de IC₅₀ para o verapamil foram determinados a partir de curvas de inibição de crescimento em presença deste composto para os parasitos

selvagens de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Os valores de IC₅₀ foram: $34,75 \pm 9 \mu\text{M}$ para *L. infantum* e $58 \pm 4,38 \mu\text{M}$ para *L. amazonensis* (Tab. 7). A partir desses valores, foram utilizadas concentrações constantes e não tóxicas de verapamil. Essa concentração de verapamil era capaz de aumentar a suscetibilidade à pentamidina em ambas as espécies transfectadas em comparação com o parasita transfectado não tratado com verapamil (Tab. 4).

Verificou-se ainda a funcionalidade desse transportador na resistência cruzada aos antimoniais trivalentes em *L. amazonensis*. Os transfectantes que superexpressavam a PRP1 eram resistentes ao PATH, assim como já havia sido observado em *L. major* (Tab. 2). Os valores de IC₅₀ foram: $56,3 \pm 12,3 \mu\text{g/mL}$ para o transfectante contendo apenas o vetor vazio pSNBR, e $129,3 \pm 11,6 \mu\text{g/mL}$ para o transfectante contendo o gene *PRP1* (pSNBR/8 kb *Sma*-A), valores esses estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

Tabela 4. Padrão de reversão de resistência à pentamidina (valor de IC₅₀) pelo verapamil em espécies heterólogas de *Leishmania* transfectadas com o gene *PRP1* de *L. major* (Friedlin V1).

Espécie	Pentamidina		(n)	(p)
	IC ₅₀ (μg/mL)	Razão de resistência		
La PRP1	$2,46 \pm 0,34$	1	4	
La PRP1 (20 μM VP)	$0,63 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,03$	4	< 0,001
Li PRP1	$5,9 \pm 0,42$	1	4	
Li PRP1 (15 μM VP)	$3,67 \pm 0,25$	$0,63 \pm 0,03$	4	< 0,001

A média $\pm$ o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes está representado para cada linhagem testada.

A Razão de resistência foi definida pela média $\pm$ o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com o plasmídeo PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*-A) (Fig. 1) tratada com verapamil, pelo valor de IC₅₀ das células transfectadas com o plasmídeo PRP1 não tratadas com verapamil. Valores significantemente diferentes do valor do parasito transfectado com o plasmídeo PRP1 (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student. Legenda: La – *L. amazonensis*; Li – *L. infantum*.

4.3 Caracterização molecular do gene *PRP1* de *L. major*

O transportador PRP1 pertence à família de transportadores ABC (ATP-binding cassette) que é bastante conservada, com membros descritos em todos os reinos de seres vivos (HIGGINS, 1992). Recentemente, o transportador PRP1 foi classificado como membro da subfamília ABCC (ABCC7), que é constituída por 8 membros (LEPROHON et al., 2006). A PRP1 (ABCC7) apresenta identidade de 37,9%, 38,7%, 37,9%, 35,6%, 38%, 38,4% e 18,6% com os transportadores ABCC de *L. major* ABCC1, ABCC2, ABCC3 (MRPA), ABCC4, ABCC5, ABCC6 e ABCC8 respectivamente. É importante salientar que dentre os demais membros da subfamília ABCC, apenas o ABCC3 (MRPA) está envolvido na resistência à drogas em *Leishmania* (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU et al., 1994; EL FADILI et al., 2005).

A análise da organização genômica do gene *PRP1* em *L. major* por Southern blot mostrou que este gene é de cópia única (Fig. 2). Neste experimento foi utilizado como sonda o fragmento *Pst*I de 0,8 kb que codifica o 1º domínio de ligação de ATP cuja região é bastante conservada entre os membros da família de transportadores ABC (Fig. 1) (HIGGINS, 1992; LÉGARE; HETTEMA; OUELLETTE, 1994). Pode-se verificar que os fragmentos hibridizados correspondiam àqueles representados no mapa, indicando ainda a ausência de outras cópias desse gene (Fig. 1 e Fig. 2). Na Figura 2, pode-se observar fracas bandas em algumas digestões, o que pode refletir a hibridização com outros genes membros da família de transportadores ABC, como já observado anteriormente quando utilizado sonda do gene *MRPA* (*PGPA*), um outro membro dessa família de transportadores em *Leishmania* (LÉGARE; HETTEMA; OUELLETTE, 1994).

Figura 2. Análise por Southern blot do DNA genômico de *L. major* (Friedlin A1). Cerca de 5 µg de DNA genômico foi digerido, fracionado em gel de agarose 0,9%, transferido para membrana de nylon e hibridizado com a sonda NBDI (Fig. 1). Nenhuma das enzimas utilizadas digere a sonda de 0,8 kb exceto *XhoI* (Fig. 1). Os marcadores de peso molecular são derivados do DNA do fago λ digerido com *HindIII*. Enzimas de restrição: 1, *BamHI*; 2, *EcoRV*; 3, *HindIII*; 4, *KpnI*; 5, *NotI*; 6, *SacI*, 7, *XhoI*.

Estão presentes no genoma de *Leishmania* 42 membros da família de transportadores ABC (LEPROHON, 2006). As análises através do sítio do Projeto Genoma de *L. major* confirmaram a ausência de outras cópias do gene *PRP1* estando localizado no cromossomo 31 (1.500 kb) de *L. major*. O ortólogo do gene *PRP1* foi identificado através da análise do projeto Genoma de *L. infantum* estando localizado no cromossomo 31 também de 1.500 kb, e este apresentava identidade de 93,1% com o gene *PRP1* de *L. major*. A sequência de nucleotídeos do gene *PRP1* de *L. braziliensis* ainda não se encontrava disponível no Projeto Genoma desse parasito até a conclusão deste estudo.

A análise da sequência de nucleotídeos da região genômica do gene *PRP1* indicou a ausência de outros membros da família de transportadores ABC. A 5' do gene *PRP1* há uma fase de leitura de 1.005 nucleotídeos que codifica uma proteína de 335 aminoácidos que apresenta identidade de 15% com a GP46 de *L. chagasi* (AAB62271). A 3' do gene *PRP1* há uma fase de leitura de 2.631 nucleotídeos que codifica uma proteína de 877 aminoácidos que não apresenta similaridade com proteínas já depositadas em bancos genômicos. Ambos os genes tinham a mesma orientação de transcrição que o gene *PRP1*.

A análise do padrão de transcrição do gene *PRP1* em *L. major* (Friedlin A1) por Northern blot identificou um grande transcrito maior que 10 kb a partir de RNA total do transfectante cosPEN1-A (Fig. 3B), enquanto que um transcrito de 6 kb assim como um outro de 4,4 kb foi detectado a partir de RNA total do transfectante pSNBR/8kb *Sma*-A (Fig. 3A). Essa variação no tamanho dos transcritos de diferentes transfectantes, cujo inserto que contém o gene de resistência varia em tamanho, já foi observada em *Leishmania* spp. (HENDERSON et al., 1992; CHOW et al., 1993). Entretanto, nenhum sinal de hibridização foi observado a partir do RNA

total de *L. major* tanto em fase logarítmica, quanto em fase estacionária de crescimento (Fig. 3A e Fig. 3B). Apesar de não ter sido detectado nenhum sinal de hibridização por ensaios de Northern blot em RNA total de parasitos promastigotas selvagens, os ensaios por RT-PCR, a partir de RNA total de *L. major*, e dos transfectantes cosPen1-A e pSNBR/8kb *Sma*I-A, evidenciaram a presença do fragmento de DNA específico de 618 pb correspondente a região que codifica o 1º domínio de ligação de ATP da PRP1 (Fig. 3C) e que foi confirmado pelo sequenciamento dos produtos amplificados (dados não mostrados). Esses dados indicam que a expressão do gene *PRP1* em promastigotas selvagens ocorre em baixos níveis. Resultados similares já foram observados em genes de outros transportadores ABC em *Leishmania* spp e *Trypanosoma brucei*. (HENDERSON et al., 1992; PAPADOPOULOU et al., 1994; MASER; KAMINSKY, 1998; MARCHINI et al., 2003; PARODI-TALICE et al., 2003; ANACLETO et al., 2003; KATAKURA et al., 2004).

O sítio de trans-splicing do transcrito do gene *PRP1* foi mapeado e identificado a 358 nucleotídeos do códon de iniciação (Fig. 4A). Pelo menos dois sítios de poliadenilação do transcrito do gene *PRP1*, identificados a 260 e 361 nucleotídeos do códon de terminação, são utilizados no processamento do RNAm (Fig. 4B).

Figura 3. Análise do transcrito do gene *PRP1* de *L. major*. (A) Análise por Northern blot de RNA total de promastigotas *L. major* e de transfectantes com o gene *PRP1*. Cerca de 5 µg de RNA total de *L. major* de fase logarítmica (1); fase estacionária (2); e de fase logarítmica do transfectante pSNBR/8 kb *Sma*-A (3) foi fracionado em gel de agarose 1%, transferido para membrana de nylon e hibridizado com a sonda NBDI, correspondendo a um fragmento de 0,8 Kb *Pst*I (Fig. 1D). (B) Cerca de 10 µg de RNA total de *L. major* de fase logarítmica (1), e de fase logarítmica do transfectante cosPEN1-A (2) foi fracionado em gel de agarose 1%, transferido para membrana de nylon e hibridizado com a sonda NBDI. (C) Produtos de RT-PCR amplificados com os iniciadores degenerados NBD1F e NBD1R que correspondem à sequência de nucleotídeos que codifica ao 1º domínio de ligação de ATP da PRP1 e de outros membros da subfamília ABCC. Para a síntese de cDNA foi utilizado um primer específico do gene *PRP1* (PRP1R). (-) Controle negativo da reação de PCR (ausência de cDNA); (RT-) Reação para síntese de cDNA com RNA total de promastigotas de fase logarítmica em ausência de Transcriptase Reversa; (1) RT-PCR a partir de RNA total de *L. major* fase logarítmica; (2) RT-PCR a partir de RNA total do transfectante pSNBR/8 kb *Sma*-A; e do transfectante cosPEN1-A (3).

A

```

-1002 AGTGAAGGGCTGCCTGAATGGGAGCTTCGGGAGGCGGATACAGCGGACACTTAGATGTGTGGAGGGCGTCATGGCATCACTGCAACGCAC
-912 CCTGCTTCGAATCAGTCGCCGCCACTGCGCCTGCGTGCGCGGTGCACGGAGAGGGCGCCCTGGGTGTAAGGTGTGGCTTGGCGTGCATT
-822 GCCTGTGCCACCGCCACACTCCGTGAGCCGTCTGCTGCCCGGTGCGCACCATGGCTTTCGTCTCTCTCGGGCATCGCTCTTCTCAGGC
-732 GGCTGTGCGCATCGCTGCGCTGCACTGCGCCTTTGCGCCCGCTCACATCAGGTATGGCTGTGAGGCGAACTGCGTGGCATGCACAGCTCG
-642 TGGCGGCGCGCTGCGCGTTGTGTGCTGCTGCTTGCCTTGTCCATTACTTGGCTCCTTCTCTCGGTGCCCGCTCTGTTTGGACACCGCTGT
-552 GCGTCGTCCGGCGACCCCTTTGCGCGGTGATGCCTCATTGCGGCGAGCGCAGCGGCATACCGTCAGCGCTGTGTGTGCTGCGCTCTTGTCTC
-462 ACTCTCTCCCTCTCTTGCAGAGGCTTGCAGCACCTCACTTGCCACTTCGCTCGATCTATTTCTTTCTTTTGTGCTGCGCTGGGCGGCA
-372 CCACCACAGCGTTAGTGACCGCACACCGCTCCCGACCGAGGCTTCCACGGCTGCTGCACATGCGTGGACGGCATTTGCGCAGCTCAGCTG
-282 CCGCGCTTGGCTAACGAGGCGCTCTTCTTTGAGGACACCGCATGCAGCAGCGCGACACGGCCAAGTCAATTGTGTGTGTTTGGCT
-192 GCTTAGCCCGCTGCGATAGGCGTGCCGCGAGGCGAGCTGTCTGCCCTGTGCGCGAGTGCTGCGCCTCCCTGCACCCATGCATTGCG
-102 AGCCGCGCGAGCGCTACACGATCTTCTAGTCTTGCCACGCTTGGTGACCCCTTTGCGGCGACGCTGCATCTTGCCTCCGACCCCTTGG
-12 CATCGGAGATCG

```

```

1 ATGAGCAGCCAGCGACCGGAGATGTCAAGAGGCCAGCGAGTTATAGCGCCCACTCGTTGCGCGAGGTCAACCGACGGCTGTGGCGGTTG
M S S Q R P E M S E G P A S Y S A H S F G E V N R R L W R L
30

```

B

```

5401 TCGCTCATGCGTCAGTGCAAGTGA
S L M R Q C K - 1807

5425 CTGCGCATCTCTGCAAGTCTTCATTTTCAGCGAGGCAACCTCGCGCCCGGTAGGGTGTGCTTTTTCGCCGTTGTTTTTATGTATGCAA
5515 CACCGTGTGTGCGATTGCCTCTTCGCGCGCGGGTGGAGAAGCTTGGAAGGAGGGAGACGGTGTGGCACACGAGGATTTACTAGCGATCC
5605 GATTCGATGAAGTGGTTGCCATGCTGCCCTTTTTCGCCGTGTTGAGAGGTGCTGTGAGACGGGGTGACATCGCGGCAACATCTCCAT
5695 CGATTCCACGTTGTTTCACTCGCTGAGTGCGATGGCTGGCATGAAGGCTTGTGTTGATGACGTCATGTGAGATGAGCAAGGGTTCGGCT
5785 GATTCTCTTCGTTTCACTCAAGCGCGCTTGTTCGCGTGCTGCTGTTGACTTCCCATGCGGGTGCCAGGTTTACATCTGTGTGTGCA
5875 ACACGTGTGCGTGCAATTTCTTCAGCTTGACTTTTCTCATGCCTCTTCGCTCTTCTCTTCTGCTGCTCTCCGAAATACTGTGCGTCTC
5965 CATATCTTTTCTTCTCCACCTCTCTTGCCACACCTTGTACTCACCAGGAGCCGTCGCCGTGATCGCCGCCACAACTTGCTCCGCTAG
6055 TGCCCTCGTCTTGTCAACCAGCTATAGCGTAGAATGCACAGGCACGATTGATTCTTCTTTTGTGACCTCTGCGCACCACTGATACGCTG
6145 CTTTTTCAACATCGTGTGTGCCAATCCAGTTACGTGCGCTGGCTCATTCAGCCCATAGTCTCGCATCCGTTTCTCC

```

Figura 4. Sítios de processamento do RNAm do gene *PRP1*. (A) O dinucleotídeo AG aceptor de trans-splicing está indicado na posição -358 (negrito e sublinhado) do códon de início de tradução. Os tratos de polipirimidina que precedem o sítio aceptor de trans-splicing estão sublinhados. (B) Os sítios de poliadenilação nas posições +260 e +361 do códon de terminação estão indicados (negrito e sublinhado).

4.4 Identificação de homólogos do gene *PRP1* em *Leishmania* spp.

Para a identificação dos homólogos do gene *PRP1* de *L. major* em diferentes espécies de *Leishmania* (Fig. 5), os iniciadores degenerados (NBD1F e NBD1R) baseados nas regiões codificantes do 1º domínio de ligação de ATP de diferentes transportadores ABC, incluindo a *PRP1* de *L. major*, foram utilizados em reação de PCR. Conforme demonstrado na Figura 5, esses iniciadores foram capazes de amplificar um produto de DNA específico de cerca de 0,6 kb em *L. major* conforme esperado e também em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, mas não em *L. chagasi* (Fig. 5). Esses iniciadores amplificaram também fragmentos de DNA específicos de

pouco menos de 0,5 kb (Fig. 5). Os fragmentos de 0,6 kb foram clonados no vetor pUC19 e em seguida seqüenciados. A análise da seqüência de nucleotídeos dos clones obtidos de aproximadamente 600 pb mostrou que estes correspondiam aos respectivos ortólogos do gene *PRP1* de *L. major*. A análise da seqüência de nucleotídeos dos respectivos clones constituídos por 600 e 615 pares de base para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* respectivamente indicaram que estes continham uma única fase de leitura aberta contida em ambos os fragmentos clonados. A análise da seqüência de aminoácidos da fase de leitura contida nos respectivos clones indicou que estes apresentavam identidade de cerca de 80% quando comparados com a PRP1 de *L. major*, previamente caracterizada (Tab. 5 e Fig. 6). No alinhamento da seqüência de aminoácidos observou-se a presença de 6 aminoácidos entre o motivo Walker A e a assinatura dos transportadores ABC (motivo C) na PRP1 de *L. braziliensis*, aminoácidos estes não presentes nas outras espécies, todas elas do subgênero *Leishmania* (Fig. 6). Buscas em banco de dados do projeto Genoma de outros tripanossomatídeos (*T. brucei* e *T. cruzi*) indicaram a ausência de seqüências relacionadas a PRP1, o que mostra que a PRP1 é específica do gênero *Leishmania* (LEPROHON et al., 2006).

Os fragmentos de cerca de 0,5 kb, cuja amplificação ocorreu nas três espécies estudadas (Fig. 5), inclusive em *L. major*, demonstrou pela clonagem e posterior sequenciamento dos fragmentos, que estes correspondem a genes de um outro transportador ABC de *Leishmania*, a MRPA (PGPA) envolvida na resistência aos antimoniais e ao arsênito (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU et al., 1994). Os valores de identidade entre os transportadores ABC MRPA (PGPA) entre as diferentes espécies de *Leishmania* e *T. brucei*, correspondentes a esse fragmento de 0,5 kb, são apresentados na Tabela 6 e variaram entre 94,2 e 62,8% entre seus

membros. Na Figura 7, está representado o alinhamento da sequência de aminoácidos da fase de leitura contida nos clones obtidos das três espécies estudadas. Foram acrescentados ainda a esse alinhamento a MRPA (PGPA) de *L. tarantolae*, *L. infantum* e de *T. brucei*, cujo ortólogo já foi caracterizado e associado com a resistência à drogas (Fig. 7) (SHAHI; KRAUTH-SIEGEL; CLAYON, 2002).

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio contendo os produtos de amplificação por PCR utilizando os iniciadores NBD1F e NBD1R a partir de DNA genômico de *L. major* (1), *L. amazonensis* (2), *L. braziliensis* (3) e *L. chagasi* (4). (-) Controle negativo da PCR.

Tabela 5. Identidade de aminoácidos (%) entre os transportadores ABC PRP1 de *L. amazonensis* (La PRP1), *L. braziliensis* (Lb PRP1), *L. infantum* (Li PRP1) e *L. major* (Lm PRP1) (AAP79578).

	La PRP1	Lb PRP1	Li PRP1	Lm PRP1
La PRP1	-	80	89	90,5
Lb PRP1	-	-	81	78
Li PRP1	-	-	-	91

Figura 6. Alinhamento da sequência de aminoácidos do 1º domínio de ligação de ATP da PRP1 de *Leishmania* spp. utilizando o algoritmo ClustalW (DNASTAR, Inc.). Os aminoácidos idênticos estão em cinza e os motivos Walker A e B relacionados com a ligação de ATP e a assinatura dos transportadores ABC estão em caixas nomeados por A, B e C respectivamente. Está representado a La PRP1 de *L. amazonensis*, a Lb PRP1 de *L. braziliensis*, a Li PRP1 de *L. infantum* e a Lm PRP1 de *L. major* (AAP79578).

Tabela 6. Identidade de aminoácidos (%) entre os transportadores ABC MRPA (PGPA) de *L. amazonensis* (La MRPA), *L. braziliensis* (Lb MRPA), *L. infantum* (Li MRPA), *L. major* (Lm MRPA) (CAJ03979), *L. chagasi* (Lc MRPA), *L. tarentolae* (Lt MRPA) (P21441) e *T. brucei* (Tb MRPA) (CAC83020).

	La MRPA	Lb MRPA	Li MRPA	Lm MRPA	Lc MRPA	Lt MRPA	Tb MRPA
La MRPA	-	94,2	79,5	79,5	71,2	75,6	73,7
Lb MRPA	-	-	75,6	74,4	69,9	71,8	69,9
Li MRPA	-	-	-	95,5	64,1	89,1	68,6
Lm MRPA	-	-	-	-	64,1	90,4	69,9
Lc MRPA	-	-	-	-	-	62,8	67,3
Lt MRPA	-	-	-	-	-	-	69,9

		A			
La MRPA	PRAKLT	VVLGATGSGKSTLLQSL	LSQFEISGRVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRGNILFFDEEDAAR	LADAVRVSQLEADLAQLGGGLE 90
Lb MRPA	PRARLT	VVLGATGSGKSTLLQALL	LSQFEISGRVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRGNILFFDEEDTAR	LADAVRVSQLEADVALLGGGLE 90
Li MRPA	PQFKLT	TMIGATGSGKSTLLGSL	MGEYDQSGGEVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRGNILFFDEERAAD	LQDVIRCCQLEADVAQLGGGLE 90
Lm MRPA	PQFKLT	TMIGATGSGKSTLLGSL	MGEYDQSGGEVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRGNILFFDEERAAD	LQDVIRCCQLEADLAQLSGGLE 90
Lc MRPA	LRGKLT	VVLGPTGSGKSTLLDAL	IGALAVTRGRVACSRSVAYVPQQP	WTMNTLFDNVIFFGAPDAAA	FERAVRSSQLASDLALLADGAE 90
Lt MRPA	PKGKLT	TMIGSTGSGKSTLLGAL	MGEYSWESGELWAERSIAYVPQQA	WIMNATLRGNILFFDEERAED	LQDVIRCCQLEADLAQFCGGLD 90
Tb MRPA	PKGKLT	VVLGATGSGKSTLLET	LLGNFEVTHGSVLAAKSFAYVPQQP	WIMNATLFDNILFFTPENEER	LHKAVRVCQLEADLQQLPAGME 90
		C		B	
La MRPA	TEIGEGV	NLSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDD	PLSALDAHVGERVVEECFLGALAGKTRVLAT		156
Lb MRPA	TEIGEGV	NLSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDD	PLSALDAHVGERVMEECFLGALAGKTRVLPN		156
Li MRPA	TEIGEGV	NLSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDD	PLSALDAHVGRVQDVIRCRHCKTRVLAT		156
Lm MRPA	TEIGEGV	NLSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDD	PLSALDAHVGRQIVQDVIRCRHCKTRVLAT		156
Lc MRPA	TEIGENG	INLSGGQKARVSLARAVYADRDVYLLDD	PLSALDAQVGERVMRECVCALAGKTRVLAT		156
Lt MRPA	TEIGEGV	NLSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDD	PLSALDAHVGRQIVQDVIRCRHCKTRVLAT		156
Tb MRPA	TEIGEGV	INLSGGQKARVSLARAVYADRDVYLLDD	PLSALDAHVGEIVRDLILCHLACKTRVLAT		156

Figura 7. Alinhamento da sequência de aminoácidos do 1º domínio de ligação de ATP da MRPA (PGPA) de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma brucei* utilizando o algoritmo ClustalW (DNASTAR, Inc.). Os aminoácidos idênticos estão em cinza e os motivos Walker A e B relacionados com a ligação de ATP e a assinatura dos transportadores ABC estão em caixas nomeados por A, B e C respectivamente. Está representado a La MRPA de *L. amazonensis*, a Lb MRPA de *L. braziliensis*, a Li MRPA de *L. infantum*, a Lm MRPA de *L. major* (CAJ03979), a Lc MRPA de *L. chagasi*, a Lt MRPA de *L. tarentolae* (P21441) e a Tb MRPA de *T. brucei* (CAC83020).

A análise por Southern blot utilizando duas diferentes sondas do gene *PRP1*, mostrou que o gene *PRP1* é de cópia única como nas demais espécies estudadas (Fig. 8). A sonda correspondendo a um fragmento de DNA 1,2 kb *PvuII* da região que codifica a 2ª região transmembrana da PRP1 detectou bandas únicas em *L. amazonensis* e *L. chagasi*, fracamente também detectadas em *L. braziliensis* (Fig. 8A). A segunda sonda correspondendo ao primeiro domínio de ligação de ATP da PRP1 detectou bandas em todas as espécies estudadas, inclusive em *L. braziliensis* (Fig. 8B). Considerando que esse experimento foi realizado em condições de moderada estringência, pode-se observar várias bandas já que os domínios de ligação de ATP são altamente conservados entre os membros dos transportadores ABC.

Nenhum transcrito do gene *PRP1* foi detectado a partir de RNA total de formas promastigotas das três espécies de *Leishmania* estudadas em ensaios de Northern blot (dados não mostrados). Porém, em ensaios de RT-PCR, um teste mais sensível, os iniciadores descritos previamente, NBD1F e NBD1R foram capazes de amplificar cDNAs correspondentes ao gene *PRP1* de *Leishmania*. Conforme a análise por RT-PCR em eletroforese em gel de agarose, verificou-se a presença de transcritos a partir de RNA total de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Fig. 9A). Na Figura 9B, detectou-se ainda a presença de transcritos do gene *PRP1* a partir de RNA total de formas amastigotas de *L. amazonensis*. Os mesmos resultados foram observados a partir de RNA total de formas promastigotas e amastigotas de *L. major*, porém nesse caso a síntese de cDNA foi realizada a partir de oligodT (Fig. 9C), diferentemente dos dados observados nas Figuras 9A e 9B, cujos cDNAs foram sintetizados a partir de um iniciador interno do gene *PRP1* de *L. major*. Nesse caso um fragmento específico de cerca de 80 pb foi amplificado por RT-PCR. Esses

dados indicam que o gene *PRP1*, assim como para outros genes dos transportadores ABC de *Leishmania*, apresentam baixos níveis de transcritos, sendo raramente detectados por Northern blot (HENDERSON et al., 1992; PAPADOPOULOU et al., 1994; KATAKURA et al., 1999; PARODI-TALICE et al., 2003) e que sua expressão ocorre em ambas as formas evolutivas do parasito. Dados recentes têm confirmado esses achados e mostram que não existe uma regulação estágio específica de sua expressão gênica em *L. infantum* (LEPROHON et al., 2006).

Figura 8. Análise por Southern blot do DNA genômico de *Leishmania* spp. Cerca de 5 µg de DNA genômico foi digerido, fracionado em gel de agarose 0,9%, transferido para membrana de nylon e hibridizado com as seguintes sondas. (A) Fragmento de DNA de *PvuII* 1,2 kb correspondendo ao segunda região transmembrana da PRP1 de *L. major*. (B) Fragmento de DNA de *PstI* 0,8 kb correspondendo ao primeiro domínio de ligação de ATP da PRP1 de *L. major* (sonda NBDI) (Fig. 1D). Os marcadores de peso molecular são derivados do DNA do fago λ digerido com *HindIII*. Os números correspondem ao DNA genômico de (1) *L. major*, (2) *L. amazonensis*, (3) *L. braziliensis*, (4) *L. chagasi*.

Figura. 9. Análise do RNAm do gene *PRP1* em *Leishmania* spp. Produtos de RT-PCR amplificados com os iniciadores degenerados NBD1F e NBD1R em (A) e (B) e os iniciadores PRP1F2 e PRP1R2 em (C), analisados em eletroforese em gel de agarose 1,2%. Para a síntese de cDNA foi utilizado um iniciador específico do gene *PRP1* de *L. major* (PRP1R) em A e B e oligodT em C em presença de Transcriptase Reversa (+). Para o controle negativo da reação da Transcriptase Reversa, a mesma reação foi realizada em ausência de Transcriptase Reversa (-). Nenhuma amplificação foi obtida em ausência de cDNA. (A) RT-PCR realizado a partir de RNA total de formas promastigotas. (B) RT-PCR realizado a partir de RNA total de formas amastigotas. (C) RT-PCR realizado a partir de RNA total de formas promastigotas (1) e amastigotas (2). Legenda: La – *L. amazonensis*; Lb – *L. braziliensis*; Lm – *L. major*.

4.5 Análise da expressão da PRP1 em formas promastigotas de *L. major*

Para a análise em nível protéico da PRP1 em *L. major*, inicialmente propôs-se a obtenção da proteína recombinante com o intuito de se obter anticorpos específicos anti-PRP1 através da imunização de coelho. A proteína recombinante PRP1 foi expressa em *E. coli* no sistema pGEX em fusão com a proteína GST (Glutathione S-Transferase) de *Schistosoma japonicum*. A expressão foi realizada em *E. coli* (DH10- β) e verificou-se que após a obtenção do extrato protéico a proteína recombinante de cerca de 54 kDa era insolúvel, estando contida nos corpos de inclusão do extrato. Já a GST, uma proteína de 27,5 kDa, estava presente na porção solúvel do extrato bacteriano conforme esperado (Fig. 10). Para a solubilização da proteína recombinante GST-PRP1, os corpos de inclusão foram tratados com uma solução de uréia 8 M segundo protocolo descrito (SIEMERING et al., 1996). Após a confirmação da solubilização por SDS-PAGE, a suspensão da proteína recombinante foi utilizada na purificação com Glutathione Sepharose por cromatografia de afinidade (Fig. 10). A proteína recombinante purificada foi concentrada, e a seguir, utilizada na imunização de um coelho. Verificou-se que o processo de purificação apresentou um baixo rendimento (Fig. 10), quando comparado com o produto da purificação da GST (Fig. 10). Apesar do baixo rendimento, a proteína recombinante GST-PRP1 foi utilizada nas imunizações, e amostras de sangue total foram colhidas para teste sorológico.

Conforme representado na Figura 11, verificou-se por ensaios de Western blot que o soro policlonal anti-GST-PRP1 de coelho foi capaz de reconhecer a proteína recombinante GST-PRP1 de 54 kDa assim como a GST de 27,5 kDa. O mesmo foi

observado para o soro anti-GST previamente disponível no laboratório (Fig. 11). A presença de anticorpos específicos anti-PRP1 presente no soro foi confirmado através da absorção desse mesmo soro com a proteína GST. Segundo os ensaios de Western blot, o soro anti-GST-PRP1 absorvido com GST era capaz de reconhecer a proteína recombinante GST-PRP1, mas não apenas a GST (Fig. 12).

Figura 10. Análise da expressão da proteína recombinante GST-PRP1 em *E. coli*. Análise das proteínas recombinantes GST (1) e GST-PRP1 (2) oriundas dos extratos solúvel e insolúvel respectivamente. As respectivas proteínas, GST (3) e GST-PRP1 (4) foram purificadas por cromatografia de afinidade em presença de Glutathione Sepharose 4B. Legenda: M – Marcador de peso molecular.

Figura 11. Análise do soro policlonal de coelho anti-GST-PRP1 por Western blot. Foram utilizados os seguintes soros: soro pré-imune do coelho (1); soro policlonal de coelho anti-GST previamente disponível no laboratório (2); e soro policlonal de coelho anti-GST-PRP1 (3). As proteínas recombinantes GST e GST-PRP1 foram submetidas a um SDS-PAGE a 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

Figura 12. Análise do soro policlonal de coelho anti-GST-PRP1 absorvido com a proteína GST por Western blot. Foram utilizados os seguintes soros: soro policlonal de coelho anti-GST previamente disponível no laboratório (1); e soro policlonal de coelho anti-GST-PRP1 absorvido com a proteína recombinante GST (2). As proteínas recombinantes GST e GST-PRP1 foram submetidas a um SDS-PAGE a 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

Confirmada a presença de anticorpos específicos anti-PRP1 foram realizados ensaios de Western blot em extratos contendo proteínas de membrana de promastigotas selvagens de *L. major* e do transfectante pSNBR/8kb *Sma*I-B de *L. major*, que superexpressa o gene *PRP1* (Fig. 13). Verificou-se que os anticorpos presentes no soro policlonal de coelho anti-GST-PRP1 detectaram a presença de uma proteína de cerca de 180 kDa nos transfectantes que superexpressam o gene *PRP1*, além de ser fracamente detectada essa mesma proteína em promastigotas selvagens de *L. major* (Fig. 13). Esses dados indicam que a PRP1 é expressa em promastigotas selvagens de *L. major* conforme verificado em ensaios de RT-PCR que detectaram a presença de transcritos do gene *PRP1* nos parasitos selvagens de *L. major* (Fig. 3 e Fig. 9C).

Figura 13. Análise da expressão da PRP1 em formas promastigotas de *L. major*. (A) SDS-PAGE a 8% contendo as proteínas de membrana de promastigotas de *L. major* (Friedlin A1) (1) e do transfectante pSNBR/8kb *Sma*-B (2) coradas com azul de Coomassie como controle das amostras. (B) Western blot das proteínas de membrana de promastigotas de *L. major* e do transfectante pSNBR/8kb *Sma*-B em membrana de nitrocelulose incubadas com soro pré-imune de coelho (SPI); e com soro policlonal de coelho anti-GST-PRP1 (SI). A proteína de cerca de 180 kDa reconhecida pelo soro imune está indicada pela seta.

4.6 Localização celular da PRP1 em formas promastigotas de *L. major*

Para determinar a localização celular da PRP1, o gene *PRP1* foi amplificado por PCR, gerando um fragmento de cerca de 5,4 kb (utilizando os iniciadores PRP1-GFPF e PRP1-GFPR) que foi clonado em fusão com o gene GFP (*Green Fluorescent Protein*) do vetor pXG-/GFP+ (HA et al., 1996).

A construção obtida pXG-PRP1(GFP) foi transfectada em parasitos promastigotas de *L. major* de acordo com protocolo previamente descrito (KAPLER; COBURN; BEVERLEY, 1990) e testados quanto sua capacidade de conferir resistência à pentamidina. A fusão PRP1-GFP era capaz de conferir resistência à pentamidina em cerca de três vezes em relação aos parasitos selvagens (Fig. 14), mesmo nível observado com os transfectantes que superexpressam apenas a PRP1 (COELHO, 2002; COELHO; BEVERLEY; COTRIM, 2003). Além disso, esses transfectantes também apresentavam seu fenótipo de resistência à pentamidina revertido em concentrações não tóxicas de verapamil, como observado nos transfectantes que apenas superexpressam a PRP1 (COELHO, 2002; COELHO; BEVERLEY; COTRIM, 2003). Os valores de IC_{50} para os parasitos transfectados e selvagens em presença de pentamidina foram: *L. major* (Friedlin A1) (IC_{50} = $0,68 \pm 0,07$); pXG-PRP1(GFP) (IC_{50} = $2,24 \pm 0,07$) e pXG-PRP1(GFP) contendo concentrações não tóxicas de verapamil (15 μ M) (IC_{50} = $0,69 \pm 0,09$) (Fig. 14).

Figura 14. Curva de inibição de crescimento em presença de pentamidina dos parasitos transfectados com o DNA do plasmídeo pGX-PRP1(GFP) tratados ou não com 15 µM de verapamil (VER). A curva de inibição de crescimento de parasitos selvagens também está representada. Estão representados três experimentos independentes. Legenda: Lm – *L. major*; PRP1-GFP – plasmídeo pGX-PRP1(GFP); VER – verapamil.

A localização da fusão PRP1-GFP em parasitos vivos foi analisada por microscopia confocal e localizada intracelularmente, na região do bolso flagelar próximo ao cinetoplasto (Fig. 15). Essa mesma localização foi observada para os transportadores ABC MRPA (ABCC3) e MDR1 (ABCB4) de *Leishmania* também envolvidos na resistência à drogas (LÉGARE et al., 1999; DODGE et al., 2004). A fluorescência emitida pela GFP também foi observada em uma estrutura tubular e orientada ao longo do eixo longitudinal dos parasitos (Fig. 15B, 15E e 15F). Esses dados sugerem que a PRP1 esteja associada ao elemento tubulovesicular lisossomal relacionado com as vias endocíticas e exocíticas dos parasitos. A natureza acídica dessa organela foi analisada utilizando-se o marcador Lyso-Tracker-RedTM que marca organelas acídicas como, por exemplo, os endossomos e lisossomos. Esse marcador foi observado por todo o corpo celular do parasito, inclusive no elemento tubulovesicular no qual uma sobreposição com a GFP foi

observada (Fig. 15B, 15C e 15F), indicando assim a natureza ácida de tal organela. No entanto, nenhuma sobreposição foi observada entre o cinetoplasto (kDNA) e a região do bolso flagelar (Fig. 15B, 15D e 15E).

Formas promastigotas de *L. major* foram ainda transfectadas com o plasmídeo pXGFP5 (S65T) (GUEVARA et al., 2001) que expressa o gene *GFP*. Esses transfectantes apresentaram a GFP distribuída por todo o citoplasma do parasito (dados não mostrados), diferentemente do observado nos transfectantes com a construção pXG-PRP1(GFP).

Uma vez que a PRP1 era funcional em outras espécies de *Leshmania*, o DNA da construção pXG-PRP1(GFP) foi transfectado em *L. amazonensis* e *L. infantum* com o intuito de verificar se a proteína de fusão estaria localizada na mesma região observada em *L. major*. Verificou-se inicialmente a funcionalidade da proteína de fusão. Os transfectantes contendo o plasmídeo pXG-PRP1(GFP) apresentavam resistência à pentamidina cujos valores de IC_{50} eram respectivamente: $5,57 \pm 0,71$ para o transfectante do plasmídeo pXG-PRP1(GFP) em *L. infantum* enquanto que os transfectantes contendo o plasmídeo pSNBR o valor de IC_{50} era $1,58 \pm 0,59$. Os transfectantes de *L. amazonensis* apresentavam valores de IC_{50} de $1,88 \pm 0,38$ e de $0,36 \pm 0,02$ para os plasmídeos pXG-PRP1(GFP) e pSNBR respectivamente. Os valores obtidos em ambas as espécies eram estatisticamente significantes segundo o teste *t* de Student (dados não mostrados). Os respectivos parasitos transfectados com o plasmídeo pXG-PRP1(GFP) tinham o seu fenótipo de resistência à pentamidina revertido em presença de concentrações não tóxicas de verapamil, dados esses já observados em *L. major* e descritos nesse estudo (dados não mostrados).

Figura 15. Localização celular da PRP1 em *L. major*. (A) Imagem de contraste diferencial de interferência (DIC). A localização da PRP1 foi determinada pela fluorescência da GFP que está concentrada próximo ao cinetoplasto (seta) e em uma estrutura tubular (triângulo) (B). Organelas ácidas foram marcadas com LysoTracker (C). Para marcar o DNA nuclear e o cinetoplasto utilizou-se Hoechst 33342 (D). Sobreposição de imagens mostrando a localização da PRP1-GFP (ciano) e Hoechst 33342 (vermelho) na imagem DIC. A PRP1 foi observada em um compartimento tubular ao longo do parasita (triângulo), e próximo ao cinetoplasto (seta em E). Sobreposição de imagens B-D mostrando a localização de organelas ácidas (vermelho), DNA nuclear e kDNA (azul) e GFP (amarelo); a co-localização do LysoTracker e da GFP está em amarelo (F). Barra em A = 5 μ M.

A análise por microscopia de fluorescência dos parasitos estudados mostrou que a fusão PRP1-GFP estava localizada intracelularmente (Fig. 16), na mesma região observada em *L. major* (Fig. 15). A fluorescência da GFP estava localizada próximo ao bolso flagelar além de uma menor intensidade de fluorescência ser observada ao longo do corpo celular de ambas as espécies dos parasitos, sendo sugestivo uma localização no elemento tubulovesicular, como observado em *L. major*.

Figura 16. Localização celular da proteína PRP1-GFP em *Leishmania* spp. A proteína de fusão foi localizada por microscopia de fluorescência em *L. infantum* (A-C) e *L. amazonensis* (D-F) ambos transfectados com a construção pXG-PRP1(GFP). Os transfectantes foram observados utilizando filtros apropriados de emissão e excitação para a GFP. A e D – contraste de fase; B e E – fluorescência da GFP; C e F – sobreposição de A e B na Figura C e sobreposição de D e E na Figura F.

4.7 Atividade anti-*Leishmania* da associação pentamidina e verapamil em formas promastigotas

Estudos de suscetibilidade foram realizados na presença de pentamidina. As espécies utilizadas foram: *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*. Diferenças nos valores de IC₅₀ das espécies testadas foram observadas, cuja maior suscetibilidade foi observada em *L. braziliensis* e a menor em *L. infantum* (Tab. 7). Observou-se ainda que as espécies do Velho Mundo, analisadas neste estudo, *L. major* e *L. infantum*, apresentaram maiores valores de IC₅₀ a pentamidina quando comparados com as espécies do Novo Mundo e que são endêmicas no Brasil (Tab. 7). Foram observadas ainda diferenças significativas no valor IC₅₀ a pentamidina entre as diferentes cepas de *L. major* (Friedlin A1 e LV39), embora o IC₅₀ ao verapamil não variou significativamente entre essas duas cepas (Tab. 7).

Determinado o valor de IC₅₀ a pentamidina para as diferentes espécies de *Leishmania*, e considerando que o verapamil é um composto capaz de reverter a resistência mediada pelo transportador ABC PRP1, verificou-se que concentrações não tóxicas desse composto era capaz de aumentar a suscetibilidade à pentamidina nas diferentes espécies de *Leishmania* estudadas (Tab. 7). Independente da espécie estudada, a associação pentamidina e verapamil aumentou a suscetibilidade à pentamidina, cujos valores de IC₅₀ eram significativamente menores quando comparados com os valores de IC₅₀ dos parasitos não tratados com concentrações não tóxicas de verapamil (Tab. 7). Essa associação mostrou-se específica, uma vez que ao associar a vinblastina, uma droga não relacionada a pentamidina, com concentrações não tóxicas de verapamil (15 µM), em parasitos selvagens

promastigotas de *L. major* (Friedlin A1), não foi verificado um aumento significativo da suscetibilidade à vinblastina ($IC_{50} = 17,7 \pm 2,52$ e $IC_{50} = 14,2 \pm 1,53$, em presença de $15 \mu M$ de verapamil) ($p > 0,05$).

Em relação ao verapamil, ambas as cepas de *L. major* foram as que apresentaram maior suscetibilidade a esse composto enquanto que *L. amazonensis* apresentou maior resistência em comparação às demais espécies estudadas (Tab. 7).

Tabela 7. Padrão de suscetibilidade (valor de IC_{50}) verificado para as células selvagens promastigotas de *Leishmania* spp. em presença de pentamidina (PEN), verapamil (VER) e em presença de pentamidina contendo concentrações não tóxicas de verapamil (em parênteses).

Espécie	PEN ($\mu g/mL$)	VER (μM)	PEN (VER)	(p)
<i>L. major</i> (Friedlin A1)	$0,65 \pm 0,15$	$22,5 \pm 1,7$	$0,25 \pm 0,01$ ($15 \mu M$)	$< 0,001$
<i>L. major</i> (LV39)	$1,53 \pm 0,05$	$23,5 \pm 1,3$	$0,65 \pm 0,02$ ($15 \mu M$)	$< 0,001$
<i>L. infantum</i>	$1,70 \pm 0,11$	$37,1 \pm 7,7$	$1,06 \pm 0,21$ ($15 \mu M$)	$< 0,001$
<i>L. amazonensis</i>	$0,37 \pm 0,06$	$58 \pm 4,38$	$0,11 \pm 0,02$ ($20 \mu M$)	$< 0,001$
<i>L. braziliensis</i>	$0,19 \pm 0,07$	35 ± 4	$0,06 \pm 0,012$ ($20 \mu M$)	$< 0,001$
<i>L. chagasi</i>	$0,33 \pm 0,04$	$39,5 \pm 1,28$	$0,10 \pm 0,04$ ($20 \mu M$)	$< 0,001$

A média $\pm$ o desvio padrão dos valores de IC_{50} de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em duplicata está representado para cada espécie testada. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a suscetibilidade à pentamidina dos parasitos tratados com verapamil com os parasitos não tratados com verapamil considerando como significante $p < 0,05$.

4.8 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em formas amastigotas axênicas de *L. infantum*

Para a caracterização do papel do transportador ABC na resistência à pentamidina em formas amastigotas axênicas, formas promastigotas de *L. infantum* transfectadas com o gene *PRP1* (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) ou com o plasmídeo pXG-PRP1(GFP) foram submetidas ao crescimento a 37° C em pH ácido com o intuito dos parasitos se diferenciarem em formas amastigotas axênicas (SERENO; LEMESRE, 1997a). Os transfectantes contendo os plasmídeos pSNBR/8 kb *Sma*I-A (PRP1) e pXG-PRP1(GFP) (PRP1-GFP) eram cerca de 3 e 1,8 vezes respectivamente mais resistentes à pentamidina quando comparados com formas amastigotas axênicas transfectadas com o plasmídeo controle pSNBR (Tab. 8 e Fig. 17). Os valores de IC₅₀ dos três transfectantes estão descritos na Tabela 8.

Verificou-se ainda a suscetibilidade das formas amastigotas axênicas ao verapamil, porém essa forma do parasita era altamente resistentes ao verapamil e apresentava um valor de IC₅₀ = 931 ± 272 µM. Valores esses extremamente altos considerando que concentrações tóxicas de verapamil às células THP-1 humanas são maiores que 100 µM (dados não mostrados).

Figura 17. Curva de inibição de crescimento em presença de pentamidina de formas amastigotas axênicas transfectadas com os plasmídeos pSNBR, PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) e PRP1-GFP [pXG-PRP1(GFP)]. Estão representados três experimentos independentes. Legenda: Li – *L. infantum*.

Tabela 8. Padrão de resistência à pentamidina (valor de IC₅₀) em formas amastigotas axênicas de *L. infantum* transfectadas com os plasmídeos pSNBR, PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) e PRP1-GFP [pXG-PRP1(GFP)].

Espécie	Pentamidina		(n)	(p)
	IC ₅₀ (µg/mL)	Razão de resistência		
Li pSNBR	2,29 ± 0,45	1	3	
Li PRP1	6,61 ± 1,14	3,23 ± 0,95	3	< 0,001
Li PRP1-GFP	3,71 ± 0,42	1,82 ± 0,53	3	< 0,001

A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes está representado para cada linhagem testada.

A Razão de resistência foi definida pela média ± o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com os plasmídeo PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) ou PRP1-GFP [pXG-PRP1(GFP)] pelo valor de IC₅₀ das células transfectadas com o plasmídeo pSNBR. Valores significativamente diferentes do valor do parasito transfectado com o plasmídeo pSNBR (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student considerando como significativo $p < 0,05$.

Legenda: Li – *L. infantum*.

Para confirmar que esses parasitos utilizados neste estudo encontravam-se no estágio de amastigotas, verificou-se a expressão do gene *Amastina*, cuja expressão é específica desse estágio evolutivo do parasito (WU et al., 2000). Através da análise por RT-PCR em tempo real foi verificado que a expressão do gene *Amastina* estava aumentada em cerca de 20 vezes quando comparado com a expressão desse gene em formas promastigotas selvagens de *L. infantum* (Fig. 18).

Uma vez que a proteína de fusão PRP1-GFP era funcional em formas amastigotas axênicas de *L. infantum* (Fig. 17 e Tab. 8), foi verificada a localização desse transportador através da fluorescência da GFP. Através da visualização dos parasitos por microscopia de fluorescência verificou-se que a proteína de fusão localizava-se intracelularmente e próxima da região do bolso flagelar (Fig. 19), a mesma localização que foi observada para as formas promastigotas de *L. infantum* (Fig. 16), assim como para as demais espécies de *Leishmania* analisadas neste estudo (Fig. 15 e Fig. 16).

Figura 18. Análise da expressão do gene *Amastina* por RT-PCR em tempo real em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum* transfectadas com os plasmídeos pSNBR, PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) e PRP1-GFP [pXG-PRP1(GFP)]. A razão de expressão do gene *Amastina* nas formas amastigotas axênicas relativo às formas promastigotas de *L. infantum* são mostradas. Os resultados são uma média de três experimentos independentes preparados a partir de três diferentes preparações de RNA. Legenda: Li – *L. infantum*.

Figura 19. Localização celular da proteína PRP1 em formas amastigotas axênicas de *L. infantum* transfectadas com o plasmídeo PRP1-GFP [pXG-PRP1(GFP)]. Os parasitos foram observados por microscopia de fluorescência utilizando filtros apropriados de emissão e excitação para a GFP. A – contraste de fase; B – fluorescência GFP; C – sobreposição de A e B.

4.9 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em formas amastigotas de *Leishmania* spp.

As formas promastigotas de *Leishmania* spp. transfectadas com o plasmídeo PRP1 (pSNBR/ 8 kb *Sma*I-A) foram utilizadas para infectar a linhagem de monócitos humano THP-1 e uma vez diferenciadas em formas amastigotas intracelulares, estas foram testadas quanto sua suscetibilidade à pentamidina. Anteriormente a infecção, as formas promastigotas eram também transfectadas com o plasmídeo pSP1.2LUC α HYG α que contém o gene da luciferase de vaga-lume para a quantificação dos parasitos (ROY et al., 2000). As espécies estudadas foram: *L. amazonensis*, *L. major* (LV39) e *L. infantum*.

As curvas de inibição de crescimento com as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. major* transfectadas, que superexpressam o gene *PRP1*, mostram que ambos os parasitos eram resistentes à pentamidina apresentando valores de IC₅₀ significativamente maiores quando comparados com os respectivos parasitos transfectados com o plasmídeo vazio (pSNBR) (Tab. 9 e Fig. 20). No entanto, não foi observada resistência à pentamidina para as formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*, mesmo após aumento da droga de seleção G418 (neomicina) em três vezes, o que induziria o número de cópias do plasmídeo PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) e conseqüentemente a expressão do gene *PRP1* (Tab. 9 e Fig. 21).

A **B**

Figura 20. Sobrevivência das formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. transfectadas com os plasmídeos pSNBR e PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) cultivadas em concentrações crescentes de pentamidina. Legenda: RLU – Unidade relativa de luz; (A) La – *L. amazonensis*; (B) Lm – *L. major* (LV39).

A

B

Figura 21. Sobrevivência das formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* transfetadas com os plasmídeos pSNBR e PRP1 (pSNBR/8 kb *Sma*I-A) cultivadas em concentrações crescentes de pentamidina. (A) Transfectantes mantidos em 60 µg/mL de G418; (B) Transfectantes mantidos em 180 µg/mL de G418. Legenda: Li – *L. infantum*; RLU – Unidade relativa de luz.

Tabela 9. Padrão de resistência (valor de IC₅₀) verificado para os transfectantes amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. em presença de pentamidina. O valor de IC₅₀ foi determinado a partir da atividade da luciferase.

Transfectantes	Pentamidina		(n)	(p)
	IC ₅₀ (µg/mL)	Razão de resistência		
<i>Li</i> pSNBR (60 µg/mL G418)	12,4 ± 1,72	1	6	
<i>Li</i> PRP1 (60 µg/mL G418)	10,9 ± 1,34	0,91 ± 0,16	6	ns
<i>Li</i> pSNBR (180 µg/mL G418)	13,02 ± 2,23	1	3	
<i>Li</i> PRP1 (180 µg/mL G418)	12,37 ± 1,64	0,95 ± 0,31	3	ns
<i>Lm</i> pSNBR	5 ± 1,49	1	3	
<i>Lm</i> PRP1	16,13 ± 3,01	3,54 ± 1,25	3	< 0,001
<i>La</i> pSNBR	5,5 ± 1,47	1	3	
<i>La</i> PRP1	16,8 ± 1,69	3,75 ± 0,78	3	< 0,001

A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes, realizados em triplicata, está representado para cada linhagem testada.

A Razão de resistência foi definida quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com o plasmídeo PRP1, pelo valor de IC₅₀ dos transfectantes com o plasmídeo pSNBR. Valores significativamente diferentes do valor parasito transfectado com o plasmídeo pSNBR (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student considerando como significativo $p < 0,05$. ns – não significativo ($p > 0,05$).

As concentrações de pentamidina estão em µg/mL. As formas promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis* utilizadas para a infecção das células THP-1 eram mantidas em 60 µg/mL de G418 e 300 µg/mL de higromicina B.

Legenda: Li – *L. infantum*; Lm – *L. major* (LV39); La – *L. amazonensis*.

Os dados apresentados indicaram que o gene *PRP1* de *L. major* (Friedlin V1) era funcional em formas amastigotas de *L. major* (cepa LV39) assim como na espécie heteróloga *L. amazonensis*, mas não era funcional em formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* (Fig. 20; Fig. 21 e Tab. 9).

4.10 Atividade anti-*Leishmania* da associação pentamidina e verapamil em formas amastigotas

A suscetibilidade à pentamidina em formas amastigotas intracelulares selvagens de *L. amazonensis*, *L. major* (LV39) e *L. infantum* foi analisada, cujos valores de IC₅₀ estão apresentados na Tabela 10. A espécie que apresentou maior suscetibilidade à pentamidina foi *L. major* e a menor *L. infantum* (Tab. 10).

A superexpressão do transportador ABC PRP1 era capaz de mediar resistência à pentamidina em formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Tab. 9, Fig. 20 e Fig. 21). Diante desses dados, passou-se a verificar se a associação pentamidina e verapamil era capaz de aumentar a suscetibilidade à pentamidina em parasitos selvagens. A Tabela 10 mostra um aumento da suscetibilidade à pentamidina quando associado ao verapamil nas três espécies de *Leishmania*. No entanto, ao que parece, o transportador ABC PRP1 não parece ser o principal alvo do verapamil que afeta a suscetibilidade à pentamidina. Isso porque quando foram testados transfectantes de *L. infantum* para o gene *PRP1*, que não é capaz de conferir resistência à pentamidina em formas amastigotas (Fig. 21 e Tab. 9), o verapamil também era capaz de aumentar a suscetibilidade à pentamidina (IC₅₀ = 10,9 ± 1,34 e IC₅₀ = 5,57 ± 2,28 em presença de 20 µM de verapamil) (p < 0,05), o que indica que nesse caso, este transportador ABC não deve ser o principal alvo do verapamil.

Tabela 10. Suscetibilidade (valor de IC₅₀) verificada para as formas amastigotas selvagens intracelulares de *Leishmania* spp. transfectadas com o plasmídeo pSP1.2LUC α HYG α . O valor de IC₅₀ foi determinado a partir da atividade da luciferase testadas em presença de pentamidina (PEN), verapamil (VER) e em presença de pentamidina contendo concentrações não tóxicas de verapamil (em parênteses).

Espécie	PEN (μ g/mL)	VER (μ M)	PEN (VER)	(p)
<i>L. amazonensis</i>	6,8 $\pm$ 1,2	19,1 $\pm$ 3,9	2,8 $\pm$ 0,3 (15 μ M)	< 0,05
<i>L. major</i>	5,1 $\pm$ 1,5	40,3 $\pm$ 10,1	3,2 $\pm$ 0,3 (15 μ M)	< 0,05
<i>L. infantum</i>	10,0 $\pm$ 1,7	43,2 $\pm$ 7,1	4,7 $\pm$ 1,7 (20 μ M)	< 0,05

A média $\pm$ o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em duplicata está representado para cada espécie testada. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a suscetibilidade à pentamidina dos parasitos tratados com verapamil com os parasitos não tratados com verapamil considerando como significante $p < 0,05$.

4.11 Caracterização dos mutantes de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina

Uma outra abordagem analisada neste estudo está relacionada com a caracterização de mutantes de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina. Uma vez que o transportador ABC PRP1 está envolvido na resistência à pentamidina quando transfectado e superexpresso, foram gerados mutantes resistentes à pentamidina com o intuito de verificar se esse gene estaria envolvido nos mecanismos de resistência em *Leishmania*. Foram selecionadas duas linhagens mutantes promastigotas de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina: PEN^r 0,5 e PEN^r 5. O mutante PEN^r 0,5 foi mantido em uma concentração de 0,5 μ g/mL de pentamidina por um período de cerca de 6 meses (cerca de 50 passagens). O mutante PEN^r 5 foi selecionado após sucessivas passagens em concentrações crescentes de

pentamidina, iniciando com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e atingindo valores de até 5 $\mu\text{g/mL}$ de pentamidina. Considerando o valor de IC_{50} dos parasitos selvagens de *L. amazonensis* que é de $0,37 \pm 0,06$ (Tab. 7), os mutantes $\text{PEN}^r 0,5$ e $\text{PEN}^r 5$ apresentaram uma razão de resistência em relação ao parasito selvagem de 9 e 22 vezes respectivamente (Tab. 11). Os valores apresentados eram estatisticamente significantes quando comparava-se os valores de IC_{50} de ambos os mutantes com o parasito selvagem ($p < 0,001$). Esses dados indicam que ambos os mutantes estavam altamente adaptados às altas concentrações de pentamidina. Na Figura 22, está representado a curva de inibição de crescimento em presença de pentamidina do parasito selvagem de *L. amazonensis* e dos mutantes $\text{PEN}^r 0,5$ e $\text{PEN}^r 5$.

Os mutantes $\text{PEN}^r 0,5$ e $\text{PEN}^r 5$ foram ainda testados se estes apresentavam resistência cruzada ao PATH. Diferentemente do observado nos transfectantes de *L. amazonensis* que superexpressam a PRP1, e são resistentes à pentamidina e ao PATH, nenhuma resistência cruzada ao PATH foi observada nos mutantes (Tab. 11). Similarmente, em relação ao verapamil, nenhuma resistência cruzada foi observada para os mutantes $\text{PEN}^r 0,5$ e $\text{PEN}^r 5$ (Tab. 11). De fato, foi observado um aumento da suscetibilidade ao verapamil no mutante $\text{PEN}^r 5$ quando comparado com o parasito selvagem (Tab. 11) cujo valor era estatisticamente significativo ($p < 0,001$). Por outro lado, o mutante $\text{PEN}^r 0,5$ não apresentou diferença significativa em relação ao valor de IC_{50} ao verapamil quando comparado com o parasito selvagem (Tab. 11) ($p > 0,05$).

Tabela 11. Resistência à pentamidina e resistência cruzada ao PATH e ao verapamil (valor de IC_{50}) nos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 de *L. amazonensis*.

Droga	IC_{50}			Razão de resistência	
	La	PEN^r 0,5	PEN^r 5	PEN^r 0,5	PEN^r 5
Pentamidina	$0,37 \pm 0,06$	$3,3 \pm 1,25$	$8,2 \pm 0,7$	9	22
PATH	$58,1 \pm 15,7$	$73 \pm 12,4$	$67,6 \pm 16,1$	1,3	1,2
Verapamil	$58 \pm 4,4$	$57 \pm 11,04$	$42,4 \pm 3,1$	0,98	0,73

A média $\pm$ o desvio padrão dos valores de IC_{50} de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em duplicata está representado para cada linhagem testada.

A Razão de resistência foi definida quando se dividia o valor de IC_{50} dos mutantes PEN^r 0,5 ou PEN^r 5, pelo valor de IC_{50} do parasito selvagem de *L. amazonensis*.

As concentrações de pentamidina e PATH estão em $\mu\text{g/mL}$ e de verapamil em μM .

Legenda: La – *L. amazonensis*.

Figura 22. Curva de inibição de crescimento dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 e do parasito selvagem de *L. amazonensis* em presença de concentrações crescentes de pentamidina.

Em relação às taxas de crescimento em fase logarítmica, os mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 apresentaram um tempo de duplicação de 6,4 e 16 horas enquanto que os parasitos selvagens apresentavam um tempo de duplicação de 6 horas (Fig. 23). No mutante PEN^r 5 ainda foi observado uma menor densidade de parasitos na fase estacionária de crescimento, quando comparado com os parasitos selvagens, fenômeno não observado no mutante PEN^r 0,5 (Fig. 23).

Figura 23. Crescimento *in vitro* dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5, do parasito selvagem de *L. amazonensis* e do mutante PEN^r 5 cultivado por 6 meses em ausência de pentamidina (-PEN 6 meses). Foram feitos inoculos de 2×10^5 /mL parasitos que foram contados durante intervalos de 24 horas. A média de três experimentos independentes está representado.

Após o cultivo dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 por 2 ou 6 meses em ausência de pentamidina, observou-se que os níveis de resistência eram estáveis quando comparado com os parasitos selvagens, apesar de ter havido um decréscimo no nível de resistência para ambos os parasitos (Tab. 12 e Fig. 24). Em relação ao verapamil, foi observado no mutante PEN^r 5, um aumento dos níveis de resistência

ao verapamil ($IC_{50} = 54,75 \pm 12,5$) cujo valor não diferia significativamente do parasito selvagem ($IC_{50} = 58 \pm 4,4$) (Tab. 11) ($p > 0,05$), mas que diferia significativamente quando comparado com a linhagem PEN^r 5 cultivada em presença de pentamidina ($IC_{50} = 42,4 \pm 3,1$) (Tab. 11) ($p < 0,05$). O mutante PEN^r 0,5 cultivado 6 meses em ausência de pentamidina, não variou seu valor de IC_{50} ao verapamil significativamente ($IC_{50} = 55,8 \pm 9,96$), quando comparado com a linhagem mantida em presença de pentamidina ($IC_{50} = 57 \pm 11,04$) (Tab. 11) ($p > 0,05$). Observou-se ainda que após o cultivo por 6 meses em ausência de pentamidina o mutante PEN^r 5 apresentava um tempo de duplicação de 7,5 horas, um valor próximo ao observado para os parasitos selvagens (6 horas) (Fig. 23).

Tabela 12. Resistência à pentamidina (valor de IC_{50}) verificado para os mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 cultivados por 2 e 6 meses em ausência de pentamidina.

Linhagem celular	PEN ($\mu g/mL$)	(p)
PEN^r 0,5	$3,3 \pm 1,25$	
PEN^r 0,5 (-PEN 2 meses)	$1,51 \pm 0,18$	$< 0,001$
PEN^r 0,5 (-PEN 6 meses)	$1,4 \pm 0,18$	$< 0,001$
PEN^r 5	$8,2 \pm 0,7$	
PEN^r 5 (-PEN 2 meses)	$2,8 \pm 0,3$	$< 0,001$
PEN^r 5 (-PEN 6 meses)	$2,5 \pm 0,58$	$< 0,001$

A média $\pm$ o desvio padrão dos valores de IC_{50} de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em duplicata está representado para cada linhagem testada. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a resistência à pentamidina dos parasitos cultivados em ausência de pentamidina por 2 ou 6 meses com os respectivos parasitos cultivados em presença de pentamidina considerando como significativo $p < 0,05$.

Legenda: PEN – pentamidina.

A **B**

Figura 24. Curva de inibição de crescimento em concentrações crescentes de pentamidina dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 após 2 e 6 meses de cultivo em ausência de pentamidina. (A) Linhagem do mutante PEN^r 0,5 cultivado por 2 e 6 meses em ausência de pentamidina. (B) Linhagem do mutante PEN^r 5 cultivado por 2 e 6 meses em ausência de pentamidina.

De maneira similar ao observado nos transfectantes que superexpressam a PRP1, os mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 apresentaram a reversão do fenótipo de resistência à pentamidina quando tratados com concentrações não tóxicas de verapamil (Tab. 13). Um efeito significativo foi observado no mutante PEN^r 5 tratado com verapamil cujo valor de IC₅₀ era próximo ao valor de IC₅₀ a pentamidina do parasito selvagem (Tab. 13). No mutante PEN^r 0,5, o efeito de reversão do fenótipo de resistência não foi tão significativo, cujo valor de IC₅₀ caiu aproximadamente pela metade em relação aos parasitos não tratados com verapamil (Tab. 13). Na Figura 25, está representado a curva de inibição de crescimento em presença de concentrações crescentes de pentamidina dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 tratados com concentração não tóxica de verapamil.

Quando tratado com concentração não tóxica de verapamil, o mutante PEN^r 5 mantido por 6 meses em ausência de pentamidina apresentou um valor de IC₅₀ de $0,31 \pm 0,05$, valor esse similar ao observado no mutante PEN^r 5 cultivado em presença de pentamidina tratado com verapamil (Tab. 13).

Tabela 13. Resistência à pentamidina (valor de IC₅₀), verificado para os mutantes resistentes à pentamidina PEN^r 0,5 e PEN^r 5, em presença de pentamidina (PEN) contendo concentrações não tóxicas de verapamil (VER) (em parênteses).

Linhagem celular	PEN (µg/mL)	PEN (VER)	(p)
<i>L. amazonensis</i>	$0,37 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,02$ (20 µM)	< 0,001
PEN ^r 0,5	$3,3 \pm 1,25$	$1,54 \pm 0,11$ (20 µM)	< 0,001
PEN ^r 5	$8,2 \pm 0,7$	$0,41 \pm 0,06$ (20 µM)	< 0,001
PEN ^r 5 (-PEN 6 meses)	$2,5 \pm 0,58$	$0,31 \pm 0,05$ (20 µM)	< 0,001

A média $\pm$ o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em duplicata está representado para cada linhagem testada. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a resistência à pentamidina dos parasitos tratados com verapamil com os parasitos não tratados com verapamil considerando como significante $p < 0,05$.

A

B

Figura 25. Curva de inibição de crescimento dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 em presença de pentamidina tratados com concentração não tóxica de verapamil (20 μM). (A) Linhagem do mutante PEN^r 0,5 tratado ou não com verapamil. (B) Linhagem do mutante PEN^r 5 tratado ou não com verapamil.

4.12 Caracterização molecular dos mutantes de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina

Em *Leishmania* spp., a amplificação gênica constitui um importante mecanismo relacionado com células resistentes à drogas (BEVERLEY, 1991; OUELLETTE, BORST, 1991; SEGOVIA, 1994; BORST, OUELLETTE, 1995). Os produtos oriundos da amplificação de DNA apresentam-se em múltiplas cópias de DNAs extracromossomais lineares e/ou circulares e podem constituir de 5 a 10% do DNA genômico total (CODERRE et al., 1983; BEVERLEY et al., 1984; ELLENBERGER, BEVERLEY 1989; OLMO et al., 1995). Diante desses dados, estudos moleculares através da análise do DNA genômico dos parasitos mutantes resistentes à pentamidina de *L. amazonensis* foram realizados, com o intuito de verificar a existência de possíveis DNAs amplificados nesses mutantes.

Inicialmente, foi verificado a presença de possíveis fragmentos de restrição amplificados nas linhagens resistentes à pentamidina, através da digestão de DNA genômico total. No entanto, nenhuma banda mostrou-se mais intensa nos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 comparado com os parasitos selvagens (Fig. 26A). Investigou-se ainda a presença de DNAs circulares através de um protocolo padrão de extração de DNA plasmidial através de lise alcalina. A análise através da eletroforese em gel de agarose mostrou a ausência de amplificação, com exceção dos parasitos controle transfectados com o plasmídeo pSP1.2LUC α HYG α (Fig. 26B). Finalmente, um PFGE foi realizado contendo os cromossomos dos parasitos mutantes e selvagens, porém nenhuma amplificação foi observada nesta análise (Fig. 26C). Esses dados mostram que nenhum sinal de amplificação de DNA foi observado nesses mutantes,

quando comparado com os parasitos selvagens, indicando que o mecanismo de resistência não deve estar relacionado com a amplificação gênica (Fig. 26). No caso de mutantes resistentes ao metotrexato, antimônias, terbinafina e anfotericina B observa-se facilmente a presença de DNA amplificados em análises através da digestão total de DNA genômico dos parasitos resistentes (ELLENBERGER; BEVERLEY, 1989; SINGH; PAPADOPOULOU; OUELLETTE, 2001).

Figura 26. Caracterização molecular dos mutantes resistentes à pentamidina de *L. amazonensis* para a detecção de DNAs amplificados. (A) Análise em eletroforese em gel de agarose do DNA genômico dos parasitos digeridos com as enzimas de restrição indicadas. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda em kb. (B) Análise em eletroforese em gel de agarose de DNAs cíclicos isolados por protocolo padrão através de lise alcalina. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda em kb. A seta indica o DNA do plasmídeo pSP1.2LUC α HYG α . (C) PFGE dos cromossomos do parasito selvagem e dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda em Mb e corresponde aos cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad). Legenda: 1 – *L. amazonensis*; 2 - PEN^r 0,5; 3 - PEN^r 5; 4 - *L. amazonensis* transfectada com o plasmídeo pSP1.2LUC α HYG α .

Conforme descrito neste estudo, a amplificação e a consequente superexpressão do gene *PRP1* é capaz de conferir resistência à pentamidina em transfectantes de *L. major* assim como em outras espécies de *Leishmania*. Considerando que a amplificação desse gene poderia conferir resistência à pentamidina, analisou-se por Southern blot o DNA dos parasitos mutantes utilizando como sonda um fragmento específico do gene *PRP1* de *L. major*. Esses dados indicaram a ausência de amplificação do gene *PRP1* (Fig. 27). A análise por FIGE e PFGE mostrou somente o DNA amplificado do plasmídeo PRP1 (pSNBR/8 Kb *Sma*I-A) nos parasitos transfectados com esse DNA circular (Fig. 27A e Fig. 27B). Os experimentos de Southern blot das análises realizadas por FIGE e PFGE indicaram um forte sinal nos DNA circulares amplificados que contêm o gene *PRP1* (plasmídeo pSNBR/8 Kb *Sma*I-A), enquanto que nenhum sinal significativo foi observado nos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5, comparado com o parasito selvagem (Fig. 27A e Fig. 27B). Finalmente, o Southern blot realizado a partir de DNA genômico dos parasitos mutantes e selvagem digerido com a enzima de restrição *Pst*I, mostrou a ausência de amplificação do gene *PRP1*, indicando definitivamente que esse gene não se encontra amplificado nos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 (Fig. 27C).

Figura 27. Caracterização molecular dos mutantes resistentes à pentamidina de *L. amazonensis* para a detecção de amplificação do gene *PRP1*. (A) PFGE dos cromossomos dos parasitos selvagem e dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda em kb e corresponde aos concatêmeros do fago λ . (B) FICE dos cromossomos dos parasitos selvagem e dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda em kb e corresponde ao 8-48 kb ladder (Bio-Rad) e o DNA do fago λ digerido com *HindIII*. O DNA de ambos os géis (A e B) foram transferidos para membrana de nylon, e hibridizados com um fragmento de DNA *PvuII* de 1,2 kb do gene

PRP1 correspondendo ao 2º domínio transmembrana da *PRP1* de *L. major*. (C) Análise por Southern blot para detecção de amplificação do gene *PRP1*. O DNA dos parasitos foram digeridos com a enzima de restrição *Pst*I e hibridizado com a mesma sonda descrita acima. O padrão de peso molecular está indicado à esquerda em kb e corresponde ao DNA do fago λ digerido com *Hind*III. Essa membrana foi reibridizada com uma sonda do gene de Tubulina. Legenda: 1 – *L. amazonensis*; 2 - PEN^r 0.5; 3 - PEN^r 5; 4 - *L. amazonensis* transfectada com o plasmídeo pSNBR/8kb *Sma*I-A. c – zona de compressão.

Finalmente foi verificado se os mutantes resistentes à pentamidina apresentavam alterações na expressão do gene *PRP1*, uma vez que já foi demonstrado alterações nos níveis de RNAm de genes não associados à amplificação gênica (GUIMOND et al., 2003; MARQUIS et al., 2005). Inicialmente, foi realizado um ensaio de RT-PCR a partir de RNA total dos parasitos e foi detectado a presença de transcritos do gene *PRP1* nas três linhagens estudadas, utilizando duas diferentes estratégias (Fig. 28). Para a quantificação desses transcritos foram realizados ensaios de RT-PCR em tempo real a partir de RNA total de formas promastigotas da linhagem selvagem e dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5. Conforme representado na Figura 29, não foram observadas alterações significativas nos níveis de transcritos do gene *PRP1*, ao comparar os mutantes com o parasito selvagem.

A

B

Figura 28. Identificação de transcritos do gene *PRP1* nos mutantes resistentes à pentamidina PEN^r 0,5 e PEN^r 5. Produtos de RT-PCR amplificados com os iniciadores degenerados NBD1F e NBD1R (A) ou PRP1F2 e PRP1R2 (B) e analisados em eletroforese em gel de agarose 1,2%. Para a síntese de cDNA foi utilizado um primer específico do gene *PRP1* de *L. major* (PRP1R) em presença de Transcriptase Reversa (+) (A) ou oligodT (B). O produto específico de cerca de 80 pb está indicado por uma seta (B). Para o controle negativo da reação da Transcriptase Reversa, a mesma reação foi realizada em ausência de Transcriptase Reversa (-). Nenhuma amplificação foi obtida em ausência de cDNA. Legenda: 1 – *L. amazonensis*; 2 – PEN^r 0,5; 3 – PEN^r 5.

Razão de expressão	
<i>L. amazonensis</i>	1
PEN ^r 0.5	0,98 ± 0,32
PEN ^r 5	1,07 ± 0,32

Figura 29. Análise da expressão do gene *PRP1* por RT-PCR em tempo real em formas promastigotas de *L. amazonensis* e dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5. A razão de expressão do gene *PRP1* dos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5 relativo as formas promastigotas de *L. amazonensis* são mostrados. Os resultados são uma média de três experimentos independentes preparados a partir de três diferentes preparações de RNA. Legenda: La – *L. amazonensis*.

5 Discussão

5.1 Análise molecular do gene *PRP1* de *Leishmania*

Foi descrito neste trabalho a caracterização do gene *PRP1* (*ABCC7*) de *L. major* que codifica uma proteína transportadora pertencente à família de transportadores ABC. Esse gene foi isolado por clonagem funcional através de metodologia descrita por Cotrim, Garrity e Beverley (1999). Como se sabe, a pentamidina é um composto de segunda linha utilizado na terapêutica da leishmaniose, sobretudo de casos que apresentam resistência ao tratamento convencional a base de antimônios. Devido ao pouco conhecimento sobre o mecanismo de ação da pentamidina no parasita, foi proposto o isolamento de genes relacionados com a resistência, a partir de bibliotecas genômicas que têm a capacidade de superexpressão extracromossomal dos genes clonados no vetor cosmídeo cLHYG por indução do aumento do número de cópias, considerando que a amplificação gênica constitui um importante mecanismo de resistência à drogas em *Leishmania* (BEVERLEY, 1991; SEGOVIA, 1994; BORST; OUELLETTE, 1995; OLMO et al., 1995). Assim, utilizando esta estratégia, foram isolados os cosmídeos cosPen1-A e cosPen1-B, pertencentes ao mesmo *locus* (Fig. 1), capazes de conferir resistência à pentamidina. A caracterização do *locus* foi feita a partir de deleções através de digestão parcial com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRV* e posterior subclonagem e sequenciamento de nucleotídeos (Fig. 1) (COELHO, 2002; COELHO; BEVERLEY; COTRIM, 2003). Através dessa análise foi identificado que o transportador ABC PRP1 era capaz de conferir resistência à pentamidina quando transfectado e amplificado seu número de cópias no parasito, o primeiro descrito envolvido na resistência a esse composto em *Leishmania*.

A análise molecular do gene *PRP1* de *L. major* mostrou que esse gene é de cópia única (Fig. 2), dado de acordo o Projeto Genoma de *L. major*. Esse gene está localizado no cromossomo 31, um cromossomo de 1.500 kb (LEPROHON, 2006). Além do gene *PRP1* (*ABCC7*), estão localizados nesse mesmo cromossomo os genes dos transportadores ABC, *PGPE* (*ABCC4*), *PGPD* (*ABCC5*) e *ABCC6*, todos eles membros da subfamília ABCC e provavelmente originados por eventos de duplicação gênica (LEPROHON et al., 2006). Nenhum dos 8 membros dessa subfamília apresentam ortólogos nos parasitos do gênero *Trypanosoma*, *T. brucei* e *T. cruzi* (LEPROHON et al., 2006), com exceção da MRPA (*ABCC3*) de *T. brucei* envolvida na resistência ao melarsoprol (SHAHI; KRAUTH-SIEGEL; CLAYTON, 2002). O gene *PRP1* encontra-se conservado em outras espécies do gênero *Leishmania*, inclusive em *L. braziliensis*, a única espécie do subgênero *Viannia* analisada neste estudo (Fig. 5, Fig. 6, Fig. 8 e Tab. 5), demonstrando esse transportador ABC ser específico do gênero *Leishmania*. Iniciadores degenerados assim como sondas específicas de diferentes regiões do gene *PRP1* detectaram a presença de tal gene nas espécies estudadas. Tal estratégia já foi demonstrada em *Leishmania* e *T. brucei* e é capaz de detectar seqüências de nucleotídeos relacionadas com esses transportadores (HENDERSON et al., 1992; LÉGARÉ; HETTEMA; OUELLETTE, 1994; MASER; KAMINSKY, 1998). Somente em *L. chagasi*, os iniciadores degenerados não amplificaram seqüências relacionadas ao gene *PRP1* (Fig. 5), embora os experimentos por Southern blot com sondas específicas desse gene, indicaram que o gene *PRP1* está presente nesta espécie (Fig. 8). Diferenças nas seqüências de nucleotídeos dos genes das diferentes espécies podem explicar a dificuldade de obtenção do respectivo fragmento de DNA. Para exemplificar esse fato, os iniciadores PRP1F2 e PRP1R2 dirigidos para o gene

PRP1 de *L. major* amplificavam um fragmento específico a partir de DNA genômico de *L. amazonensis* assim como de *L. major*, mas não em *L. infantum* (dados não mostrados). Dentre as seqüências de aminoácidos do 1º domínio de ligação de ATP do transportador *PRP1* das espécies estudadas, foi observada uma identidade de cerca de 80% (Tab. 5 e Fig. 6). Já entre as seqüências do transportador *MRPA*, foi encontrada uma identidade média de 75% entre os membros analisados, neste caso 6 espécies de *Leishmania* e *T. brucei* (Tab. 6 e Fig. 7). Em ambos os casos, observa-se que o domínio de ligação de ATP dos transportadores ABC mostram-se bastante conservados, conforme já descrito por outros autores (HIGGINS, 1992; LEPROHON et al., 2006).

A análise por Northern blot indicou a presença de transcritos do gene *PRP1* apenas nos transfectantes promastigotas pSNBR/8 kb *Sma*I-A e cosPEN1-A, mas não nos parasitos selvagens de *L. major* (Fig. 3). No primeiro transfectante foram detectadas duas bandas: uma de 6 kb, tamanho suficiente para codificar a *PRP1*, e uma de cerca de 4,4 kb (Fig. 3A). Transcritos de tamanho incompatível, além daquele da fase de leitura predita, já foram observados em mutantes e transfectantes contendo DNAs circulares em várias espécies de *Leishmania* (KAPLER; BEVERLEY, 1989; KAPLER; ZHANG; BEVERLEY, 1990; HENDERSON et al., 1992; KATAKURA et al., 1999; WONG; CHOW; WIRTH, 1994). Já os transfectantes contendo o cosmídeo cosPEN1-A apresentaram um único transcrito, maior do que 10 kb (Fig. 3B). Os dados apresentados estão de acordo com o observado por outros autores que mostram que a detecção de transcritos de transportadores ABC por Northern blot são raramente detectados em promastigotas selvagens, devido aos baixos níveis de expressão desses genes (OUELLETTE; FASE-FOWLER; BORST, 1990; HENDERSON et al., 1992; PAPADOPOULOU et

al., 1994; CHIQUERO et al., 1998; ANACLETO et al., 2003; PARODI-TALICE et al., 2003; KATAKURA et al., 2004; ARAUJO-SANTOS et al., 2005). Mesmo considerando a ausência de transcritos para os respectivos transportadores ABC MDR1 e MRPA por Northern blot em parasitos selvagens (HENDERSON et al., 1992; PAPADOPOULOU et al., 1994), os mutantes nulos para os respectivos genes apresentaram um aumento na suscetibilidade às respectivas drogas: vinblastina (MDR1) e os antimonias (MRPA) (DODGE et al., 2004; PAPADOPOULOU et al., 1996), indicando que esses transportadores são expressos e funcionais em parasitos selvagens. Resultados prévios do *knockout* de um dos alelos do gene *PRP1* em formas promastigotas de *L. infantum*, também mostrou um aumento da suscetibilidade à pentamidina nesses parasitos. A geração de mutantes nulos para o gene *PRP1*, seria de grande valia para uma melhor compreensão do papel desse transportador ABC no metabolismo em *Leishmania* assim como na suscetibilidade à pentamidina e aos antimonias trivalentes os quais a PRP1 confere resistência cruzada.

Em ensaios por RT-PCR utilizando iniciadores internos ao gene *PRP1*, produtos específicos foram detectados tanto em parasitos selvagens quanto em diferentes transfectantes promastigotas de *L. major* (Fig. 3C). Esses mesmos iniciadores foram capazes de amplificar fragmentos específicos de cerca de 600 pb correspondendo aos transcritos do gene *PRP1* de formas promastigotas de outras espécies de *Leishmania* (Fig. 9A). Transcritos a partir de formas amastigotas de lesão por *L. amazonensis* também foram detectados por RT-PCR, utilizando iniciadores internos que correspondem ao 1º domínio de ligação de ATP da PRP1 (Fig. 9B). Além disso, quando utilizado oligodT para a síntese de cDNA, transcritos do gene *PRP1* foram detectados por RT-PCR em formas promastigotas e

amastigotas de *L. major* o que indica a presença de transcritos maduros em ambos os estágios evolutivos do parasito (Fig. 9C). Leprohon et al. (2006) demonstraram resultados similares por DNA microarray em *L. infantum*, cuja expressão do gene *PRP1* ocorre em ambos os estágios evolutivos embora não haja uma expressão diferencial significativa para esse gene. Apenas o gene *ABCF3* apresentou maior expressão na forma promastigotas enquanto que os genes *ABCA3*, *ABCG3* e *ABCF2* estão superexpressos nas formas amastigotas (LEPROHON et al., 2006). No entanto, o papel desses transportadores ABC no metabolismo do parasito ainda é incerto (LEPROHON et al. 2006). Interessantemente, não foi observada nenhuma regulação diferencial entre os dois principais estágios evolutivos, para os membros da família ABCC conhecida por fornecer proteção a um grande número de substâncias endobióticas e xenobióticas (DEELEY; WESTLAKE; COLE, 2006), dos quais um membro está envolvido na proteção a xenobióticos, a MRPA (ABCC3) (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU et al., 1994; LÉGARÉ et al., 2001b) além da PRP1 (ABCC7) conforme descrito neste estudo.

Os experimentos por Western Blot utilizando soro policlonal anti-GST-PRP1 detectaram em extratos de membrana de *L. major* a presença de uma proteína de cerca de 180 kDa em transfectantes que superexpressam a PRP1, assim como em parasitos selvagens. O tamanho da banda corresponde ao peso molecular predito da sequência de nucleotídeos (COELHO, 2002; COELHO BEVERLEY; COTRIM, 2003). Esses dados vêm a confirmar uma baixa expressão desses transportadores ABC em parasitos selvagens em nível protéico, como observado em *Leishmania* para a MRPA (ABCC3) (LÉGARÉ et al., 1997), MDR1 (ABCB4) (CHIQUEIRO et al., 1998) e LtrABC1.1 (ABCA8) (PARODI-TALICE et al., 2003) e em *T. brucei* para a

MRPA (ALIBU et al., 2006), o que indica que os transportadores ABC são funcionais e devem exercer um papel importante na suscetibilidade à drogas em *Leishmania*.

5.2 Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em *Leishmania*

Um grande número de genes dos transportadores ABC estão distribuídos no genoma de *Leishmania*, sua grande maioria é de função desconhecida e apenas alguns deles têm sido demonstrados como capazes de conferir resistência à drogas no parasito (Tab. 1) (LEPROHON et al., 2006). Segundo estes autores, existem 42 transportadores ABC distintos em *Leishmania*, um número bem maior quando comparado com os outros tripanossomatídeos causadores de doenças no homem: *T. brucei* (22) e *T. cruzi* (28) (LEPROHON et al., 2006). Apesar do papel da PRP1 ser desconhecido no metabolismo de *Leishmania*, foi verificado que esse transportador ABC era capaz de conferir resistência à pentamidina e aos antimoniais trivalentes, mas não aos pentavalentes (Tab. 2). Além da PRP1, a MRPA (ABCC3) também é capaz de conferir resistência aos antimoniais pentavalentes e trivalentes e ao arsenito, cujo fenótipo foi descrito em outras espécies de *Leishmania* (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU et al., 1994; LÉGARÉ et al. 1997; ANACLETO et al., 2003). A MDR2 (ABCB2) diminui a acumulação celular do 5-fluorouacil (KATAKURA et al., 2004) enquanto a MDR1 (ABCB4) confere resistência à vinblastina, daunomicina e puromicina em *Leishmania* spp. (HENDERSON et al., 1992; CHOW et al., 1993; GUEIROS-FILHO et al., 1995; CHIQUERO et al., 1998; KATAKURA et al., 1999) e resistência cruzada à miltefosina

e a edelfosina (PEREZ-VICTORIA et al., 2001a). Recentemente foi descrito o primeiro membro da subfamília ABCG também envolvido na resistência à miltefosina em *L. infantum*, o LiABCG4 (CASTANYS-MUÑOZ et al., 2007). Diferentemente dos demais transportadores ABC envolvidos na resistência à drogas em *Leishmania* (subfamílias ABCB e ABCC), o LiABCG4 é constituído apenas por um domínio transmembrana e um domínio de ligação de ATP, além desses domínios apresentarem-se de maneira invertida em relação as outras duas subfamílias (Tab. 1) (LEPROHON et al., 2006). Esses dados demonstram que os transportadores ABC exercem papel importante na resistência aos principais compostos utilizados na quimioterapia das leishmanioses mesmo considerando que todos esses estudos foram realizados em formas promastigotas do parasito.

Os dados apresentados quanto à localização da proteína de PRP1-GFP são consistentes, uma vez que a proteína de fusão era funcional em ambos os estágios evolutivos, assim como nas diferentes espécies estudadas. Resultados similares foram observados para os transportadores ABC MRPA e MDR1, que se apresentaram funcionais, ou seja, conferiam resistência à drogas (LÉGARÉ et al., 2001b; DODGE et al., 2004; EL FADILI et al., 2005).

A PRP1 mostrou estar localizada intracelularmente, próxima a região do bolso flagelar, tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas axênicas (Fig. 15 e Fig. 16). Além disso, uma estrutura longitudinal disposta ao longo do corpo celular dos parasitos foi observada e que co-localizava com o Liso-Tracker-Red, um fluoróforo que marca organelas acídicas, como os endossomos e os lisossomos. Esses dados indicam que a PRP1 estaria localizada no elemento tubular multivesicular e associada às vias endocíticas e exocíticas, como já observado para a MRPA (LÉGARÉ et al., 2001b). No caso da MDR1, além do elemento tubular

multivesicular, esse transportador também estaria localizado no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático do parasito (DODGE et al., 2004). Em promastigotas de *Leishmania*, os lisossomos maduros se apresentam na forma desse elemento tubular multivesicular, que se estende da região do bolso flagelar, a região posterior do parasito, sendo uma organela claramente distinta do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático, correspondendo a um compartimento lisossômico (WEISE et al., 2000; GHEDIN et al., 2001; MULLIN et al., 2001; MCCONVILLE et al., 2001).

A fluorescência da proteína de fusão PRP1-GFP foi observada em parasitos vivos, já que segundo Ghedin et al. (2001) a fixação dos parasitos com paraformaldeído promove a fragmentação dessa estrutura tubular, gerando uma estrutura fluorescente esférica. Resultado similar foi observado em formas promastigotas dos transfectantes PRP1-GFP quando fixados com paraformaldeído (dados não mostrados). A fluorescência intensa observada principalmente na região do bolso flagelar também pode ser explicada pelo tal elemento multivesicular ser responsável pela via de degradação de proteínas superexpressas, como ocorreria para a PRP1-GFP, assim como para uma permease de adenosina, além de moléculas de superfície endógenas altamente expressas, como a gp63 e a LPG (DETKE, 2007; GHEDIN et al., 2001).

A partir da localização celular da PRP1 um provável mecanismo de resistência à pentamidina pode ser elucidado. Segundo Basselin et al. (2002), a droga entraria na célula através de um transportador de alta afinidade dependente de prótons, como descrito em *L. mexicana*, cujo transporte não varia em parasitos selvagens e resistentes à pentamidina e que não é competitivamente inibido por poliaminas, aminoácidos, nucleosídeos, açúcares e outros metabólitos. Segundo os dados apresentados neste estudo, a PRP1 seria responsável pelo acúmulo de pentamidina

em vesículas que seriam exocitadas pela célula através do bolso flagelar. Em *Leishmania*, a MRPA (ABCC3) cuja localização é intracelular, atua em antimoniais conjugados a tiois seqüestrando-os para o interior de vesículas que são então exocitadas pela mesma região do parasito (LÉGARÉ et al., 2001a; LÉGARÉ et al., 2001b). Curiosamente, em mamíferos, a pentamidina também se acumula nos lisossomos (GLAUMANN et al., 1994).

Em mutantes resistentes à pentamidina de *L. mexicana*, a droga permanece no citosol, enquanto que nos parasitos selvagens, a pentamidina acumula no interior da mitocôndria, o principal alvo da droga (BASSELIN et al., 2002; BRAY et al., 2003). Segundo esses mesmos autores, um transportador ABC não identificado, cujo fenótipo é revertido por verapamil, como ocorre com a PRP1, seria responsável pela remoção da pentamidina presente no citosol nos parasitos resistentes (BASSELIN et al., 2002). Diante desses dados, a PRP1 aparece como o provável transportador ABC responsável pela remoção de pentamidina do citoplasma da célula para o interior de vesículas que seriam então exocitadas através do bolso flagelar. Deve-se considerar no entanto, que existem outros 41 transportadores ABC em *Leishmania* (LEPROHON et al., 2006), sendo que oito deles pertencem à família ABCC, envolvida no transporte de endo e xenobióticos e que poderiam estar envolvidos na resistência. Porém, através da estratégia de isolamento de genes relacionados com a resistência à pentamidina por amplificação e superexpressão gênica descrita por Cotrim, Garrity e Beverley (1999), apenas cosmídeos contendo o *locus* do gene *PRP1* foram isolados, o que indica que outros transportadores ABC não devem estar envolvidos na resistência à pentamidina em *Leishmania*, considerando como mecanismo de resistência a superexpressão gênica.

Em relação ao mecanismo de resistência aos antimoniais trivalentes mediado pela PRP1 em formas promastigotas, este deve ser similar àquele descrito para a MRPA, onde ambos os transportadores seriam responsáveis pelo efluxo de tióis conjugados aos antimoniais trivalentes através do acúmulo em vesículas e posterior exocitose pela da região do bolso flagelar (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004; OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Dey et al. (1996) descreveram um outro sistema de efluxo de tióis conjugado a metais que diferentemente da MRPA, se localizava na membrana plasmática. Porém, os dados apresentados neste estudo descartam a possibilidade da PRP1 ser o transportador responsável por esse efluxo, uma vez que sua localização é intracelular. O transportador ABC envolvido nesse processo e localizado na membrana plasmática ainda não foi identificado.

A presença de um sistema de efluxo dependente de ATP foi evidenciado em formas promastigotas de *Leishmania* spp. a partir de substratos dos transportadores MRP (*multidrug resistance protein*), ortólogos da família ABCC em *Leishmania* (ESSODAIGUI et al., 1999). Sabe-se que esse sistema de transporte é inibido pelo verapamil e pelos derivados das fenotiazinas, prochlorperazina e trifluoperazina (ESSODAIGUI et al., 1999). Neste cenário, a PRP1 mostra-se como o provável transportador ABC responsável por esse sistema de efluxo dependente de ATP que é revertido pelo verapamil. Em *L. mexicana*, o verapamil também foi capaz de reverter a resistência em mutantes promastigotas de *L. mexicana* (15 μ M de verapamil) (BASSELIN et al., 2002), mas não em amastigotas axênicas resistentes à pentamidina (5 a 20 μ M de verapamil) (SERENO; LEMESRE, 1997b). Nos mutantes promastigotas de *L. amazonensis* descritos nesse estudo, a presença de um transportador ABC deve estar envolvido no efluxo da droga já que quando tratados

com verapamil houve um aumento significativo na suscetibilidade à pentamidina, em concentração similar a utilizada nos outros estudos (20 μ M). Porém, em mutantes promastigotas de *L. donovani* resistentes à pentamidina, não foi observado a reversão da resistência por inibidores de transportadores ABC, neste caso a prochlorperazina e a trifluoperazina (MUKHERJEE et al., 2006). Já em linhagens resistentes à pentamidina de *L. donovani* e *L. amazonensis*, não relacionadas aos estudos citados acima, não houve reversão da resistência em presença de concentrações não tóxicas de verapamil (11 a 32 μ M) além dos parasitos não apresentaram resistência cruzada a compostos não relacionados a pentamidina (metotrexato, anfotericina B, paramomicina, sinefugina e cicloleucina) (BASSELIN, LAWRENCE, ROBERT-GERO, 1997). Esses dados mostram que esse sistema de efluxo de pentamidina não deve estar necessariamente associado a resistência à pentamidina em *Leishmania* spp., indicando haver variações das diferentes espécies de *Leishmania*, inclusive variações intraespecíficas em nível molecular, como uma possível causa para essa variação na resposta as drogas, assim como nos mecanismos de resistência (BORST; OUELLETTE, 1995; OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Sabe-se, que na maior parte dos estudos, a identificação dos mecanismos de resistência às drogas é feita a partir do cultivo das células do parasita em concentrações crescentes desta mesma droga (BEVERLEY et al., 1984; ELLENBERGER, BEVERLEY, 1989) e que seleciona parasitas que exibem múltiplos mecanismos de resistência (BEVERLEY, 1991; BORST, OUELLETTE, 1995; ULLMAN, 1995).

Em *Leishmania*, a pentamidina causa a desintegração da rede intercatenada de moléculas de DNA circular que compõe o genoma mitocondrial (kDNA), além de

um colapso no potencial de membrana mitocondrial, fenômenos esses que poderiam ser responsáveis pela redução da droga na mitocôndria do parasito (HENTZER; KOBAYASI, 1977; CROFT; BRAZIL, 1982; VERSECI; DOCAMPO, 1992; BASSELIN; ROBERT-GERO, 1998; BASSELIN et al., 2002; BRAY et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado em mutantes resistentes de *L. donovani* uma redução da atividade de dehidrogenases e ATPases, enzimas mitocondriais essenciais para a manutenção do potencial de membrana mitocondrial (BASSELIN; ROBERT-GERO, 1998; MUKHERJEE et al., 2006). As mutações induzidas pela pentamidina nas regiões de minicírculos ricas em AT em mutantes resistentes à pentamidina de *Leishmania* (BASSELIN; BADET-DENISOT; ROBERT-GERO, 1998), poderia explicar a redução de atividade das enzimas mitocondriais. Segundo esses mesmos autores, as modificações na seqüência de minicírculos nos mutantes resistentes poderiam causar alterações nos RNAs codificados pelos minicírculos afetando a edição de RNA dos genes mitocondriais codificados pelos maxicírculos e conseqüentemente as funções mitocondriais (BASSELIN; BADET-DENISOT; ROBERT-GERO, 1998). As alterações nas seqüências de minicírculos nos mutantes resistentes, principalmente nas regiões ricas AT, as quais a pentamidina apresentam maior afinidade, reduziria a ligação da droga a essas regiões (BASSELIN; BADET-DENISOT; ROBERT-GERO, 1998) e diminuiria o acúmulo da droga nessa organela contribuindo para a resistência à pentamidina (BASSELIN et al., 2002; BRAY et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2006). Além disso, a interação da pentamidina com o kDNA poderia afetar diretamente os processos de replicação e transcrição que ocorrem na mitocôndria. Esses fenômenos poderiam explicar porque os parasitos resistentes à pentamidina apresentam taxas de crescimento menores que os respectivos parasitos selvagens, conforme observado

neste estudo e por outros autores (BASSELIN; LAWRENCE; ROBERT-GERO, 1997). Mutantes de *Leishmania* spp. resistentes a compostos não relacionados a pentamidina, como os antimonias, a terbinafina e o metotrexato, não apresentaram alterações na propriedade de crescimento quando comparados com os respectivos parasitos selvagens (DIAS et al., 2007). O cultivo dos mutantes resistentes à pentamidina de *L. amazonensis* em ausência da droga por seis meses, mostrou que a taxa de crescimento passou a ser similar aos parasitos selvagens, embora a resistência à pentamidina fosse mantida. Recentes estudos têm mostrado que em parasitos resistentes à drogas, outras alterações têm sido observadas não diretamente associadas ao fenótipo de resistência, mas associadas ao crescimento, infectividade e metabolismo (NATERA et al., 2007).

A superexpressão do produto protéico do gene *PNT1* de *Sacharomyces cerevisiae* confere resistência à pentamidina cuja localização celular é mitocondrial estando envolvido na biogênese da organela, atuando como um translocador (LUDEWIG; STABEN, 1994; HE; FOX, 1999). Buscas no projeto genoma de *Leishmania* mostraram não haver nenhum homólogo para esse gene, o que inclui nessa análise os genes dos transportadores ABC (dados não mostrados). Além disso, nenhuma co-localização foi observada entre o cinetoplasto (kDNA) e a PRP1 (Fig. 15).

O gene *PRP1* de *L. major* (cepa Friedlin V1) isolado conforme protocolo descrito (COTRIM; GARRITY; BEVERLEY, 1999) mostrou-se funcional em parasitos da mesma espécie de cepa avirulenta (Friedlin A1) mantida em várias passagens em cultura (DA SILVA; SACKS, 1987) (Tab. 2). Esse gene foi testado em outras espécies de *Leishmania* através da construção pSNBR/8 kb *Sma*I-A (Fig. 1). Verificou-se que o gene *PRP1* era funcional em todas as espécies estudadas:

formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e em outra cepa de *L. major* (LV39). Observou-se que a razão de resistência era maior entre espécies heterólogas do que em *L. major* (Friedlin A1) (Tab. 2 e Tab. 3). Diferenças nos níveis de resistência mostraram-se variáveis para o gene *MRPA*, dependendo da espécie que esse gene era transfectado, havendo ainda espécies onde não era observado resistência aos antimoniais pentavalentes (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU et al., 1994; LÉGARÉ et al., 1997). Segundo Légaré et al. (1997) essas diferenças nos níveis de resistência poderiam ser devido a fatores espécie-específicos e que podem afetar os níveis de resistência.

Observou-se ainda que o transportador PRP1 é funcional em formas amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp., como observado em mutantes resistentes aos antimoniais de formas amastigotas axênicas, que apresentam o gene *MRPA* amplificado e superexpresso e que é capaz de conferir resistência a esse composto em formas amastigotas (EL FADILI et al., 2004). Recentemente, foi descrito que isolados de *L. donovani* de pacientes que não respondem aos antimoniais apresentam o gene *MRPA* amplificado e superexpresso, sugerindo a amplificação do círculo H nesses isolados (MUKHERJEE et al., 2007). Porém, em outro estudo com isolados de pacientes de *L. donovani* resistentes aos antimonias pentavalentes, o gene *MRPA* não se apresentou superexpresso (DECUYPERE et al., 2005). Em ambos os estudos, no entanto, os genes ornitina descarboxilase e γ -glutamilcisteína sintetase, duas enzimas chaves da síntese de glutatona e cisteína, dois componentes da tripanotona apresentaram-se superexpressos (DECUYPERE et al., 2005; MUKHERJEE et al., 2007). Considerando o papel do transportador ABC PRP1 na resistência cruzada aos antimonias trivalentes, Decuypere et al. (2005)

demonstraram que o gene *PRP1* não apresentou alterações nos níveis de expressão, quando foram comparados os isolados amastigotas de *L. donovani* resistentes e sensíveis aos antimoniais pentavalentes. Em estudos prévios com os transfectantes de *L. major* contendo o gene *PRP1*, não foi observado resistência cruzada aos antimonias pentavalentes Glucantime e Pentostam em formas amastigotas intracelulares (dados não mostrados), sugerindo que a PRP1 não deve estar envolvida na resistência aos antimoniais em formas amastigotas de *Leishmania*.

Estudos recentes mostram que os transportadores ABC apresentam um papel importante na resistência à drogas em formas amastigotas de *Leishmania*, justamente o estágio evolutivo que é alvo da quimioterapia nas leishmanioses. Devido a alta toxicidade da pentamidina, esse composto vem sendo pouco utilizado na quimioterapia das leishmanioses, o que torna difícil o isolamento de parasitos resistentes à pentamidina em pacientes infectados por *Leishmania*. Porém, esse transportador ABC mostrou-se capaz de conferir resistência em formas amastigotas intracelulares de *L. major* e *L. amazonensis* (Tab. 9 e Fig. 20), indicando que a PRP1 poderia ser um mediador de resistência em casos de parasitos refratários a pentamidina isolados de pacientes e animais. Apenas os transfectantes amastigotas de *L. infantum* não apresentaram resistência à pentamidina (Tab. 9 e Fig. 21), fato que poderia ser explicado pela resistência intrínseca dos parasitos selvagens a pentamidina (Tab. 10). Resultados similares foram observados por El Fadili et al. (2005) que ao estudarem o envolvimento do gene *MRPA* na resistência ao antimonial pentavalente Pentostam na mesma linhagem de *L. infantum*, obtiveram resultados inconclusivos, devido a resistência intrínseca a esse composto. Já os transfectantes amastigotas de *L. panamensis* para o gene *MRPA* eram resistentes

ao Pentostam (EL FADILI et al., 2005). Interessantemente, para ambos os genes (*MRPA* e *PRP1*) estes eram funcionais, ou seja, eram capazes de conferir resistência às respectivas drogas, em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum* (EL FADILI et al., 2005).

Um outro transportador ABC também envolvido na resistência à pentamidina, é a MDR1, que tem o seu número de cópias inversamente associado a resistência em *Leishmania* (WONG; CHOW, 2006; WONG et al., 2007). Segundo esses autores, a pentamidina seria seqüestrada para o interior do elemento tubular multivesicular pela MDR1, que estaria conectado a mitocôndria, causando a concentração da pentamidina nessa organela. Conforme já descrito, a resistência à pentamidina estaria associada a redução do acúmulo de pentamidina na mitocôndria (BASSELIN et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2006) e um transportador ABC, cujo fenótipo é revertido por verapamil, seria responsável pelo efluxo da droga presente no citoplasma (BASSELIN et al., 2002; BRAY et al., 2003). Este fenômeno foi observado nos mutantes de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina PEN^r 0,5 e PEN^r 5 que apresentaram reversão do fenótipo de resistência à pentamidina quando tratados com concentrações não tóxicas de verapamil. O efeito do verapamil mostrou-se mais eficaz no mutante PEN^r 5 que tornava os parasitos promastigotas altamente suscetíveis à pentamidina (Tab. 13 e Fig. 25).

O uso de inibidores como, por exemplo, o verapamil é capaz de reverter a resistência a drogas mediada pelos transportadores ABC tanto em células de mamíferos quanto em células de *Plasmodium falciparum* (MARTIN; ODUOLA; MILHOUS, 1987; ENDICOTT; LING, 1989; GOTTESMAN; PASTAN, 1993). Algumas proteínas pertencentes a esta família de transportadores descritas até então em *Leishmania* spp., não têm sua resistência revertida por verapamil, como foi o caso

da MRPA de *L. major* (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991) e da MDR1 em *L. donovani* e *L. tropica* (HENDERSON et al., 1992; CHIQUERO et al., 1998; PÉREZ-VICTORIA et al., 1999). No entanto, transfectantes de *L. major* com o gene *PRP1*, resistentes à pentamidina, tinham sua resistência revertida pela metade quando tratados com concentrações não tóxicas de verapamil (COELHO, 2002; COELHO; BEVERLEY; COTRIM, 2003). De maneira similar, os demais transfectantes de espécies heterólogas de *Leishmania* também apresentaram a reversão do fenótipo de resistência quando tratados com concentrações não tóxicas de verapamil (Tab. 4). Além do verapamil, alguns flavonóides e sesquiterpenos já foram descritos como capazes de reverter a resistência mediada pela MDR1 em *Leishmania* (PÉREZ-VICTORIA et al., 2001a; PÉREZ-VICTORIA et al., 2001b; PÉREZ-VICTORIA et al., 2002; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006b) assim como em mutantes resistentes à pentamidina e ao Pentostam (WONG et al., 2007). Em mutantes de *L. tarentolae* e *L. donovani* resistentes ao arsenito, o verapamil também se mostrou capaz de reverter a resistência (DEY et al., 1994; PRASAD; KAUR; DEY, 2000), além de aumentar a suscetibilidade ao Pentostam em isolados naturais de *L. donovani* em formas promastigotas e amastigotas *in vitro* (VALIATHAN et al., 2006). A reversão da resistência pelo verapamil também foi observada em mutantes resistentes aos antimonias e ao nifurtimox em *L. donovani* e *T. cruzi* respectivamente (NEAL et al., 1989).

O mecanismo de ação do verapamil na reversão da resistência mediado por transportadores ABC ainda é incerto, embora seja descrito como um bloqueador de canais de cálcio (GOTTESMAN; PASTAN, 1993). Segundo Endicott e Ling (1989), agentes como o verapamil e a trifluoperazina podem afetar a função dos transportadores ABC provocando um aumento na fosforilação dessas proteínas,

sugerindo que os compostos que se ligam a esses transportadores podem alterar seu estado de fosforilação, alterando o fenótipo de resistência à drogas. Outros autores sugerem que o verapamil poderia reduzir os níveis de expressão em nível protéico de um transportador ABC (PRASAD; KAUR; DEY, 2000; KAUR; DEY, 2000). Em três espécies de *Leishmania*, o verapamil e os derivados de fenotiazinas (proclorperazina e trifluoperazina) foram capazes de inibir o efluxo de substratos de transportadores ABC em formas promastigotas do parasito (ESSODAIGUI et al., 1999), o que mostra que esses compostos são potenciais inibidores de transportadores ABC em *Leishmania*.

Os estudos com os parasitos selvagens de *L. infantum* mostraram que a pentamidina é menos ativa com as formas amastigotas intracelulares, seguido pelas formas amastigotas axênicas e por último as formas promastigotas que se mostraram como as mais suscetíveis à pentamidina. Resultados similares foram observados quando comparadas formas amastigotas e promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis*, cujas formas promastigotas eram mais suscetíveis, como observado por outros autores (SERENO; LEMESRE, 1997a; CALLAHAN et al., 1997). Os altos valores de IC₅₀ para pentamidina observados para as formas amastigotas intracelulares das três espécies de *Leishmania* são maiores (Tab. 10) do que aqueles encontrados no plasma dos pacientes tratados com pentamidina (0,33 a 1,3 µg/mL de pentamidina) (WAALKES; DEVITA, 1970; BRONNER et al., 1991), mas próximos dos valores encontrados dentro dos macrófagos, que apresentam uma concentração intramacrofágica de 4 a 8 µg/mL de pentamidina (BERMAN; GALLALEE; HANSEN, 1987), sugerindo que as concentrações administradas apresentam-se próximas daquelas encontradas para os respectivos valores de IC₅₀ das espécies de *Leishmania* aqui estudadas (Tab. 10). Esses dados

podem explicar a possível causa da baixa eficácia no tratamento das leishmanioses com a pentamidina. Um outro fator seria a alta toxicidade da pentamidina que limita a utilização de concentrações mais elevadas da droga o que acaba por restringir sua utilização na quimioterapia das leishmanioses (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005).

A suscetibilidade à pentamidina em formas promastigotas de *Leishmania* spp. mostrou que a droga é efetiva nesse estágio do parasito (Tab. 7). Os valores de IC₅₀ de pentamidina são bastante similares àqueles já descritos na literatura em várias espécies de *Leishmania* (SERENO; LEMESRE, 1997a; CALLAHAN et al., 1997). A espécie mais suscetível foi *L. braziliensis* enquanto que *L. infantum* apresentou a menor suscetibilidade ao composto (Tab. 7). De maneira geral, as espécies do Velho Mundo eram menos suscetíveis que as espécies do Novo Mundo (Tab. 7).

A expressão do gene *PRP1* ocorre em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. como já descrito por outros autores (LEPROHON et al., 2006, DECUYPERE et al., 2005). Devido a presença desse transportador e a possível associação do verapamil e a pentamidina, que aumenta a suscetibilidade ao segundo composto, foi verificado um aumento de suscetibilidade dos parasitos tratados com concentrações não tóxicas de verapamil (Tab. 7 e Tab 10). O aumento da suscetibilidade à pentamidina pelo verapamil mostrou ser específico em promastigotas selvagens de *Leishmania* spp., uma vez que a associação da vinblastina com concentrações não tóxicas de verapamil, não apresentou um aumento de suscetibilidade à vinblastina em formas promastigotas de *L. major*. Sabe-se que a vinblastina é o substrato de um outro transportador ABC em *Leishmania*, a MDR1 e seu fenótipo não é revertido pelo verapamil (HENDERSON et al., 1992; CHIQUERO et al., 1998). Embora não se possa afirmar que essa

associação atue única e exclusivamente na PRP1, a partir dos dados aqui obtidos, pode-se concluir que a suscetibilidade à pentamidina aumenta significativamente, sugerindo que em um possível tratamento com essa associação, menores quantidades de pentamidina poderiam ser administradas. Foi demonstrado recentemente em formas promastigotas de *Leishmania* spp. a presença de três sistemas de transporte dependentes de ATP, sendo que em um deles, o transporte era inibido por verapamil (ESSODAIGUI et al. ,1999), em concentrações similares às utilizadas nesse estudo, o que sugere a PRP1 como provável candidato. Estudos *in vivo* da associação pentamidina e verapamil poderiam ser testados com o intuito de verificar a eficácia dessa associação no tratamento das leishmanioses. Interessantemente, em ratos foi demonstrada uma redução da nefrotoxicidade da pentamidina quando co-administrada com o verapamil (FEDDERSEN; SACK, 1991).

5.3 Caracterização dos mutantes de *L. amazonensis* resistentes à pentamidina

O *locus* que está contido o gene *PRP1* não tem nenhuma relação com outros *loci* previamente descritos relacionados com a resistência à drogas em *Leishmania* spp. como por exemplo as regiões H e R. Essa duas regiões são capazes de serem amplificadas em situações de stress, nesse caso, quando os parasitos são submetidos a presença de drogas (BEVERLEY, 1991; BORST; OUELLETTE, 1995. A formação de DNAs circulares correspondentes aos círculos H e R estão associados a presença de DNAs repetitivos que favorecem essas ampliações nas respectivas regiões (OUELLETTE; FASE-FOWLER; BORST, 1990; OUELLETTE et al., 1991; OUELLETTE; PAPADOPOULOU, 1993; BEVERLEY et al., 1984;

BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU; ROY; OUELLETTE, 1993; GRONDIN; ROY; OUELLETTE, 1996). Diferentemente, mutantes de *L. major* resistentes à pentamidina não apresentaram DNAs amplificados (ELLENBERGER; BEVERLEY, 1989), como ocorre para os mutantes resistentes ao metotrexato que amplificam as regiões R e H (BEVERLEY et al., 1984; ELLENBERGER; BEVERLEY, 1989), enquanto que a amplificação da região H está associada a resistência aos antimonias, ao arsenito e a terbinafina (ELLENBERGER; BEVERLEY, 1989; CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; PAPADOPOULOU et al, 1994; MARCHINI et al., 2003). Através da disponibilidade da sequência de nucleotídeos que compõem o genoma de *L. major*, foi possível investigar sobre a possível presença de regiões repetitivas nas regiões adjacentes ao gene *PRP1*, como possíveis regiões capazes de serem amplificadas. Não foi encontrada nenhuma região repetitiva nessa região genômica (dados não mostrados), que se justifica pela carência dessas sequências no genoma de *Leishmania* (IVENS et al., 2005). Esse fato poderia explicar a ausência de amplificação dessa região em mutantes resistentes à pentamidina de *L. major* (ELLENBERGER; BEVERLEY, 1989). De maneira similar, os mutantes resistentes à pentamidina de *L. amazonensis* PEN^r 0,5 e PEN^r 5, não apresentaram nenhuma amplificação de DNA, assim como uma provável amplificação do gene *PRP1* nessa espécie do parasito. (Fig. 26 e Fig. 27). Conclui-se que, em ambas as espécies, o mecanismo de amplificação gênica não se mostra como responsável pela resistência à pentamidina.

Em mutantes promastigotas resistentes à miltefosina de *L. donovani*, nenhuma amplificação gênica foi observada (SEIFERT et al., 2003). Nesse caso, o mecanismo de resistência se dá por um defeito na internalização da droga (PÉREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003a). Recentemente, foi demonstrado que esse defeito

era causado por mutações pontuais no transportador LdMT, uma ATPase tipo P pertencente a uma subfamília de translocase de aminofosfolipídios, que afeta o acúmulo da droga pelo parasito (PÉREZ-VICTORIA et al., 2003b). Interessantemente, mutantes resistentes à daunomicina de *L. tropica* que superexpressam o gene *MDR1*, apresentam resistência cruzada à miltefosina e à edelfosina (PÉREZ-VICTORIA et al., 2001b), porém nenhuma amplificação ou superexpressão desse gene foi observada em *L. donovani* resistente à miltefosina (SEIFERT et al., 2003). Mutantes de *L. tropica* resistentes ao Glucantime cujo mecanismo de resistência se dá por amplificação gênica (círculo G) não contêm nesse DNA extracromossomal nenhuma seqüência relacionada com os transportadores ABC (ARANA et al., 1998), embora se saiba que a MRPA já foi correlacionada com a resistência ao arsenito e aos antimônias (CALLAHAN, BEVERLEY, 1991; OUELLETTE, FASE-FOWLER, BORST, 1990; PAPADOPOULOU et al., 1994). Resultados similares foram encontrados por Haimeur e Ouellette (1998) com mutantes resistentes ao Pentostam de *L. tarentolae* que continham DNAs amplificados, embora o respectivo gene envolvido na resistência não apresentava similaridade com outros genes já depositados em bancos de dados, sendo portanto de função desconhecida. Mutantes promastigotas de *L. infantum* resistentes ao Sb(III) contêm os genes *ABCA3* e *ABCH1* superexpressos, além do gene *MRPA* (*ABCC3*), no entanto a transfecção de tais genes não mostrou nenhuma correlação com a resistência ao Sb(III), mesmo quando co-transfectados com o gene *MRPA* (LEPROHON et al., 2006). Em formas amastigotas de *L. infantum* resistentes ao Sb(III), não foi observado resistência cruzada à pentamidina (SERENO; HOLZMULLER; LEMESRE, 2000), embora saibasse que a PRP1 confere resistência cruzada ao Sb(III), excluindo dessa forma um

provável envolvimento da PRP1 na resistência ao Sb(III) nestes mutantes. Os dados citados acima mostram que embora exista a associação de alguns transportadores ABC com a resistência a compostos anti-*Leishmania*, estes podem não estar diretamente relacionados aos mecanismos de resistência em mutantes selecionados com tais drogas. De fato, a complexidade ainda é maior quando são analisados isolados naturais resistentes a esses compostos. Isolados de *L. donovani* resistentes aos antimonias pentavalentes não apresentaram expressão diferencial para os transportadores ABC MRPA e PRP1 (DECUYPERE et al., 2005). Em um estudo utilizando isolados de *T. cruzi* resistentes ao benznidazol e ao nifurtimox, nenhuma associação por amplificação ou superexpressão dos transportadores ABC foi observada (MURTA et al., 2001).

A análise molecular do gene *PRP1* nos mutantes resistentes à pentamidina indicaram que este gene não se encontra amplificado e/ou superexpresso (Fig. 27 e Fig. 29), o que excluiria dessa forma o possível papel desse transportador na resistência à pentamidina. Porém, um possível envolvimento desse transportador ainda pode ser considerado, uma vez que mutações no gene *PRP1* poderiam aumentar a atividade de transporte de pentamidina, conferindo assim resistência à droga. O seqüenciamento do gene *PRP1* dos respectivos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5, poderia elucidar essa hipótese em um provável envolvimento da PRP1 no mecanismo de resistência à pentamidina em *L. amazonensis*. Um outro transportador ABC envolvido na suscetibilidade à pentamidina é a MDR1. O número de cópias desse gene está inversamente relacionado com a resistência à pentamidina, sendo responsável pelo acúmulo da pentamidina na mitocôndria (WONG et al., 2007). Mutações pontuais no gene desse transportador poderiam diminuir a atividade de transporte da pentamidina para o elemento tubular

multivesicular diminuindo o acúmulo da droga na mitocôndria (WONG et al., 2007). O transportador AQP1 é responsável pelo acúmulo de Sb(III) em *Leishmania* (GOURLAL et al., 2004). Em mutantes resistentes a esse composto, foi observado uma redução nos níveis de RNAm desse gene quando comparado com os respectivos parasitos selvagens (MARQUIS et al., 2005). No entanto, nenhuma alteração no número de cópias, assim como mutações pontuais nesse gene foram observadas nesses mutantes (MARQUIS et al., 2005). A superexpressão do gene *MAT2* (S-adenosilmetionina sintase) não associado a amplificação gênica foi observado também em mutantes de *L. major* resistentes ao metotrexato (GUIMOND et al., 2003).

Conforme descrito recentemente, o estudo por DNA microarrays seria uma importante ferramenta molecular capaz de elucidar a modulação da expressão gênica em parasitos resistentes as mais diversas drogas utilizadas na quimioterapia das leishmanioses (GUIMOND et al., 2003; LEPROHON et al., 2006). Esta estratégia poderia ser utilizada nos mutantes PEN^r 0,5 e PEN^r 5, com o intuito de identificar prováveis genes envolvidos no mecanismo de resistência à pentamidina.

6 Conclusões

Através deste estudo, pode-se concluir que o transportador ABC PRP1 de *Leishmania* é capaz de conferir resistência à pentamidina nos dois principais estágios evolutivos do parasito. A localização celular desse transportador mostrou ser intracelular, associado ao elemento tubulovesicular responsável pelas vias endocíticas e exocíticas do parasito. A associação da pentamidina com concentrações não tóxicas de verapamil foi capaz de reverter a resistência à pentamidina, aumentando a suscetibilidade a esse composto em formas promastigotas e amastigotas.

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram selecionadas em presença de pentamidina, a fim de se obter mutantes resistentes a esse composto. A caracterização molecular mostrou que o gene *PRP1* não deve estar associado ao mecanismo de resistência, considerando a amplificação e a superexpressão desse gene nos dois mutantes estudados: PEN^r 0,5 e PEN^r 5. Nesses mutantes, concentrações não tóxicas de verapamil foram capazes de reverter a resistência à pentamidina, o que sugere o provável envolvimento de um transportador ABC como mediador da resistência.

Referências bibliográficas

ALIBU, V. P.; RICHTER, C.; VONCKEN, F.; MARTI, G.; SHAHI, S.; RENGGLI, C. K.; SEEBECK, T.; BRUN, R.; CLAYTON, C. The role of *Trypanosoma brucei* MRPA in melarsoprol susceptibility. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, n. 1, p. 38-44, 2006.

ALLIKMETS, R.; GERRARD, B.; HUTCHINSON, A.; DEAN, M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. **Hum. Mol. Genet.**, v. 5, n. 10, p. 1649-1655, 1996.

AL-MOHAMMED, H. I.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 8, p. 3274-3280, 2005.

ALTES, J.; SALAS, A.; RIERA, M.; UDINA, M.; GALMES, A.; BALANZAT, J.; BALLESTEROS, A.; BUADES, J.; SALVA, F.; VILLALONGA, C. Visceral leishmaniasis: another HIV-associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. **AIDS**, v. 5, n. 2, p. 201-207, 1991.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLAR, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 2, p. 298-319, 1997.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

ANACLETO, C.; ABDO, M. C.; FERREIRA, M. V.; MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; FERNANDES, A. P.; MOREIRA, E. S. Structural and functional analysis of an amplification containing a *PGPA* gene in a glucantime-resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell line. **Parasitol. Res.**, v. 90, n. 2, p. 110-118, 2003.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro: 2002.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. 2006. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>;

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

ARANA, F. E.; PÉREZ-VICTORIA, J. M.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 56, n. 9, p. 1201-1208, 1998.

ARAUJO-SANTOS, J. M.; PARODI-TALICE, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 330, n. 1, p. 349-355, 2005.

ARMSTRONG, T. C.; PATTERSON, J. L. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. **J. Parasitol.**, v. 80, n. 6, p. 1030-1032, 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DE RAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 8, n. 3, p. 104-105, 1992.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. 4 ed. New York: John Wiley and Sons, 1995.

AZEREDO-COUTINHO, R. B.; CONCEICAO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L. P.; MADEIRA, M. F.; PACHECO, R. S.; VALETE-ROSALINO, C. M.; MENDONCA, S. C. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, n. 7, p. 735-737, 2007.

BALANÃ-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BARROS, H.C.; VERBISCK, N. V.; DA SILVA, S; ARAGUTH, M. F.; MORTARA, R. A. Distribution of epitopes of *Trypanosoma cruzi* amastigotes during the intracellular life cycle within mammalian cells. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 332-344, 1997.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M. A.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. **Exp. Parasitol.**, v. 85, n. 3, p. 274-282, 1997.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M. A.; ROBERT-GERO, M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Acta Trop.**, v. 70, n. 1, p. 43-61, 1998.

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 12, p. 3731-3738, 2002.

BASSELIN, M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 83, n. 5, p. 413-418, 1997.

BASSELIN, M.; ROBERT-GERO, M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine resistant *Leishmania*. **Parasitol. Res.**, v. 84, n. 1, p. 78-83, 1998.

BELLO, A. R.; NARE, B.; FREEDMAN, D.; HARDY, L.; BEVERLEY, S. M. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 24, p. 11442-11446, 1994.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; HANSEN, B. D. *Leishmania mexicana*: uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophages. **Exp. Parasitol.**, v. 64, n. 1, p. 127-131, 1987.

BEVERLEY, S. M. Gene amplification in *Leishmania*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 45, p. 417-444, 1991.

BEVERLEY, S. M.; CLAYTON, C. E. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. In: HYDE, J. E. **Protocols in Molecular Parasitology**. Totowa: Humana Press, 1993. p. 333-348

BEVERLEY, S. M.; CODERRE, J. A.; SANTI, D. V.; SCHIMKE, R. T. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. **Cell**, v. 38, n. 2, p. 431-439, 1984.

BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 427-460, 1995.

BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; DE KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

BRONNER, U.; DOUA, F.; ERICSSON, O.; GUSTAFSSON, L. L.; MIEZAN, T. W.; RAIS, M.; ROMBO, L. Pentamidine concentrations in plasma, whole blood and cerebrospinal fluid during treatment of *Trypanosoma gambiense* infection in Cote d'Ivoire. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n. 5, p. 608-611, 1991.

BRUN, R.; SCHÖNENBERGER, Cultivation and *in vitro* cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Acta Trop.**, v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979.

CALLAHAN, H. L.; BEVERLEY, S. M. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 28, p. 18427-18430, 1991.

CALLAHAN, H. L.; BEVERLEY, S. M. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 34, p. 24165-24168, 1992.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CARRIÓ, J.; PORTÚS, M. *In vitro* susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during *in vitro* or *in vivo* passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. **BMC Pharmacol.**, v. 2, p.11, 2002.

CARTER, K. C.; SUNDAR, S.; SPICKETT, C.; PEREIRA, O. C.; MULLEN, A. B. The *in vivo* susceptibility of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is drug specific and can be reversed by inhibiting glutathione biosynthesis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 5, p. 1529-1535, 2003.

CASTANYS-MUÑOZ, E.; ALDER-BAERENS, N.; POMORSKI, T.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. **Mol. Microbiol.**, v. 64, n. 5, p. 1141-1153, 2007.

CHIQUEIRO, M. J.; OLMO, A.; NAVARRO, P.; RUIZ-PEREZ, L. M.; CASTANYS, S.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; GAMARRO, F. Amplification of the H locus in *Leishmania infantum*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1227, n. 3, p. 188-194, 1994.

CHIQUEIRO, M. J.; PÉREZ-VICTORIA, J. M.; O'VALLE, F.; GONZALEZ-ROS, J. M.; DEL MORAL, R. G.; FERRAGUT, J. A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, n. 2, p. 131-139, 1998.

CHOW, L. M.; WONG, A. K.; ULLMAN, B.; WIRTH, D. F. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, n. 2, p. 195-208, 1993.

CHUNG, C. T.; MILLER, R. H. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, n. 8, p. 3580, 1988.

CODERRE, J. A.; BEVERLEY, S. M.; SCHIMKE, R. T.; SANTI, D. V. Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 80, n. 8, p. 2132-2136, 1983.

COELHO, A. C. **Caracterização de um gene de *Leishmania major* relacionado com a resistência à pentamidina**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

COELHO, A. C.; BEVERLEY, S. M.; COTRIM, P. C. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 130, n. 2, p. 83-90, 2003.

COTRIM, P. C.; GARRITY, L. K.; BEVERLEY, S. M. Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 53, p. 37723-37730, 1999.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, n. 11, p. 899-905, 2001.

CROFT, S. L. Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 9, n. 10, p. 376-381, 1988.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

CROFT, S. L.; BRAZIL, R. P. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, n. 1, p. 37-43, 1982.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CRUZ, A. K.; BEVERLEY, S. M. Gene replacement in parasitic protozoa. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 171-173, 1990.

CRUZ, A. K.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, n. 16, p. 7170-7174, 1991.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. JR. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.

DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 11, p. 2802-2806, 1987.

DALLAGIOVANNA, B.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. Molecular characterization of a P-glycoprotein-related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 75, n. 2, p. 145-157, 1996.

DECUYPERE, S.; RIJAL, S.; YARDLEY, V.; DE DONCKER, S.; LAURENT, T.; KHANAL, B.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J. C. Gene expression analysis of the mechanism of natural resistance Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 11, p. 4616-4621, 2005.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiol. Rev.**, v. 86, n. 3, p. 849-899, 2006.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem. J.**, v. 381, n. 2, p. 405-412, 2004.

DESCOTEAUX, A.; GARRAWAY, L. A.; RYAN, K. A.; GARRITY, L. K.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. In: ADOLPH, K. W. **Methods in Molecular Genetics**. New York: Academic Press, 1994. p. 22-48.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DETKE, S. Identification of a transcription factor like protein at the TOR locus in *Leishmania mexicana amazonensis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 90, n. 2, p. 505-511, 1997.

DETKE, S. TOR-induced resistance to toxic adenosine analogs in *Leishmania* brought about by the internalization and degradation of the adenosine permease. **Exp. Cell. Res.**, v. 313, n. 9, p. 1963-1978, 2007.

DEY, S.; OUELLETTE, M.; LIGHTBODY, J.; PAPADOPOULOU, B.; ROSEN, B. P. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, n. 5, p. 2192-2197, 1996.

DEY, S.; PAPADOPOULOU, B.; HAIMEUR, A.; ROY, G.; GRONDIN, K.; DOU, D.; ROSEN, B. P.; OUELLETTE, M. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 67, n. 1, p. 49-57, 1994.

DIAS, F. C.; RUIZ, J. C.; LOPES, W. C.; SQUINA, F. M.; RENZI, A.; CRUZ, A. K.; TOSI, L. R. Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania (Viannia) braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance. **Parasitol. Res.**, 2007. In press.

DODGE, M. A.; WALLER, R. F.; CHOW, L. M. C.; ZAMAN, M. M.; COTTON, L. M.; MCCONVILLE, M. J.; WIRTH, D. F. Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 1563-1575, 2004.

DUBE, A.; SINGH, N.; SUNDAR, S. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Parasitol. Res.**, v. 96, n. 4, p. 216-223, 2005.

EL FADILI, K.; MESSIER, N.; LEPROHON, P.; ROY, G.; GUIMOND, C.; TRUDEL, N.; SARAVIA, N. G.; PAPADOPOULOU, B.; LÉGARÉ, D.; OUELLETTE, M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 5, p. 1988-1993, 2005.

ELLENBERGER, T. E.; BEVERLEY, S. M. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 25, p. 15094-15103, 1989.

ENDICOTT, J. A.; LING, V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 137-171, 1989.

ESSODAIGUI, M.; FREZARD, F.; MOREIRA, E. S.; DAGGER, F.; GARNIER-SUILLEROT, A. Energy-dependent efflux from *Leishmania* promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 100, n. 1, p. 73-84, 1999.

FEDDERSEN, A.; SACK, K. Experimental studies on the nephrotoxicity of pentamidine in rats. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 28, n. 3, p. 437-446, 1991.

GAGNON, D.; FOUCHER, A.; GIRARD, I.; OUELLETTE, M. Stage specific gene expression and cellular localization of two isoforms of the serine hydroxymethyltransferase in the protozoan parasite *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, n. 1, p. 63-71, 2006.

GHEDIN, E.; DEBRABANT, A.; ENGEL, J. C.; DWYER, D. M. Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. **Traffic**, v. 2, n. 3, p. 175-188, 2001.

GLAUMANN, H.; BRONNER, U.; ERICSSON, O.; GUSTAFSSON, L. L.; ROMBO, L. Pentamidine accumulates in rat liver lysosomes and inhibits phospholipid degradation. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 74, n. 1, p. 17-22, 1994.

GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 385-427, 1993.

GOURBAL, B.; SONUC, N.; BHATTACHARJEE, H.; LEGARE, D.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 30, p. 31010-31017, 2004.

GRÁCIO, M. A.; GRACIO, A. J.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L. Since phenothiazines alter antibiotic susceptibility of microorganisms by inhibiting efflux pumps, are these agents useful for evaluating similar pumps in phenothiazine-sensitive parasites? **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 3, p. 347-351, 2003.

GRONDIN, K.; HAIMEUR, A.; MUKHOPADHYAY, R.; ROSEN, B. P.; OUELLETTE, M. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. **EMBO J.**, v. 16, n. 11, p. 3057-3065, 1997.

GRONDIN, K.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 8, p. 1895-1901, 1993.

GRONDIN, K.; ROY, G.; OUELLETTE, M. Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, n. 7, p. 3587-3595, 1996.

GUEIROS-FILHO, F. J.; VIOLA, J. P.; GOMES, F. C.; FARINA, M.; LINS, U.; BERTHO, A. L.; WIRTH, D. F.; LOPES, U. G. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania mdr1* gene. **Exp. Parasitol.**, v. 81, n. 4, p. 480-490, 1995.

GUEVARA, P.; PINTO-SANTINI, D.; ROJAS, A.; CRISANTE, G.; ANEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Green fluorescent protein-tagged *Leishmania* in phlebotomine sand flies. **J. Med. Entomol.**, v. 38, n. 1, p. 39-43, 2001.

GUIMOND, C.; TRUDEL, N.; BROCHU, C.; MARQUIS, N.; EL FADILI, K. PEYTAVI, R.; BRIAND, G. RICHARD, D.; MESSIER, N.; PAPADOPOULOU, B.; CORBEIL, J.; BERGERON, M. G.; LÉGARÉ, D.; OUELLETTE, M. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 20, p. 5886-5896, 2003.

HA, D. S.; SCHWARZ, J. K.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Use of green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 77, n. 1, p. 57-64, 1996.

HADIGHI, R.; MOHEBALI, M.; BOUCHER, P.; HAJJARAN, H.; KHAMESIPOUR, A.; OUELLETTE, M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. **PLoS Med.**, v. 3, n. 5, p. e162, 2006.

HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 7, p. 1689-1694, 1998.

HAIMEUR, A; GUIMOND, C.; PILOTE, S.; MUKHOPADHYAY, R.; ROSEN, B. P.; POULIN, R.; OUELLETTE, M. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. **Mol. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 726-735, 1999.

HAMADA, H; TSURUO, T. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 3, p. 1454-1458, 1988.

HANSON, S.; ADELMAN, J.; ULLMAN, B. Amplification and molecular cloning of the ornithine decarboxylase gene of *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 4, p. 2350-2359, 1992.

HE, S.; FOX, T. D. Mutations affecting a yeast mitochondrial inner membrane protein, pnt1p, block export of a mitochondrially synthesized fusion protein from the matrix. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 10, p. 6598-6607, 1999.

HENDERSON, D. M.; SIFRI, C. D.; RODGERS, M.; WIRTH, D. F.; HENDRICKSON, N.; ULLMAN, B. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 6, p. 2855-2865, 1992.

HENDRICKSON, N.; SIFRI, C. D.; HENDERSON, D. M.; ALLEN, T.; WIRTH, D. F.; ULLMAN, B. Molecular characterization of the *Idmdr1* multidrug resistance gene from *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, n. 1, p. 53-64, 1993.

HENTZER, B.; KOBAYASI, T. The ultrastructural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 71, n. 2, p. 157-166, 1977.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 67-113, 1992.

IOVANNISCI, D. M.; KAUR, K.; YOUNG, L.; ULLMAN, B. Genetic analysis of nucleoside transport in *Leishmania donovani*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 4, n. 6, p. 1013-1019, 1984.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R.;

ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M. R.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MÜLLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARD, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHÄFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WANBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARREL, B.; MYLER, P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

JEAN-MORENO, V.; ROJAS, R.; GOYENECHE, D.; COOMBS, G. H.; WALKER, J. *Leishmania donovani*: Differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Exp. Parasitol.**, v. 112, n. 1, p. 21-30, 2006.

JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

KAPLER, G. M.; BEVERLEY, S. M. Transcriptional mapping of the amplified region encoding the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major* reveals a high density of transcripts, including overlapping and antisense RNAs. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, n. 9, p. 3959-3972, 1989.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30 kilobases region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, n. 3, p. 1084-1094, 1990.

KAPLER, G. M.; ZHANG, K.; BEVERLEY, S. M. Nuclease mapping and DNA sequence analysis of transcripts from the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (R) region of *Leishmania major*. **Nucleic Acids Res.**, v.18, n. 21, p. 6399-6408, 1990.

KATAKURA, K.; FUJISE, H.; TAKEDA, K.; KANEKO, O.; TORII, M.; SUZUKI, M.; CHANG, K. P.; HASHIGUCHI, Y. Overexpression of LaMDR2, a novel multidrug resistance ATP-binding cassette transporter, causes 5-fluorouracil resistance in *Leishmania amazonensis*. **FEBS Lett.**, v. 561, n. 1-3, p. 207-212, 2004.

KATAKURA, K.; IWANAMI, M.; OHTOMO, H.; FUJISE, H.; HASHIGUCHI, Y. Structural and functional analysis of the *LaMDR1* multidrug resistance gene in *Leishmania amazonensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, n. 2, p. 289-294, 1999.

KAUR, J.; DEY, C. S. Putative P-glycoprotein expression in arsenite-resistant *Leishmania donovani* down-regulated by verapamil. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 271, n. 3, p. 615-619, 2000.

KERBY, B.R.; DETKE, S. Reduced purine accumulation is encoded on an amplified DNA in *Leishmania mexicana amazonensis* resistant to toxic nucleosides. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, n. 2, p. 171-185, 1993.

KLOKOUZAS, A.; SHAHI, S.; HLADKY, S. B.; BARRAND, M. A.; VAN VEEN, H. W. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 3, p. 301-317, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAGUNA, F. Treatment of leishmaniasis in HIV-positive patients. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 135-142, 2003.

LEANDRO, C.; CAMPINO, L.; Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 3, p. 352-357, 2003.

LEBOWITZ, J. H.; COBURN, C. M.; MCMAHON-PRATT, D.; BEVERLEY, S. M. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 24, p. 9736-9740, 1990.

LÉGARÉ, D.; CAYER, S.; SINGH, A. K.; RICHARD, D.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. ABC proteins of *Leishmania*. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2001a.

LÉGARÉ, D.; HETTEMA, E.; OUELLETTE, M. The P-glycoproteins-related gene family in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 68, n. 1, p. 81-91, 1994.

LÉGARÉ, D.; PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; MUKHOPADHYAY, R.; HAIMEUR, A.; DEY, S.; GRONDIN, K.; BROCHU, C.; ROSEN, B. P.; OUELLETTE, M. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant *Leishmania*. **Exp. Parasitol.**, v. 87, n. 3, p. 275-282, 1997.

LÉGARÉ, D.; RICHARD, D.; MUKHOPADHYAY, R.; STIERHOF, Y. D.; ROSEN, B. P.; HAIMEUR, A.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 28, p. 26301-26307, 2001b.

LEPROHON, P.; LÉGARÉ, D.; GIRARD, I.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. **Eukaryot. Cell**, v. 5, n. 10, p. 1713-1725, 2006.

LEW, A. M.; BECK, D. J.; THOMAS, L. M. . Recombinant fusion proteins of protein A and protein G with glutathione S-transferase as reporter molecules. **J. Immunol. Methods**, v.136, n. 2, p. 211-219, 1991.

LIRA, R.; SUNDAR, S.; MAKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SACKS, D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 2, p. 564-567, 1999.

LUDEWIG, G.; STABEN, C. Characterization of the PNT1 pentamidine resistance gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, n. 12, p. 2850-2856, 1994.

LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F. R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, n. 1, p. 1-14, 2000.

MAGILL, A. J. Epidemiology of leishmaniasis. **Dermatol. Clin.**, v. 13, n. 3, p. 505-523, 1995.

MARCHINI, J. F.; CRUZ, A. K.; BEVERLEY, S. M.; TOSI, L. R. The H region *HTBF* gene mediates terbinafine resistance in *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 131, n. 1, p. 77-81, 2003.

MARQUIS, N.; GOURBAL, B.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY, R.; OUELLETTE, M. Modulation in aquaglyceroporin *AQP1* gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. **Mol. Microbiol.**, v. 57, n. 6, p. 1690-1699, 2005.

MARTIN, S. K.; ODUOLA, A. M. J.; MILHOUS, W. K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. **Science**, v. 235, n. 4791, p. 899-901, 1987.

MASER, P.; KAMINSKY, R. Identification of three ABC transporter genes in *Trypanosoma brucei* spp. **Parasitol. Res.**, v. 84, n. 2, p. 106-111, 1998.

MBONGO, N.; LOISEAU, P. M.; BILLION, M. A.; ROBERT-GERO, M. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 2, p. 352-357, 1998.

MCCONVILLE, M. J.; MULLIN, K. A.; ILGOUTZ, S. C.; TEASDALE, R. D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 1, p. 122-154, 2002.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, n. 2, p. 327-329, 1993.

MOREIRA, E. S.; ANACLETO, C.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. **Parasitol. Res.**, v. 84, n. 9, p. 720-726, 1998.

MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SAHANI, M. H.; BARRET, M. P.; MADHUBALA, R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, n. 1, p. 1-10, 2006.

MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SINGH, S.; ROY, G.; GIRARD, I.; CHATTERJEE, M.; OUELLETTE, M.; MADHUBALA, R. Role of ABC transporter MRPA, {gamma}-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, n. 2, p. 204-211, 2007.

MULLIN, K. A.; FOTH, B. J.; ILGOUTZ, S. C.; CALLAGHAN, J. M.; ZAWADZKI, J. L.; MCFADDEN, G. I.; MCCONVILLE, M. J. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, n. 8, p. 2364-2377, 2001.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MURTA, S. M.; DOS SANTOS, W. G.; ANACLETO, C.; NIRDE, P.; MOREIRA, E. S.; ROMANHA, A. J. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 117, n. 2, p. 223-228, 2001.

NATERA, S.; MACHUCA, C.; PADRON-NIEVES, M.; ROMERO, A.; DIAZ, E.; PONTE-SUCRE, A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, n. 6, p. 637-642, 2007.

NEAL, R. A.; VAN BUEREN, J.; MCCOY, N. G.; IWOBI, M. Reversal of drug resistance in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* by verapamil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 2, p. 197-198, 1989.

OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 9, p. 323-328, 1993.

OLMO, A.; ARREBOLA, R.; BERNIER, V.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; RUIZ-PEREZ, L. M. Co-existence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, n. 15, p. 2856-2864, 1995.

OUELLETTE, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, n. 11, p. 874-882, 2001.

OUELLETTE, M.; BORST, P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. **Res. Microbiol.**, v. 142, n. 6, p. 737-746, 1991.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist. Updat.**, v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.

OUELLETTE, M.; FASE-FOWLER, F.; BORST, P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. **EMBO J.**, v. 9, n. 4, p. 1027-1033, 1990.

OUELLETTE, M.; HETTEMA, E.; WUST, D.; FASE-FOWLER, F.; BORST, P. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. **Embo J.**, v. 10, n. 4, p. 1009-1016, 1991.

OUELLETTE, M.; LÉGARÉ, D.; HAIMEUR, A.; GRONDIN, K.; ROY, G.; BROCHU, C.; PAPADOPOULOU, B. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. **Drug Resist. Updat.**, v. 1, n. 1, p. 43-48, 1998.

OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 5, p. 150-153, 1993.

PAPADOPOULOU, B.; KUNDIG, C.; SINGH, A.; OUELLETTE, M. Drug resistance in *Leishmania*: similarities and differences to other organisms. **Drug Resist. Updat.**, v. 1, n. 4, p. 266-278, 1998.

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; DEY, S.; ROSEN, B. P.; OLIVIER, M.; OUELLETTE, M. Gene disruption of the P-glycoprotein related gene *pgpa* of *Leishmania tarentolae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, n. 3, p. 772-778, 1996.

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; DEY, S.; ROSEN, B. P.; OUELLETTE, M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltpgpA* to oxyanion resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 16, p. 11980-11986, 1994.

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; OUELLETTE, M. Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 18, p. 4305-4312, 1993.

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; OUELLETTE, M., A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. **EMBO J.**, v. 11, n. 10, p. 3601-3608, 1992.

PARODI-TALICE, A.; ARAUJO, J. M.; TORRES, C.; PEREZ-VICTORIA, J. M.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1612, n. 2, p. 195-207, 2003.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward Translocation of the Drug. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 8, p. 2397-2403, 2003a.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; GAMARRO, F.; OUELLETTE, M.; CASTANYS, S. *Leishmania donovani*. Functional cloning of the miltefosine transporter: A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 50, p. 49965-49971, 2003b.

PÉREZ-VICTORIA, F. J.; SANCHEZ-CANETE, M. P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 33, p. 23766-23775, 2006a.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; CHIQUEIRO, M. J.; CONSEIL, G.; DAYAN, G.; DI PIETRO, A.; BARRON, D.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. **Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1736-1743, 1999.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; CORTÉS-SELVA, F.; PARODI-TALICE, A.; BAVCHVAROV, B. I.; PEREZ-VICTORIA, F. J.; MUÑOZ-MARTINEZ, F.; MAITREJEAN, M.; COSTI, M. P.; BARRON, D.; DI PIETRO, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to miltefosine by inhibiting drug efflux. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 9, p. 3102-3110, 2006b.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; DI PIETRO, A.; BARRON, D.; RAVELO, A. G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. **Curr. Drug Targets**, v. 3, n. 4, p. 311-333, 2002.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; PARODI-TALICE, A.; TORRES, C.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. **Int. Microbiol.**, v. 4, n. 3, p. 159-166, 2001a.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; PEREZ-VICTORIA, F. J.; PARODI-TALICE, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 9, p. 2468-2474, 2001b.

POURSHAFIE, M.; MORAND, S.; VIRION, A.; RAKOTOMANGA, M.; DUPUY, C.; LOISEAU, P. M. Cloning of S-adenosyl-L-methionine:C-24- Δ -sterol-methyltransferase (ERG6) from *Leishmania donovani* and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin B-Resistant promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 7, p. 2409-2414, 2004.

PRASAD, V.; KAUR, J.; DEY, C. S. Arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes express an enhanced membrane P-type adenosine triphosphatase activity that is sensitive to verapamil treatment. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 8, p. 661-664, 2000.

RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 17-28, 2003.

RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M; LOISEAU, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 7, p. 2677-2686, 2005.

REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.182-226.

ROY, G.; DUMAS, C.; SERENO, D.; WU, Y.; SINGH, A. K.; TREMBLAY, M. J.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 110, n. 2, p. 195-206, 2000.

RYAN, K. A.; DASGUPTA, S.; BEVERLEY, S. M. Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. **Gene**, v. 131, n. 1, p. 145-150, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, n. 5, p. 625-634, 1985.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SEGOVIA, M. *Leishmania* gene amplification: a mechanism o drug resistance. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, n. 2, p. 123-130, 1994.

SEGOVIA, M.; ORTIZ, G. LD1 amplifications in *Leishmania*. **Parasitol. Today**, v. 13, n. 9, p. 342-348, 1997.

SEIFERT, K.; MATU, S.; PEREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S. L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 4, p. 380-387, 2003

SERENO D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as

an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 12, p. 3097-3102, 1998.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second lines drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Trop.**, v. 74, n. 1, p. 25-31, 2000.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A. LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 972-976, 1997a.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. *In vitro* life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 9, p. 1898-1903, 1997b.

SHAHI, S. K.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; CLAYTON, C. E. Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 1129-1138, 2002.

SHAKED-MISHAN, P.; ULRICH, N.; EPHROS, M.; ZILBERSTEIN, D. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 6, p. 3971-3976, 2001.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471-478, 1994.

SIEMERING, K. R.; GOLBIK, R.; SEVER, R.; HASELOFF, J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. **Curr. Biol.**, v. 6, n. 12, p. 1653-1663, 1996.

SINGH, A. K.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. **Exp. Parasitol.**, v. 99, n. 3, p. 141-147, 2001.

SOEIRO, M. N.; DE SOUZA, E. M.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W. Aromatic diamidines as antiparasitic agents. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 14, n. 8, p. 957-972, 2005.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R. S.; PADILLA, J.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 7, p. E57-E61, 2001.

TURCO, S. J. Surface constituents of kinetoplastid parasites. In: MARR, J. J.; MULLER, M. **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites**. San Diego: Harcourt Brace & Company Publishers, 1995. p. 177-202.

ULIANA, S. R.; FISCHER, W.; STEMPLIUK, V. A.; FLOETER-WINTER, L. M. Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 76, n. 1-2, p. 245-255, 1996.

ULLMAN, B. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 27, n. 1, p. 77-84, 1995.

VALIATHAN, R.; DUBEY, M. L.; MAHAJAN, R. C.; MALLA, N. *Leishmania donovani*: effect of verapamil on *in vitro* susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. **Exp. Parasitol.**, v. 114, n. 2, p. 103-108, 2006.

VASUDEVAN, G.; CARTER, N. S.; DREW, M. E.; BEVERLEY, S. M.; SANCHEZ, M. A.; SEYFANG, A.; ULLMAN, B.; LANDFEAR, S. M. Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, n. 17, p. 9873-9878, 1998.

VASUDEVAN, G.; ULLMAN, B.; LANDFEAR, S. M. Point mutations in a nucleoside transporter gene from *Leishmania donovani* confer drug resistance and alter substrate selectivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 11, p. 6092-6097, 2001.

VERSECI, A. E.; DOCAMPO, R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **Biochem. J.**, v. 284, n. 2, p. 463-467, 1992.

WAALKES, T. P.; DEVITA, V. T. The determination of pentamidine (4,4'-diamidinophenoxypentane) in plasma, urine, and tissues. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 75, n. 5, p. 871-878, 1970.

WEISE, F.; STIERHOF, Y. D.; KÜHN, C.; WIESE, M.; OVERATH, P. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. **J. Cell. Sci.**, v. 113, n. 24, p. 4587-4603, 2000.

WERBOVETZ, K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 7, n. 2, p. 147-157, 2006.

WONG, A. K.; CHOW, L. M.; WIRTH, D. F. A homologous recombination strategy to analyze the vinblastine resistance property of the V-circle in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 64, n. 1, p. 75-86, 1994.

WONG, I. L.; CHAN, K. F.; BURKETT, B. A.; ZHAO, Y.; CHAI, Y.; SUN, H.; CHAN, T. H.; CHOW, L. M. Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stibogluconate resistance in *Leishmania*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 3, p. 930-940, 2007.

WONG, I. L.; CHOW, L. M. The role of *Leishmania enriettii* multidrug resistance protein 1 (LeMDR1) in mediating drug resistance is iron-dependent. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, n. 2, p. 278-287, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the consultative meeting Leishmania/HIV co-infection. **WHO/LEISH/95**. v. 35, p. 1-14, 1995.

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

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, 2004.

YAMEY, G.; TORRELEE, E. The world's most neglected diseases. **BMJ**, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 2002.

ZHOU, Y.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY, R. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 36, p. 37445-37451, 2004.

Anexos

Functional genetic identification of *PRP1*, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*[☆]

Adriano C. Coelho^a, Stephen M. Beverley^b, Paulo C. Cotrim^{a,*}

^a Instituto de Medicina Tropical, São Paulo University Medical School, Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 470; 4º andar, São Paulo—SP, 05403-900, Brazil

^b Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA

Received 14 March 2003; received in revised form 9 June 2003; accepted 10 June 2003

Abstract

Pentamidine (PEN) is a second-line agent in the treatment of leishmaniasis whose mode of action and resistance is not well understood. Here, we used a genetic strategy to search for loci able to mediate PEN resistance (PEN^r) when overexpressed in *Leishmania major*. A shuttle cosmid library containing genomic DNA inserts was transfected into wild-type promastigotes and screened for PEN-resistant transfectants. Two different cosmids identifying the same locus were found, which differed from other known *Leishmania* drug resistance genes. The PEN^r gene was mapped by deletion and transposon mutagenesis to an open reading frame (ORF) belonging to the P-glycoprotein (PGP)/MRP ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily that we named pentamidine resistance protein 1 (*PRP1*). The predicted *PRP1* protein encodes 1807 amino acids with the typical dimeric structure involving 10 transmembrane domains and two nucleotide-binding domains (NBDs). *PRP1*-mediated PEN^r could be reversed by verapamil and *PRP1* overexpressors showed cross-resistance to trivalent antimony but not to pentavalent antimony (glucantime). Although the degree of PEN^r was modest (1.7- to 3.7-fold), this may be significant in clinical drug resistance given the marginal efficacy of PEN against *Leishmania*.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania major*; Pentamidine; Drug resistance; Gene transfection; Overexpression; P-glycoprotein

1. Introduction

Chemotherapy based on pentavalent antimonials is the primary means for treatment of leishmaniasis, and has been used for more than 50 years. Pentamidine (PEN) is a second-line drug used for the treatment of leishmaniasis, and although it may inhibit many different cellular processes, its cellular target remains unclear [1,2]. PEN competes with polyamines for nucleic acid binding and may also preferentially bind to kinetoplast DNA interfering with replication and transcription at mitochondrial level [2,3]. Recently, it was shown that the mitochondrion is an important target of PEN action in kinetoplastids, and that PEN

resistance (PEN^r) in some resistant lines involves decreased drug accumulation in this organelle [4].

Gene amplification has been frequently observed in *Leishmania* following stepwise selection [5–7]. Amplification of *Leishmania major* H-circle genomic region, obtained by this procedure, confers resistance to diverse compounds, including methotrexate, primaquine, terbinafine, arsenite, and antimonials [8–10]. In contrast, a stepwise-selected PEN-resistant *L. major* line (PT-R20) did not show H region or other amplifications [8]. Recently, we described a method exploiting libraries of *Leishmania* transfected with episomal vectors bearing random DNA fragments for the identification of genes whose overexpression leads to drug resistance in *Leishmania* [11]. In this work it has been applied to the identification of loci implicated in PEN^r.

We have applied the overexpression/selection method here to the identification of loci implicated in PEN^r. We found a new PEN^r gene active in *L. major* promastigotes, encoding a protein termed pentamidine resistance protein 1 (*PRP1*). *PRP1* is a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporters superfamily which includes the P-glycoprotein (PGP). PGPs are highly conserved

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; kb, kilobase; LmFA1, *Leishmania major* Friedlin A1; MDR, multidrug resistance; NBD, nucleotide-binding domain; *NEO*, neomycin phosphotransferase gene; ORF, open reading frame; PEN, pentamidine; PEN^r, PEN resistance; PGP, P-glycoprotein; PRP, pentamidine resistance protein

[☆] **Note:** Nucleotide sequence obtained in this work has been deposited in the GenBank™/EBI Database under accession number AY251609.

* Corresponding author. Tel.: +55-11-30667024; fax: +55-11-30623622.

E-mail address: pccotrim@usp.br (P.C. Cotrim).

transmembrane proteins in eukaryotic cells, consisting of duplication of two segments which each contain six transmembrane domains and one nucleotide-binding domain (NBD) [12,13]. In *Leishmania*, the MRP-like family includes at least five genes. *PGPA* was identified in amplified circular DNA (H-circle) from methotrexate-resistant *L. tartentolae* and *L. major* promastigotes, and mediates arsenite and antimony resistance [9,10,14]. *PGPB* and *PGPC* are closely related and genetically linked to *PGPA* but have not been shown to mediate drug resistance. Finally, *PGPD* and *PGPE* are more divergent and located on another chromosome [15]. Although their physiological functions are unknown, it has been demonstrated that overexpression of *PGPA* leads to resistance to antimonials and arsenite, while disruption of *PGPA* by gene replacement showed an increased sensitivity to arsenite and antimonite [9,16]. The PGP-like family includes *MDR1*, a gene identified in the amplified circular DNA (V-circle) that mediates resistance to hydrophobic drugs, like vinblastine and puromycin, in *Leishmania* spp. [17–19]. Data emerging from the *Leishmania* Genome Project suggest the presence of additional members of this superfamily [20].

2. Materials and methods

2.1. Parasites, cultures, transfections, and drugs

Leishmania (Leishmania) major Friedlin A1 strain (LmFA1) is an avirulent clonal line derived from the Friedlin V1 strain (MHOM/IL/1980/Friedlin), after multiple passages in vitro [21]. Promastigotes were grown in M199 medium supplemented as described [11,22]. Parasites from late log phase cultures were transfected by electroporation (500 μ F, 2.25 kV/cm) using 20–40 μ g of cosmid DNA. Typically, the PEN IC₅₀ for inhibition of LmFA1 cells was 0.65 μ g/ml in liquid media, however, higher concentrations were used in PEN selections as described below and previously [11,23]. Parasite cell determinations, IC₅₀ calculations, and statistical tests for PEN^r were carried out as described [11].

Pentamidine and verapamil (VER) were purchased from Sigma, glucantime from Rhodia, SbCl₃ from Merck, and Cyclosporin-A from Calbiochem. Miltefosine was provided by Zentaris/ASTA Medica AG (Frankfurt am Main, Germany). For PEN reversal resistance studies, same culture experiments were done by just adding VER in a constant and nontoxic concentration, previously determined by the IC₅₀ values for VER against wild-type cells (22.5 $\pm$ 1.7 μ M).

2.2. Identifying and mapping the *Leishmania major* locus related to PEN^r

In this work we began with two transfected *L. major* cell populations, each bearing a separate cosmid from an *L. major* library constructed in the shuttle vector cLHYG

[11,24]. Library or control cultures were plated on M199 semisolid medium containing increasing concentrations of PEN, 4.8–15.6 μ g/ml of PEN, as described [11]. Cosmid DNA from the primary PEN-resistant transfectants was recovered by transformation of *Escherichia coli* DH5 α strain and analyzed by restriction enzyme digestion [24]. Deletions of cosPEN1-A insert were obtained by partial digestion with *Hind*III and *Eco*RV, followed by self-ligation, as described [11]. Constructs were also generated by total digestion of cosPEN1-A Δ *Hind*III DNA insert with the indicated restriction enzyme and subcloned into pSNBR [9] as described [11].

2.3. Southern and Northern blot analyses

For Southern blots, genomic DNA was purified as described [25], digested and separated by electrophoresis in 0.9% agarose gels. Total RNA was prepared with TRI-ZOL reagent (Gibco-BRL) according to the manufacturer's instructions and separated by 1% formaldehyde-agarose gel electrophoresis [26]. Nucleic acids were transferred to nylon membranes (Gibco-BRL), immobilized by a UV-cross-linking (BioRad), and hybridized using high stringency conditions [26]. A 0.8 kb *Pst*I fragment corresponding to the first NBD of *PRP1* was excised from an agarose gel following electrophoresis, purified by glass milk (GeneClean II; Bio 101, Inc.) and labeled with [α -³²P]dCTP using the Random Primers DNA Labeling System (Gibco-BRL).

2.4. Nucleotide sequencing of *PRP1* gene

DNA sequencing was done on an ALF Express System (Amersham Pharmacia) automated sequencer. A PCR-based sequencing reaction was done using a Thermo Sequenase fluorescent-labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia). The nucleotide sequence of *PRP1* gene was determined by primer-island sequencing, using arbitrarily selected clones from a random in vitro transposon insertion library using the *Mosk* mariner transposable element [27]. We created several different insertions in a partial *PRP1* 5 kb *Sal*I fragment in pSNBR. Primer-island sequencing was performed using primers *Mosk*F: 5'-CCGAGAGAGATGGGAAAAATG-3' and *Mosk*R: 5'-GGTTGACACTTCACAAGGTC-3'. Other specific primers were used as necessary, including one from an internal region of the *PRP1* coding region *PRP1* 3'A: 5'-AGCGACATCGTTGTGGTT-3'. All listed primers were labeled with 5'Cy and synthesized by Gibco-BRL.

Analysis of the sequence was performed using Lasergene Software (DNASTAR, Inc.) and Clone Manager 5TM Software. The nucleotide sequence data for pSNBR/5 kb *Sal*I were deposited in GenBankTM/EBI (accession number AY251609). Sequence data for the remaining regions were obtained from the *Leishmania* Genome Project Website (provided by the Sanger Institute as part of the *Leishmania*

Genome Network with support by The Wellcome Trust; www.sanger.ac.uk/Projects/L_major).

3. Results

3.1. Selection of the *Leishmania major* locus related to PEN^r

Following the overexpression/selection strategy previously described [11], a library of 17,900 independent genomic cosmid transfectants in the Friedlin derivative LmFA1 were plated on semisolid media in the presence of increasing concentrations of PEN. Colonies from plates exhibiting higher numbers relative to controls were recovered and grown briefly. DNAs were prepared and the cosmids recovered by transformation into *E. coli*, and analyzed

by restriction enzyme digestion. Fingerprint analysis of seven colonies identified two cosmid populations from the same locus designated *PEN1* (cosPEN1-A and cosPEN1-B) (Fig. 1B).

3.2. Mapping *Leishmania major* locus related to PEN^r

LmFA1 transfectants bearing cosPEN1-A showed modest increases of PEN^r (1.68-fold resistance), when compared to wild-type LmFA1 (Table 1). To map the active gene, cosPEN1-A deletions were made by partial digestion with *HindIII* and self-ligation. Deletion cosPEN1-A Δ *HindIII* (with a ~15 kb insert) retained PEN^r (2.4-fold) (Table 1; Fig. 1C). A second round of deletions with *EcoRV* were generated from the cosPEN1-A Δ *HindIII* insert. None of these (cosPEN1-A Δ *HindIII* Δ *EcoRV*-I, cosPEN1-A Δ *HindIII* Δ *EcoRV*-II,

Fig. 1. Functional mapping of the *PRP1* locus. (A) Restriction map of genomic region related to PEN^r . (B) Map of cosmids isolated by overexpression/selection in the presence of PEN. The *PRP1* gene is represented by the black box and the arrow indicates ORF orientation. Shaded boxes show the vector cLHYG. (C) Localization of *PRP1* gene. cosPEN1-A was subjected to deletional analysis to localize the region encoding the gene related to PEN^r (cosPEN1-A Δ *HindIII* and cosPEN1-A Δ *HindIII* Δ *EcoRV* deletions). Restriction fragments from cosPEN1-A Δ *HindIII* were subcloned in the shuttle vector pSNBR [9] and tested for their ability to confer PEN^r in LmFA1 cells after transfection. DNA inserts conferring PEN^r in LmFA1 cells after transfection are represented by plus (+) sign. (D) Organization of *PRP1* locus containing in the 8 kb *SmaI* fragment. The 0.8 kb *PstI* probe corresponding to the first NBD (NBD1). Restriction enzymes: B, *Bam*HI; E, *Eco*RV; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; M, *Sma*I; N, *Nhe*I; No, *Not*I; P, *Hpa*I; S, *Sa*I; Sa, *Sac*I; T, *Pst*I; X, *Xho*I.

Table 1

Resistance level of the PEN-resistant constructs after transfection in LmFA1 wild-type cells

Cell line	Pentamidine		<i>n</i>	<i>P</i>
	IC ₅₀ (μg/ml)	Fold resistance		
LmFA1	0.65 ± 0.15	1	15	
cLHYG	0.66 ± 0.2	1.08 ± 0.37	7	ns
cosPEN1-A	1.04 ± 0.19	1.68 ± 0.5	13	< 0.001
cosPEN1-A Δ <i>Hind</i> III	1.5 ± 0.31	2.4 ± 0.83	15	< 0.001
cosPEN1-A Δ <i>Hind</i> IIIΔ <i>Eco</i> RV-I	0.5 ± 0.18	0.8 ± 0.25	8	ns
cosPEN1-A Δ <i>Hind</i> IIIΔ <i>Eco</i> RV-II	0.56 ± 0.11	0.95 ± 0.26	8	ns
cosPEN1-A Δ <i>Hind</i> IIIΔ <i>Eco</i> RV-III	0.58 ± 0.09	0.93 ± 0.25	8	ns
pSNBR	0.71 ± 0.06	1.14 ± 0.24	8	ns
pSNBR/5kb <i>Sal</i> I	0.64 ± 0.14	1.05 ± 0.35	12	ns
pSNBR/8kb <i>Sma</i> I-A	2.25 ± 0.12	3.7 ± 1.11	6	< 0.001
pSNBR/8kb <i>Sma</i> I-B	1.57 ± 0.18	2.85 ± 0.84	12	< 0.001
pSNBR/8kb <i>Sma</i> I-B Δ <i>Nhe</i> I	0.66 ± 0.09	1.11 ± 0.36	8	ns
pSNBR/8kb <i>Sma</i> I-B plus (15 μM VER)	0.87 ± 0.06	0.52 ± 0.08	6	ns

The mean ± S.D. of *n* independent experiments are given. Values (*P*) significantly different from the wild-type value (1-fold resistance) by Student's *t*-test are designed. The fold resistance is the ratio of IC₅₀ for transfected parasites and LmFA1 cells. ns—not significant.

In gray are represented the result of PEN^r reversion after the indicated VER treatment.

and cosPEN1-A Δ*Hind*IIIΔ*Eco*RV-III) were able to confer PEN^r after transfection, suggesting that the PEN^r gene contained an *Eco*RV site (Table 1; Fig. 1C). Relevant portions of cosPEN1-A Δ*Hind*III were then subcloned into the shuttle vector pSNBR [9]. Two of these constructs contain an 8 kb *Sma*I fragment in opposite orientations (Fig. 1C). Interestingly, both constructs were able to confer PEN^r in LmFA1 after transfection (Table 1), confirming that the phenotype does not depend on the direction of transcript within insert in relation to the neomycin phosphotransferase resistance gene (*NEO*) [9,28,29]. A number of smaller deletion derivatives (pSNBR/5 kb *Sal*I, pSNBR/3 kb *Eco*RV, and pSNBR/2.4 kb *Eco*RV-*Hpa*I) did not confer PEN^r (Table 1; Fig. 1C; data not shown).

3.3. Molecular characterization and analysis of the *PRP1* gene

The sequence of the 5 kb *Leishmania* DNA of pSNBR/5 kb *Sal*I was determined by transposon-mediated primer-island sequencing [27]. An apparently truncated 1230 amino acid open reading frame (ORF) was found, which showed identity to a region found within a 1500 kb chromosome of *L. major* present in the *Leishmania* Genome Project Database at Sanger Center Web Server. The sequence was then com-

pleted by sequencing parasite insert ends in constructs pSNBR/3 kb *Eco*RV and pSNBR/8 kb *Sma*I-A (Fig. 1C), and ultimately filled in from data arising from the *L. major* Genome Project.

The entire *PRP1* gene contained 5424 nucleotides, encoding a predicted polypeptide of 1807 amino acids with an estimated molecular mass of 190 kDa (GenBankTM accession number AY251609). We showed that *PRP1* was the active PEN^r gene, as a 1 kb *Nhe*I fragment deletion within the *PRP1* coding region found in construct pSNBR/8 kb *Sma*I-B Δ*Nhe*I ablated the ability of this fragment to confer PEN^r (Table 1; Fig. 1C). This confirmed that *PRP1* overexpression mediated PEN^r in *L. major*.

The primary structure of polypeptide chain predicted three potential Asn-linked glycosylation sites, although it is likely that none of these are extracellular as they occur in conserved NBDs (⁷⁸⁵NITF⁷⁸⁸; ⁸⁷²NLSG⁸⁷⁵; ¹⁶⁵¹NFSV¹⁶⁵⁴; Fig. 2A). Hydrophobicity plots of PRP1 showed a structure similar to other PGPs, with a set of putative transmembrane domains followed by regions of hydrophilicity corresponding to the two NBDs. Both predicted NBDs contain the consensus sequences involved in Mg-ATP binding (the Walker motifs A and B) and the ABC transporter signature LSGGQ that has been completely retained in NH₂-terminal (⁸⁷³LSGGQ⁸⁷⁷) but not in the COOH-terminal (¹⁶⁵²FSVGQ¹⁶⁵⁶) (Fig. 2A).

Fig. 2. Protein sequence comparison of *Leishmania major* PRP1 with other members of ABC transporters. (A) An amino acid sequence alignment from the two NBDs (I and II) of PRP1 from *L. major* (LmPRP1), PGPA from *L. major* (LmPGPA); PGPE from *L. tropica* (LtPGPE) (GenBankTM accession number AAB51191); PGPA and PGPE from *L. tarentolae* (StPGPA and StPGPE) (P21441 and AAA65541), and PGP2 from *Trypanosoma cruzi* (TcPGP2) (CAA89197). Alignment was performed using the ClustalW algorithm implemented in the Lasergene software (DNASTAR, Inc.). Identical residues are shaded gray and the Walker A/B motifs and the ABC signature motif regions are boxed and labeled by A, B, and C, respectively. LmPRP1 is 38, 34, 38.6, 34.5, and 29% identical to LmPGPA, LtPGPE, StPGPA, StPGPE, TcPGP2, respectively. (B) An unrooted dendrogram was prepared by comparing the full-length amino acid sequences of 11 members of the ABC transporter superfamily using ClustalW algorithm (DNASTAR, Inc.) in standard parameters. The scale at the bottom measures distance between sequences. The units indicate the number of nucleotide substitutions ($\times 100$).

The predicted protein has 10 transmembrane domains (data not shown) according to TMHMM Server v. 2.0 [30]. Sequence comparison shows the highest similarity in the two regions containing NBDs of PRP1 with others PGPs from the MRP-like family of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* (Fig. 2A). However, we noted that PRP1 contain specific sequences or features, such as the spacing between the conserved Walker motifs A and B that differ from others members of MRP-like family (Fig. 2A). A phylogenetic comparison of PRP1 sequence with six other ABC transporters of MRP-like family from trypanosomatids and four multidrug resistance (MDR) proteins from mammalian indicated that PRP1 of *L. major* was the most divergent member, and thus defines a new PGP family (Fig. 2B).

Southern blot analysis for *PRP1* gene organization showed that it was present as a single copy within *L. major* genome (Fig. 3A), in agreement with genome sequencing. We observed faint bands in some digestions even with high stringency washes, which may reflect hybridization to other ABC transporter genes within the *L. major* genome (Fig. 3A). Nucleotide sequence analysis of genomic region of *PRP1* gene indicated that no other gene of ABC transporter superfamily occurred nearby. Upstream of *PRP1* there was an ORF of 335 amino acids that showed 15%

amino acid identity to GP46 of *L. chagasi* (GenBankTM accession number AAB62271), while a downstream ORF comprised 877 amino acids did not show any relationship to other proteins in database.

Northern blot analysis identified a major transcript of 6 kb, as well as a minor transcript of 4.4 kb, in total RNA of *L. major* transfectant pSNBR/8 kb *Sma*I-A (Fig. 3B). No hybridization was observed with logarithmic and stationary LmFA1 wild-type RNA (Fig. 3B). The 6 kb transcript would be large enough to encode PRP1 according to the predicted ORF and a better characterization will be necessary to determine the minor transcript. Attempts to map the 5' trans-splicing site of the *PRP1* transcript were not successful.

3.4. Role of *PRP1* in *PEN^r* and cross-resistance studies

Classical modulators of mammalian MDR phenotype, such as VER and Cyclosporin-A, can reverse drug resistance mediated by these transporters [31], although they are not effective with MDR in *Leishmania* [17,32]. We tested pSNBR/8 kb *Sma*I-B transfectants cells for *PEN^r* at nontoxic concentrations of VER, and verified that *PEN^r* was reverted when compared with transfected cells not treated with VER and/or LmFA1 wild-type cells (Table 1, gray line; Fig. 4). Similar tests were performed with Cyclosporin-A, however, this compound failed to reverse *PEN^r*, even at toxic concentrations (data not shown).

The cross-resistance profile of LmFA1 transfected with pSNBR/8 kb *Sma*I-A to structurally and functionally unrelated drugs is summarized in Table 2. Significant cross-resistance was observed only towards SbCl₃, while

Fig. 3. (A) Southern blot analysis of *Leishmania major* genomic DNA. Genomic DNA (5 µg) was digested, fractionated on 0.9% agarose gel, and probed with a 0.8 kb *Pst*I fragment corresponding to NBD1 (Fig. 1D). None of the enzymes used cut the probe except *Xho*I (Fig. 1D). Size markers (kb) are derived from λ phage DNA digested with *Hind*III. Restriction enzymes are: 1, *Bam*HI; 2, *Eco*RV; 3, *Hind*III; 4, *Kpn*I; 5, *Not*I; 6, *Sac*I; 7, *Xho*I. (B) Northern blot analysis of transfectants with the *PRP1* gene and wild-type LmFA1. Total RNA (5 µg) of logarithmic (1), stationary (2), and logarithmic transfectants pSNBR/8 kb *Sma*I-A LmFA1 promastigotes (3) were separated by electrophoresis, transferred to a nylon membrane, and hybridized with the 0.8 kb *Pst*I fragment corresponding to NBD1 (Fig. 1D). Ribosomal RNA (rRNA) was used as a loading control.

Fig. 4. Analysis of *PRP1* gene overexpression and reversal of *PEN^r*. Growth properties of *PEN^r*-resistant *Leishmania major* transfectant pSNBR/8 kb *Sma*I-B and reversal of resistance in constant and nontoxic concentration of VER. Symbols are: LmFA1 (Δ); transfectant pSNBR/8 kb *Sma*I-B (●); transfectant pSNBR/8 kb *Sma*I-B treated with nontoxic concentration of VER (15 µM) (○).

Table 2
Cross-resistance profile (IC₅₀ value) verified for transfected LmFA1 cells resistant to PEN

Drugs	LmFA1	pSNBR/8 kb <i>Sma</i> I-A	Fold resistance	n	P
Cyclosporin-A ^a	2.625 ± 0.53	2.475 ± 0.16	0.95 ± 0.07	4	ns
Glucantime ^b	33 ± 3.46	34 ± 3.65	1.05 ± 0.20	4	ns
Miltefosine ^a	0.64 ± 0.03	0.65 ± 0.03	1.01 ± 0.08	4	ns
SbCl ₃ ^b	0.40 ± 0.11	1.52 ± 0.2	3.87 ± 0.81	6	<0.001

Fold resistance is the ratio of IC₅₀ for pSNBR/8 kb *Sma*I-A transfected parasites and LmFA1 cells. ns—not significant.

^a Concentration in µg/ml.

^b Concentration in mg/ml.

cross-resistance was not observed to glucantime (meglumine antimoniate), miltefosine, or Cyclosporin-A (Table 2).

4. Discussion

ABC transporters have been identified from different species of *Leishmania* [33]. In this report, we described a new member of ABC transporter superfamily in *Leishmania* related to PEN^r. For identification of this drug resistance gene, genomic libraries were transfected in *L. major* and parasites bearing cosmids mediating PEN^r were isolated [11].

Hybridizations and sequence comparisons showed that the *PEN1* locus was not related to other loci implicated in drug resistance in *Leishmania* previously characterized by overexpression selection, including *SQS1* for terbinafine and itraconazol, *DHFR-TS* and *PTR1* for methotrexate, and *TOR* for tubercidin [11]. *PEN1* instead encodes the PRP1 (Figs. 1 and 2), a new member of the ABC transporter superfamily with high similarity with members of MRP-like family (around 30–40%) (Fig. 2A). *PRP1* is a single copy gene which maps to a 1500 kb chromosome, and thus identifies a new ABC transporter locus (Fig. 3A). Phylogenetic analysis showed that *Leishmania* PRP1 represents the most evolutionarily distant group of the PGPs, diverging even before the mammalian and trypanosomatids MRP-like members (PGPA, PGPE, TcPGP2) diverge from each other (Fig. 2B). By these criteria, PRP1 represents a new family of ABC transporters.

Although the modest levels of PEN^r observed in transfected cells, *PRP1* gene clearly mediated PEN^r in LmFA1 cells: (1) the resistance levels of diverse constructs containing *PRP1* were statistically significant (Table 1; Fig. 1); (2) the level of resistance seen has proven to be significant in other drug selection tests involving cosmid transfections selected with terbinafine and itraconazol [11], or from endogenous amplification, as vinblastine [17,19], or primaquine [8]; and (3) as irrelevant DNA regions were eliminated from the starting cosmid cosPEN1-A, an increase of the resistance level was found (Table 1) [9,11,34]. While we were unable to visualize the endogenous PRP1 transcript, a 6 kb transcript sufficient to encode PRP1 was observed in pSNBR/8 kb *Sma*I-A transfectants (Fig. 3B).

Diamidines enter *T. brucei* cells via P2 nucleoside transporter and/or at least two other transporters [35–37]. Signifi-

cantly, Basselin et al. showed that PEN uptake in *L. mexicana* was not mediated by nucleoside transporters but by a carrier that recognizes diamidines with high affinity [4]. These authors showed that the mitochondrion may be the main target of PEN action in *Leishmania*, as resistance involved decreased mitochondrial PEN accumulation in resistant parasites [4]. Our data raise the possibility that PRP1 encodes a transporter involved in the decrease of mitochondrial PEN uptake observed by these authors. Consistent with this possibility, reversion of PEN resistant by VER was also observed in the PEN^r *L. mexicana* cells [4].

PRP1 also conferred cross-resistance to SbCl₃ (Table 2), as seen previously for PGPA of *L. major* to Sb(III) tartrate, SbCl₃, and SbO₃ [9]. Although trivalent antimonials are not used to treat human leishmaniasis, it has been proposed that pentavalent derivatives are metabolized in vivo into trivalent antimony [38].

In conclusion, we have described a new member of the ABC transporter superfamily which mediates PEN^r following overexpression in *Leishmania*. The properties of this transporter suggest that it may be related to ones implicated in *L. mexicana* in PEN^r mutants [4]. Future studies will address this possibility, and the role of PRP1 in *Leishmania* metabolism.

Acknowledgements

We thank Norton Heise for verapamil, Luiz R.O. Tosi for helpful in transpositions, and the Sanger Institute Websites, the *Leishmania* Genome Network, the National Institutes of Health, and the Wellcome Trust for access of *L. major* genome sequence data. This work was supported by grants from The Pew Charitable Trust, TDR-WHO, LIM-48-FMUSP-Brazil, FAPESP-Brazil (95/9305-9 and 97/00541-7), the National Institutes of Health AI21903 (to S.M.B.) and CNPq-Brazil (to A.C.C. and P.C.C.).

References

- [1] Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999;354:1191–9.
- [2] Sands M, Kron MA, Brown RB. Pentamidine: a review. Rev Infect Dis 1985;7:625–34.
- [3] Basselin M, Badet-Denisot MA, Robert-Gero M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. Acta Trop 1998;70:43–61.

- [4] Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to Pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3731–8.
- [5] Segovia M. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 1994;88:123–30.
- [6] Beverley SM. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 1991;45:417–44.
- [7] Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:427–60.
- [8] Ellenberger TE, Beverley SM. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1989;264:15094–103.
- [9] Callahan HL, Beverley SM. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1991;266:18427–30.
- [10] Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Ouellette M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltpgpA* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* 1994;269:11980–6.
- [11] Cotrim PC, Garrity LK, Beverley SM. Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. *J Biol Chem* 1999;274:37723–30.
- [12] Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989;58:137–71.
- [13] Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67–113.
- [14] Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J* 1990;9:1027–33.
- [15] Legare D, Hettema E, Ouellette M. The P-glycoprotein-related gene family in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1994;68:81–91.
- [16] Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Olivier M, Ouellette M. Gene disruption of the P-glycoprotein related gene *pgpa* of *Leishmania tarentolae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224:772–8.
- [17] Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 1992;12:2855–65.
- [18] Katakura K, Iwanami M, Ohtomo H, Fujise H, Hashiguchi Y. Structural and functional analysis of the *LaMDR1* multidrug resistance gene in *Leishmania amazonensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:289–94.
- [19] Chow LM, Wong AK, Ullman B, Wirth DF. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60:195–208.
- [20] Akopyants NS, Clifton SW, Martin J, Pape D, Wylie T, Li L, et al. A survey of the *Leishmania major* Friedlin strain V1 genome by shotgun sequencing: a resource for DNA microarrays and expression profiling. *Mol Biochem Parasitol* 2001;113:337–40.
- [21] da Silva RP, Sacks DL. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* 1987;55:2802–7.
- [22] Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* 1990;10:1084–94.
- [23] Ellenberger TE, Beverley SM. Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *Leishmania major* are independent of R or H region amplification. *J Biol Chem* 1987;262:13501–6.
- [24] Ryan KA, Dasgupta S, Beverley SM. Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene* 1993;131:145–50.
- [25] Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol* 1993;59:327–9.
- [26] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [27] Tosi LR, Beverley SM. *cis* and *trans* factors affecting *Mos1* mariner evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 2000;28:784–90.
- [28] Pedrosa AL, Cruz AK. The effect of location and direction of an episomal gene on the restoration of a phenotype by functional complementation in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:141–8.
- [29] Callahan HL, Beverley SM. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1992;267:24165–8.
- [30] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001;305:567–80.
- [31] Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385–427.
- [32] Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, Gonzalez-Ros JM, del Moral RG, Ferragut JA, et al. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem Pharmacol* 1998;55:131–9.
- [33] Perez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol* 2001;4:159–66.
- [34] Singh AK, Papadopoulou B, Ouellette M. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Exp Parasitol* 2001;99:141–7.
- [35] Carter NS, Berger BJ, Fairlamb AH. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *J Biol Chem* 1995;270:28153–7.
- [36] de Koning HP, Jarvis SM. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Trop* 2001;80:245–50.
- [37] De Koning HP. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Mol Pharmacol* 2001;59:586–92.
- [38] Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1234–9.

Short communication

Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*Adriano C. Coelho^a, Edite H. Yamashiro-Kanashiro^a, Sueli F. Bastos^a,
Renato A. Mortara^b, Paulo C. Cotrim^{a,*}^a Instituto de Medicina Tropical, Dept. Moléstias Infecciosas e Parasitárias, São Paulo University Medical School,
Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 470-4° Andar, 05403-900 São Paulo, Brazil^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP-Escola Paulista de Medicina,
R. Botucatu, 862-6° Andar, 04023-062 São Paulo, Brazil

Received 4 April 2006; received in revised form 29 August 2006; accepted 30 August 2006

Available online 20 September 2006

Keywords: *Leishmania major*; Pentamidine; Drug resistance; ABC transporter; PRP1

Leishmania spp. is the causative agent of leishmaniasis, a parasitic protozoan disease that affects 12 million people. There are around 350 million people exposed to the risk of infection by different species of *Leishmania* [1]. The primary control measure against leishmaniasis is chemotherapy, and pentavalent antimonials are the main drugs used. Amphotericin B and Pentamidine (PEN) are second-line drugs used as alternatives to pentavalent antimony in leishmaniasis treatment [2]. PEN is accumulated by the parasite, and although the primary mode of action is still unclear, its effects include binding and disintegration of kinetoplast DNA [2]. Unfortunately, however, chemotherapy is confronted with ever more frequent cases of resistance. The mitochondrion is an important target of PEN action in kinetoplastids, and a decreasing accumulation of this drug in mitochondria in *Leishmania mexicana* resistant to PEN has been demonstrated [3]. This mechanism of drug resistance appears to be related to reduced mitochondrial membrane potential and is probably caused by a decrease in mitochondrial dehydrogenase and F₁F₀ ATPase activities [3,4]. Studies into the mechanism of drug resistance are thus crucial to allow more rational use of drugs and so minimize or overcome resistance.

In eukaryotic cells, the ABC (ATP-binding cassette) transporter superfamily is made up of highly conserved proteins consisting of two transmembrane domains and two nucleotide binding domains (NBD) that contain the conserved Walkers A and B motifs as well as the ABC transporter signature [5]. In *Leishmania*, 23 ABC transporter genes have been listed in the Genome Project [6], and at least three families of ABC transporters have been described: (1) the ABCA family, whose members are not related to drug resistance [7,8]; (2) the ABCB family that includes MDR1, whose overexpression confers resistance to vinblastine and other hydrophobic drugs [9]; and (3) the ABCC family that includes MRPA (PGPA), a protein related to arsenite and antimonials resistance [10–12].

Recently, we described an ABC transporter termed PRP1 (pentamidine resistance protein 1) that is related to PEN resistance and cross-resistant to trivalent antimonials in *L. major* when overexpressed [13]. As other ABC transporters previously described, the biological role of PRP1 in *Leishmania* metabolism is unclear. PRP1 shares few identity with members of ABC families (less than 40%), indicating that PRP1 is a different ABC transporter belonging to a new ABC family [13]. PRP1 is a single-copy gene located in chromosome 31 (1500 kb) and corresponds to the first gene identified as being related to PEN resistance in *Leishmania* [13]. Searches in other trypanosomatid (*Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*) genome databases did not identify a sequence related to PRP1, indicating that this ABC transporter is specific to genus *Leishmania*. Previous analyses of Southern blot data indicated the presence of related PRP1 sequences in other *Leishmania* species (data not shown). In yeast, the product of the *PNT1* gene mediates PEN

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; GFP, green fluorescent protein; kb, kilobase; MDR, multidrug resistance; MRP, multidrug resistance protein; NBD, nucleotide-binding domain; PCR, polymerase chain reaction; PEN, pentamidine; PRP1, pentamidine resistance protein 1; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30617024; fax: +55 11 3062 3622.

E-mail address: pccotrim@usp.br (P.C. Cotrim).

Fig. 1. Analysis of *PRP1* expression. (A) Northern blot analysis of cosPEN1-A and wild-type *L. major*. Total RNA (10 µg) of wild-type *L. major* (1) and transfectant cosPEN1-A (2) were separated by electrophoresis, transferred to a nylon membrane and hybridized [32] with a 0.8 kb *Pst*I fragment corresponding to the NBD1 of PRP1. Ribosomal RNA (rRNA) was used as a loading control. (B) RT-PCR amplification products using the specific primer PRP1R (5'-GCGGTCGACGCTCATCGCTCTCTAC-3') for cDNA synthesis, degenerate PRP1 primers NBDIF (5'-GCGGAATCCYCGCMGSRMRGYTGACRGTKGTG-3') and NBDIR (5'-GCGGTCGACMGTSYAGCAGCGCGTCTTGCC-3') for PCR and total RNA from wild-type *L. major* promastigotes (3), cosPEN1-A (4) and pSNBR/8 kb *Sma*I-A (5). Reactions without reverse transcriptase confirmed the absence of contaminating DNA in samples (2) and reactions without cDNA were used for PCR control (1). (C) The acceptor-splicing AG dinucleotides at position 358 from the translation-initiation site are in bold and underlined. The polypyrimidine tracts preceding the spliced leader acceptor are underlined. (D) The polyadenylation sites at position +260 and +361 downstream of the stop codon are in bold and underlined.

resistance when overexpressed, and its localization is mitochondrial [14]. Sequence analysis of PNT1 indicates no similarity with ABC transporters, including PRP1 (data not shown).

Cellular localization of ABC transporters in *Leishmania* has recently been described. Members of the ABCA family have been found at both the plasma membrane and flagellar pocket (ABCA1) [7], or restricted to the flagellar pocket, as ABCA2 [8]. Members of ABCB and ABCC families (respectively, MDR1 and MRPA), are located close to the flagellar pocket and are associated with intracellular membranes of structures known to be related to exocytic and endocytic pathways [15,16].

Gene amplification is a common survival mechanism used by *Leishmania* strains selected for resistance to several drugs such as methotrexate, terbinafine, vinblastine and antimonials [9,11,17–19]. In *Leishmania infantum*, amastigotes selected for resistance to potassium antimonyl tartrate [Sb(III)] have the *MRPA* gene amplified as part of an extrachromosomal circle and expressed in higher levels [20]. These recent data show that gene amplification can occur in *Leishmania* amastigotes and medi-

ate drug resistance in the parasite form treated with the drug. Resistance mediated by gene amplification does not, however, appear to be involved in mutant promastigotes resistant to PEN in *Leishmania major* [17]. On the other hand, PRP1 expression does occur in wild-type amastigotes of *Leishmania donovani* that are sensitive to, and those that are resistant to, pentavalent antimonials [21].

With regard to PRP1 expression, we have previously observed by Northern blot analysis that transfectants overexpressing *PRP1* contain transcripts that are not detected in wild-type promastigotes [13]. These data were confirmed using a transfectant containing a 35 kb extension of the *PRP1* locus (cosPEN1A) where a higher transcript (10 kb) was detected in the transfectant, but not in wild-type *L. major* (Fig. 1A). Several authors have shown that detection of *Leishmania* ABC transporter transcripts by Northern blot analysis in wild-type parasites is difficult because of the low levels of expression [7–9,19]. We therefore performed RT-PCR using internal primers of *PRP1* directed to the NBD1 domain of PRP1 and obtained specific products of 618 bp when total RNA from wild-type parasites as well as

different transfectants of *L. major* were used (Fig. 1B). The processing sites of the mRNA of *PRP1* were also detected. Sequencing analysis of the amplified products detected the 5' and 3' processing sites of *PRP1* mRNA. Only one trans-splicing site was identified, located 358 nucleotides upstream from the putative translation initiation region of the *PRP1* transcript (Fig. 1C). It was located by reverse transcription using cDNA synthesized from promastigotes and then amplified with a spliced-leader primer and an antisense primer (*PRP1* 5'1) corresponding to a region 300 nucleotides downstream of the ATG triplet of *PRP1* (data not shown). In addition, two polyadenylation sites were identified using cDNA synthesized with an antisense primer consisting of polyT fused to an Adapter Primer (AP) (Gibco-BRL) and amplified with an Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) and an antisense primer corresponding to the 3' end of *PRP1* (*PRP1* 3'2). The polyadenylation sites were 260 and 361 nucleotides downstream of the stop codon (Fig. 1D). Our data indicated that the *PRP1* mRNA is 6042 nucleotides long, the coding region contains 5424 nucleotides, the 5' UTR contains 358 nucleotides and the 3' UTR is at least 260 nucleotides long.

Expression of *PRP1* in wild-type and transfectant parasites was first detected using anti-GST-*PRP1* polypeptide antibodies directed to the NBD1 of *PRP1*. Polyclonal antiserum clearly recognized a single and, expected protein of approximately 180 kDa in transfectants pSNBR/8 kb *SmaI*-B by Western blot. This protein was weakly detected in wild-type parasites, with no signal detected in rabbit preimmune serum (data not shown). Similarly, a low level of MRPA expression was observed in analysis of *Leishmania* wild-type [22]. These data lead us to suggest that despite the low level of *PRP1* gene expression, its presence appears to be sufficient for it to be involved in PEN susceptibility in wild-type promastigote parasites. This hypothesis is corroborated by the fact that Northern blot analysis also failed to detect *MDR1* and *MRPA* transcripts in wild-type promastigotes [9,19], although the respective null mutants showed increased sensitivity to arsenite, antimonite (*MRPA*) and vinblastine (*MDR1*) [12,16].

To reinforce that, three different transcripts encoding ABC transporters were also detected in *Trypanosoma brucei* by RT-PCR [23]. Among them, the ABC transporter *MRPA*, involved

in resistance to melarsoprol, had its expression hardly detected in wild-type parasites by Western blot [24]. On the other hand, there are no differences in the expression level of *Trypanosoma cruzi* ABC transporters *PGP1* and *PGP2* in parasites that are sensitive to or those that are resistant to benznidazole and nifurtimox. Indeed, expression of both genes was detected by Northern and Western blot [25], probably indicating a different mechanism of resistance for these parasites not associated to these ABC transporters.

Alterations in the expression level of genes not directly implicated in amplification were also observed in *Leishmania* mutants resistant to SbIII and methotrexate [26,27]. Similarly, in PEN resistant parasites, higher levels of *PRP1* transcripts and alterations in expression of other unknown genes could be responsible for the resistance phenotype indicating a possible mechanism unrelated to gene amplification, once it was demonstrated that at least in *L. major* gene amplification is not associated with PEN resistance [17]. Another possibility that could involve *PRP1* in PEN resistance would be mutations in this ABC transporter that could give an increasing in the transporter activity.

For cellular localization, *PRP1* C-terminus was fused with GFP, yielding *PRP1*-GFP. We first verified that *PRP1*-GFP fusion was functional and was able to confer a threefold increase in resistance to PEN on transfected promastigotes (plasmid pXG-*PRP1*-GFP, $IC_{50} = 2.25 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$, compared with wild-type *L. major* $IC_{50} = 0.68 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$), a similar level observed with transfectants containing only *PRP1* [13]. Similarly transfectants containing *PRP1*-GFP fusion also had their PEN resistance phenotype reversed by verapamil (plasmid pXG-*PRP1*-GFP, $IC_{50} = 2.25 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$, compared with plasmid pXG-*PRP1*-GFP treated with $15 \mu\text{M}$ of verapamil $IC_{50} = 0.69 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$) and are cross-resistant to trivalent antimonials (data not shown).

Confocal microscopy analyses of transfected promastigotes imaged live showed that *PRP1* is intracellular and located next to the kinetoplast with a large proportion of the GFP signal concentrated within of a distinct intracellular compartment (Fig. 2B, E and F). We also observed that GFP signal was located in a tubular compartment in structure and oriented along the lateral-longitudinal axis of transfected parasites (Fig. 2B, E and F). In view of this, it is probable that *PRP1* is located at the tubulovesicular element responsible in part for the exocytic and endocytic

Fig. 2. *PRP1* is intracellular in *L. major*. To construct the plasmid pXG-*PRP1*-GFP, the *PRP1* gene was amplified by PCR using a high fidelity polymerase (Amersham) with the primers *PRP1*-GFP-F (5'-GCGAGATCTTCGATGAGCAGCCAGCGACCGAG-3') and *PRP1*-GFP-R (5'-GCGCCCGGGA-CAGTGCATGAGCGACGCGAC-3'). The 5.4 kb product was purified and cloned in the previously digested pXG-*GFP* plasmid [33] with *SmaI*. The accuracy of the construct was verified by restriction digest mapping and sequencing of the junction sequence between of *PRP1* and *GFP* genes. Imaging of transfected live cells was carried out by immobilizing parasites in 1% (w/v) low melting point agarose in PBS containing 1% glucose. For fluorescent staining, promastigotes were incubated with 0.1 mM Hoechst 33342 (2,5'-Bi-1H-benzimidazole, 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-trihydrochloride, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and LysoTracker (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 30 min. Samples were washed three times in PBS and *L. major* promastigotes were then imaged in a BioRad 1024UV confocal system attached to a Zeiss Axiovert 100 microscope using a 1.4 NA 100 $\times$ DIC oil immersion PlanApoChromatic objective [34]. Images were then processed with Image-J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and Adobe Photoshop. *L. major* transfected with pXG-*PRP1*-GFP (A–F). (A) Differential interference contrast (DIC) image. Localization of *PRP1* was determined by GFP fluorescence that is concentrated close to the kinetoplast (arrow) and along a tubule (arrowhead) (B). Acidic organelles were labeled using LysoTracker (C). Hoechst 33342 was used to stain DNA (both nuclear and kinetoplast) (D). Merged image showing the intracellular location of GFP-*PRP1* (cyan) and Hoechst 33342 (red) on the DIC image. *PRP1* was also observed in a tubular compartment along the parasite (arrowhead), and next to the kinetoplast (arrow in E). Merged image of B–D showing the localization of acidic organelles (red), nuclear and kinetoplast DNA (blue) and GFP (yellow); the yellow hue (arrowhead and arrow) corresponds to the co-localization of LysoTracker and GFP (F). Bar in A = 5 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

pathways [28,29], as observed for MRPA and MDR1 [15,16]. The acidic compartment corresponding to these tubulovesicular elements were analyzed using Lyso-Tracker-RedTM (Molecular Probes, Eugene, OR) a fluorophore that labels acidic organelles like endosomes and lysosomes. This fluorescent probe was observed along the parasite (Fig. 2F) and in a merged image of GFP and Lyso-Tracker-RedTM a co-localization (yellow) in the tubular structure was observed (Fig. 2F). These data indicated that the tubular compartment containing GFP is acidic in nature. Considering the localization of the yeast *PNT1* gene product to the mitochondrion [14], and the biochemical implication of mitochondrial changes underlying resistance to PEN in *Leishmania* [3,4], it is important to state that our data led us to conclude that PRP1 is not associated with the mitochondrion in *L. major* (Fig. 2E).

We are proposing a mechanism of PEN resistance mediated by PRP1. PEN would be taken up by a high-affinity PEN transporter, probably a proton symporter, similar as described in *L. mexicana* [3]. The ABC transporter PRP1 would confer resistance by sequestering PEN in vesicles that would be exocytosed by the cell throughout the flagellar pocket. It is well known that the flagellar pocket is located at the flagellum base and is related to cellular endocytosis and exocytosis in trypanosomatids [30]. Similarly, MRPA, acting on metal–thiol conjugates, is also associated with intracellular membranes, where sequestration of metals into the vesicles could be exocytosed [15]. Nevertheless, Basselin et al. (2002) showed that in wild-type *L. mexicana* PEN is accumulated into the mitochondrion, while in resistant parasites PEN remains free in cytosol. They also state that an ABC transporter inhibited by verapamil like PRP1 [13], and other compounds like trifluoperazine and prochlorperazine would be responsible for removing cytosolic PEN from the cell [3]. It is possible that this efflux could not be directly driven by a plasma membrane ABC transporter, but it could equally involve pumping PEN into a vesicle followed by vesicular efflux. In this hypothesis, PRP1 could have an important role to remove PEN from the cytosol of *Leishmania*. In *L. major* genome, 23 members of the ABC transporter family have been described [6] most of which have not yet been characterized. Further studies are needed to identify these ABC transporters members and elucidate more precisely the mechanism of sensitivity and resistance to PEN.

In *L. donovani* cells raised by step-wise PEN selection, PEN efflux has not been evidenced [4]. In this cells P-glycoprotein mediated efflux of PEN seems to be not operative as it is in *L. mexicana* [3], or in *L. major* over-expressing episomal PRP1, as we are suggesting in this work. However, it is important to point out here that differences at molecular level amongst *Leishmania* species are generally accepted as a reason for the variation in the pharmacological efficacy of anti-*Leishmania* compounds [31].

The role of PEN in *Leishmania* metabolism remains unclear, and PRP1 seems to have an important role in PEN sensitivity/resistance. We have already reported that even in nontoxic concentrations the calcium-channel blocker verapamil is an important inhibitor of PRP1 [13]. We thus propose that this compound could be used experimentally in association with PEN to determine its efficacy against *Leishmania* amastigotes in vitro

and in vivo, and also in future as a therapeutic option in patients with leishmaniasis.

Acknowledgements

We thank Silvia R.B. Uliana for primers AP and AUAP and Heitor Franco de Andrade Junior and Antonio Sesso for helpful discussions and suggestions. This work was supported by FAPESP-Brazil (02/09562-7), CNPq (473121-2) and LIM-48-FMUSP-Brazil, and by fellowships from CNPq (PCC, RAM) and CAPES (ACC).

References

- [1] Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354(9185):1191–9.
- [2] Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19(11):502–8.
- [3] Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(12):3731–8.
- [4] Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barrett MP, Madhubala R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2006;145(1): 1–10.
- [5] Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Ann Rev Cell Biol* 1992;8:67–113.
- [6] Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005;309(5733):436–42.
- [7] Parodi-Talice A, Araujo JM, Torres C, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* 2003;1612(2):195–207.
- [8] Araujo-Santos JM, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(1):349–55.
- [9] Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 1992;12(6):2855–65.
- [10] Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *Embo J* 1990;9(4):1027–33.
- [11] Callahan HL, Beverley SM. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1991;266(28):18427–30.
- [12] Papadopoulos B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Olivier M, Ouellette M. Gene disruption of the P-glycoprotein related gene *pgpa* of *Leishmania tarentolae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224(3):772–8.
- [13] Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130(2): 83–90.
- [14] He S, Fox TD. Mutations affecting a yeast mitochondrial inner membrane protein, *pnt1p*, block export of a mitochondrially synthesized fusion protein from the matrix. *Mol Cell Biol* 1999;19(10):6598–607.
- [15] Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, et al. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* 2001;276(28):26301–7.
- [16] Dodge MA, Waller RF, Chow LM, et al. Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol* 2004;51(6):1563–75.
- [17] Ellenberger TE, Beverley SM. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1989;264(25):15094–103.

- [18] Beverley SM, Coderre JA, Santi DV, Schimke RT. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell* 1984;38(2):431–9.
- [19] Papadopolou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Ouellette M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltpgpA* to oxanion resistance. *J Biol Chem* 1994;269(16):11980–6.
- [20] El Fadili K, Messier N, Leprohon P, et al. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(5):1988–93.
- [21] Decuyper S, Rijal S, Yardley V, et al. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(11):4616–21.
- [22] Legare D, Papadopolou B, Roy G, et al. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1997;87(3):275–82.
- [23] Maser P, Kaminsky R. Identification of three ABC transporter genes in *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitol Res* 1998;84(2):106–11.
- [24] Alibu VP, Richter C, Voncken F, et al. The role of *Trypanosoma brucei* MRPA in melarsoprol susceptibility. *Mol Biochem Parasitol* 2006;146(1):38–44.
- [25] Murta SM, dos Santos WG, Anacleto C, Nirde P, Moreira ES, Romanha AJ. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Mol Biochem Parasitol* 2001;117(2):223–8.
- [26] Guimond C, Trudel N, Brochu C, et al. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2003;31(20):5886–96.
- [27] Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 2005;57(6):1690–9.
- [28] Ghedin E, Debrabant A, Engel JC, Dwyer DM. Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. *Traffic* 2001;2(3):175–88.
- [29] Mullin KA, Foth BJ, Ilgoutz SC, et al. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell* 2001;12(8):2364–77.
- [30] McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66(1):122–54, table of contents.
- [31] Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in *Leishmaniasis*. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):111–26.
- [32] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [33] Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;77(1):57–64.
- [34] Barros HC, Verbisck NV, Da Silva S, Araguth MF, Mortara RA. Distribution of epitopes of *Trypanosoma cruzi* amastigotes during the intracellular life cycle within mammalian cells. *J Eukaryot Microbiol* 1997;44(4):332–44.

Role of the ABC Transporter PRP1 (ABCC7) in Pentamidine Resistance in *Leishmania* Amastigotes[▽]

Adriano C. Coelho,¹ Nadine Messier,² Marc Ouellette,² and Paulo C. Cotrim^{1*}

Instituto de Medicina Tropical, Depto. Moléstias Infeciosas e Parasitárias, São Paulo University Medical School, Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 470, 4º andar, São Paulo 05403-900, Brazil,¹ and Centre de Recherche en Infectiologie du Centre de Recherche du CHUL and Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada²

Received 23 March 2007/Returned for modification 6 April 2007/Accepted 14 April 2007

Pentamidine is a second-line agent in the treatment of leishmaniasis, whose mode of action and resistance mechanism are not well understood. In this work, we show that the intracellular ABC protein PRP1 (pentamidine resistance protein 1) (ABCC7) can confer resistance to pentamidine in the intracellular stage of the parasite *Leishmania*.

Fn1 Leishmaniasis is a significant cause of morbidity and mortality in several countries, and its clinical manifestation depends on species, host genetic factors, and immune response (19). Treatment depends on chemotherapy, where pentavalent antimonials are still the mainstay against all *Leishmania* species (12, 19). Antimonial drug resistance has increased the use of second-line drugs, including miltefosine, amphotericin B, and pentamidine, despite their associated adverse reactions (6, 19). The mechanism of action of pentamidine is unclear in *Leishmania*; however, mitochondrion appears to be an important target of this drug (1, 5, 6). Different pentamidine-resistant *Leishmania* species exhibited reduced accumulations of the drug both in the mitochondrion and in the cytosol (1, 16). In the case of *Leishmania mexicana*, it was proposed that pentamidine would be excluded from the cell by an ATP-binding cassette (ABC) transporter (1) although the situation appears different for *Leishmania donovani* (16). The protein responsible for decreased accumulation in mitochondria is still unknown.

Several ABC proteins contain two transmembrane domains and two conserved nucleotide binding domains with three characteristic motifs: the Walker A and B motifs and the signature C motif of the ABC transporters (13). Eight different subfamilies of ABC transporters (ABCA to ABCH) have been described for eukaryotic cells (7), and representatives of all subfamilies are also present in *Leishmania* (15). Some members of ABC transporter subfamilies were characterized and associated with drug resistance in *Leishmania*. A homologue of the human P glycoprotein was found to confer resistance to a number of drugs, including miltefosine (reviewed in reference 20). The ABC transporter PRP1 (pentamidine resistance protein 1) (ABCC7) was shown to confer pentamidine resistance in the promastigote form of *Leishmania major* (3). This ABC transporter is specific to the genus *Leishmania* since no orthologues

were found in the genome of the related parasites *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* (15). PRP1 is part of the *Leishmania* ABCC subfamily, which also includes MRPA (ABCC3), a protein involved in antimony resistance in *Leishmania* (8, 14). PRP1 and MRPA are intracellular proteins and are possibly associated with the tubulovesicular element that is linked to exo- and endocytosis pathways (4, 11, 18). We hypothesized that PRP1 would transport pentamidine into an intracellular organelle that would be exocytosed by the cell throughout the flagellar pocket (4). These data are derived from work with promastigotes, and in this study, we have tested whether PRP1 can confer resistance to pentamidine in the more relevant amastigote stage of the parasite.

We first transfected the PRP1 gene (3) in *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) promastigotes, which by growth of cells at 37°C and an acidic pH can differentiate easily in axenic amastigotes (24). The PRP1 transfectants were ~3-fold more resistant to pentamidine when grown as axenic amastigotes (Fig. 1). The amastigote

FIG. 1. PRP1 confers pentamidine resistance in *Leishmania infantum* axenic amastigotes. A growth curve is shown for *L. infantum* axenic amastigotes in MAA medium (24) in the presence of pentamidine. Promastigote parasites were transfected with the plasmids indicated (the control plasmid, pSNBR [22]; PRP1 [pSNBR/8-kb SmaI-A] [3]; and PRP1-GFP [4]) and induced for differentiation to axenic amastigotes (24). Experiments were done in triplicate. *Li*, *L. infantum*.

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 4º andar, São Paulo 05403-900, Brazil. Phone: 55-11-306167024. Fax: 55-11-30623622. E-mail: pccotrim@usp.br.

[▽] Published ahead of print on 23 April 2007.

FIG. 2. Cellular localization of the construct PRP1-GFP. The fusion protein was studied by fluorescence microscopy with *L. infantum* axenic amastigotes. Transfectant parasites were immobilized in 1% (wt/vol) low-melting-point agarose in phosphate-buffered saline and observed with a Nikon Eclipse TE300 microscope (100× objective) using appropriate GFP excitation/emission filters (HYQ filter cube; Nikon). A, phase contrast; B, GFP fluorescence; C, panels A and B merged.

nature of our cell culture was confirmed by monitoring the expression of the amastin gene that is known to be specifically expressed in amastigotes (27). Indeed, the expression of amastin was increased 20 times in *L. infantum* axenic amastigotes, as determined using established quantitative real-time reverse transcription-PCR protocols (10, 17) (data not shown). A PRP1-green fluorescent protein (GFP) fusion has allowed the localization of this fusion protein to an intracellular organelle in the promastigote stage of the parasite (4). Transfection of PRP1-GFP in *L. infantum* and differentiation of the parasite in amastigotes have permitted a demonstration that this fusion protein confers pentamidine resistance (Fig. 1) and is also located intracellularly (Fig. 2).

PRP1 can confer pentamidine resistance in axenic amastigotes. We then attempted to show its role in resistance in intracellular parasites by using the THP-1 infection model and luciferase-expressing parasites (21, 26). This was not possible with the *L. infantum* strain used, possibly due to its higher intrinsic resistance to pentamidine inside macrophages (Table 1). It is salient that the same *L. infantum* strain was also not useful for monitoring the role of MRPA in pentavalent antimony resistance inside macrophages (8).

The PRP1 construct was then transfected in the promastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) and *L. (L.) major* LV39 strains. These PRP1 transfectant promastigote cells were more resistant to pentamidine (data not shown). Recombinant promastigotes were used for infecting the human monocyte cell line THP-1. The transfectants of these two species transfected with PRP1 were three times more resistant to pentamidine

than those of the control transfected line containing pSNBR (Fig. 3).

The calcium channel blocker verapamil, known to reverse multidrug resistance in mammalian cells (2, 23), was also shown to modulate the activities of *Leishmania* efflux ABC transporters (9). Pentamidine resistance could be reversed by the use of nontoxic concentrations of verapamil in *L. mexicana* promastigotes (1), although no reversal of resistance was observed in pentamidine-resistant *L. mexicana* axenic amastigotes treated with verapamil (25). Nontoxic concentrations of verapamil were able to increase the intrinsic pentamidine susceptibilities in the intracellular forms of three *Leishmania* species (Table 1). This prompted us to test whether verapamil had the ability to reverse PRP1-mediated pentamidine resistance. The use of subtoxic concentrations of verapamil has not, however, reversed PRP1-mediated resistance (results not shown).

This study has shown that the *Leishmania* ABC transporter PRP1 (ABCC7) can confer resistance to pentamidine in the amastigote stage and in intracellular parasites. It remains to be seen whether overexpression of PRP1, as recently shown for MRPA in an antimony-resistant field isolate (17), is observed in patients for whom pentamidine treatment has failed.

We thank J. J. Shaw for the *L. amazonensis* strain.

This work was supported by CNPq (473121-2), LIM-48, and FAPESP (06/04656-4) and by fellowships from CNPq (P.C.C.) and CAPES (A.C.C.). A.C.C. acknowledges the help of CAPES for a brief visit to Canada. Work in the M.O. laboratory is supported by CIHR Group and operating grants. M.O. is a Burroughs Wellcome Fund

TABLE 1. Sensitivities to pentamidine, verapamil, and a combination of the two drugs verified for wild-type *Leishmania* amastigote parasites^a

Species	Sensitivity (50% inhibitory concentration) for:			P
	PEN (μg/ml)	VER (μM)	PEN-VER combination ^b	
<i>L. major</i>	5.1 ± 1.5	40.3 ± 10.1	3.2 ± 0.3 μg/ml, 15 μM	<0.05
<i>L. amazonensis</i>	6.8 ± 1.2	19.1 ± 3.9	2.8 ± 0.3 μg/ml, 15 μM	<0.05
<i>L. infantum</i>	10.0 ± 1.7	43.2 ± 7.1	4.7 ± 1.7 μg/ml, 20 μM	<0.05

^a Promastigote parasites were transfected with the plasmid pSP1.2LUCαHYGα (21) and used to infect THP-1 cells (26). The 50% inhibitory concentrations were determined by luciferase activity (percent relative light units). The means ± standard deviations for at least three independent experiments done in triplicate are given. P values significantly different from those for the parasites treated with nontoxic concentrations of verapamil are given. PEN, pentamidine; VER, verapamil.

^b Values are 50% inhibitory concentrations for pentamidine followed by those for verapamil.

FIG. 3. PRP1 mediates pentamidine resistance in intracellular *Leishmania* amastigotes. Luciferase-expressing amastigotes of *Leishmania* spp. were grown in a human leukemia monocyte cell line (THP-1 cells) as described previously (26). THP-1 cells were infected with stationary-phase *L. amazonensis* and *L. major* promastigotes in 24-microwell plates at a parasite/macrophage ratio of 15:1. Noninternalized parasites were removed by three washes, and pentamidine was added to the infected macrophages. After 4 days of infection with the drug, cells were washed and the luciferase activities of the luciferase gene-expressing recombinant parasites were determined as described elsewhere (21). Promastigote parasites were cotransfected with the plasmid pSNBR (22) or PRP1 (pSNBR/8kb SmaI-A) (3) and with the vector pSP1.2LUCαHYGα (27) to quantify intracellular parasites (21, 26). Experiments were done at least three times in triplicate. Values are represented as numbers of relative light units (RLU). *La*, *L. amazonensis*; *Lm*, *L. major*.

Scholar in Molecular parasitology and the holder of a Canada Research Chair in antimicrobial resistance.

REFERENCES

- Basselin, M., H. Denise, G. H. Coombs, and M. P. Barrett. 2002. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3731–3738.
- Bitonti, A. J., A. Sjoerdsma, P. P. McCann, D. E. Kyle, A. M. Oduola, R. N. Rossan, W. K. Milhous, and D. E. Davidson, Jr. 1988. Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science* **242**:1301–1303.
- Coelho, A. C., S. M. Beverley, and P. C. Cotrim. 2003. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **130**: 83–90.
- Coelho, A. C., E. H. Yamashiro-Kanashiro, S. F. Bastos, R. A. Mortara, and P. C. Cotrim. 2006. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **150**:378–383.
- Croft, S. L., and G. H. Coombs. 2003. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19**:502–508.
- Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:111–126.
- Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**:1156–1166.
- El Fadili, K., N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopoulos, D. Legare, and M. Ouellette. 2005. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1988–1993.
- Essodaigui, M., F. Frezard, E. S. Moreira, F. Dagger, and A. Garnier-Suillerot. 1999. Energy-dependent efflux from *Leishmania* promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. *Mol. Biochem. Parasitol.* **100**:73–84.
- Gagnon, D., A. Foucher, I. Girard, and M. Ouellette. 2006. Stage specific gene expression and cellular localization of two isoforms of the serine hydroxymethyltransferase in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **150**:63–71.
- Ghedini, E., A. Debrabant, J. C. Engel, and D. M. Dwyer. 2001. Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. *Traffic* **2**:175–188.
- Herwaldt, B. L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191–1199.
- Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:67–113.
- Legare, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulos, and M. Ouellette. 2001. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**:26301–26307.
- Leprohon, P., D. Legare, I. Girard, B. Papadopoulos, and M. Ouellette. 2006. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot. Cell* **5**:1713–1725.
- Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, M. H. Sahani, M. P. Barrett, and R. Madhubala. 2006. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**:1–10.
- Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, S. Singh, G. Roy, I. Girard, M. Chatterjee, M. Ouellette, and R. Madhubala. 2007. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:204–211.
- Mullin, K. A., B. J. Foth, S. C. Ilgoutz, J. M. Callaghan, J. L. Zawadzki, G. I. McFadden, and M. J. McConville. 2001. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Cell* **12**:2364–2377.
- Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies, and N. G. Saravia. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**:1561–1577.
- Perez-Victoria, J. M., A. Di Pietro, D. Barron, A. G. Ravelo, S. Castanys, and F. Gamarro. 2002. Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr. Drug Targets* **3**:311–333.
- Roy, G., C. Dumas, D. Sereno, Y. Wu, A. K. Singh, M. J. Tremblay, M. Ouellette, M. Olivier, and B. Papadopoulos. 2000. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**:195–206.
- Ryan, K. A., S. Dasgupta, and S. M. Beverley. 1993. Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene* **131**:145–150.
- Safa, A. R., C. J. Glover, J. L. Sewell, M. B. Meyers, J. L. Biedler, and R. L. Felsted. 1987. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J. Biol. Chem.* **262**:7884–7888.
- Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:972–976.
- Sereno, D., and J. L. Lemesre. 1997. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1898–1903.
- Sereno, D., G. Roy, J. L. Lemesre, B. Papadopoulos, and M. Ouellette. 2001. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1168–1173.
- Wu, Y., Y. El Fakhry, D. Sereno, S. Tamar, and B. Papadopoulos. 2000. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**:345–357.

Characterization of *Leishmania (Leishmania)* *amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine

**Adriano C. Coelho ^a, Luciana G. Gentil ^b, José Franco da Silveira ^b,
Paulo C. Cotrim ^{a *}**

^a Instituto de Medicina Tropical - São Paulo University Medical School, Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 470 - 4º andar, São Paulo – SP, 05403-900, Brazil.

^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP – Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 862 - 6º andar, 04023-062, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470; 4º andar, São Paulo – SP, 05403-900 – Brazil; Tel: +55-11-30617024; fax: +55-11-30623622; E-mail: pccotrim@usp.br

Keywords: *Leishmania*, pentamidine, drug resistance, ABC transporter.

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; kb, kilobase; PATH, potassium antimonyl tartrate trihydrate; PRP1, Pentamidine resistance protein 1.

ABSTRACT

Pentamidine is a second-line agent used in the treatment of leishmaniasis whose mode of action and mechanism of resistance is not well understood. It has been previously demonstrated that transfection of promastigotes and amastigotes with the ABC transporter *PRP1* gene confers resistance to pentamidine. To further clarify this point, we generated *L. amazonensis* resistant mutants to pentamidine. Our results indicated that this ABC transporter is not associated to pentamidine resistance in lines generated by drug pressure. Our data suggest that other mechanisms are involved, not associated to amplification or overexpression of this ABC transporter.

INTRODUCTION

Leishmania species are responsible to a spectrum of parasitic diseases known as leishmaniasis. There are 12 million of people infected with 400,000 new cases reported each year (Herwaldt, 1999). Leishmaniasis has a worldwide distribution with important foci in tropical and subtropical areas of the world. The vertebrate host is infected with flagellated, extracellular promastigotes of the parasite via the bite of a sand fly. These promastigotes forms become rapidly into nonflagellated amastigotes within the mononuclear phagocytes of the vertebrate host. The clinical manifestation of leishmaniasis depends on the species, host genetic factors and immune response (Murray, et al., 2005). The basic treatment consists in the administration of pentavalent antimonials sodium stibogluconate (Pentostam) and *N*-methylglucamine (Glucantime) although high toxicity and cases of drug resistance isolated from patients have been described (Herwaldt, 1999, Murray, et al., 2005). Second-line drugs like miltefosine, amphotericin B and pentamidine are less useful owing to problems associated with either cost or toxicity (Guerin, et al., 2002).

Pentamidine has been used for over 40 years as a second-line drug in leishmaniasis treatment (Croft, et al., 2006). The drug enters in promastigotes and amastigotes forms of the *Leishmania* cell via a carrier-mediated process which recognizes diamidines with high affinity (Basselin, et al., 2002). Mitochondrion is an important target of pentamidine and it is involved in

binding and disintegration of kinetoplast DNA (Basselin, et al., 2002, Croft and Coombs, 2003, Croft, et al., 2006). Topoisomerases are enzymes involved in modulating nuclear and kinetoplast DNA (kDNA) topology (Cheesman, 2000, Das, et al., 2001) and pentamidine may act as an inhibitor of topoisomerase I (Jean-Moreno, et al., 2006). Alterations in the sequence of kDNA minicircles was observed especially in AT-rich regions, known as binding sites of the drug in pentamidine resistant parasites (Basselin, et al., 1998). In wild-type *L. mexicana* and *L. donovani*, pentamidine is accumulated in the mitochondrion, while in pentamidine resistant parasites the drug remains free in the cytosol (Basselin, et al., 2002, Mukherjee, et al., 2006). Reduction of mitochondrial dehydrogenases and F₁F₀ ATPase activities could cause a collapse in mitochondrial membrane potential responsible for pentamidine resistance in these parasites (Basselin, et al., 2002, Mukherjee, et al., 2006).

The ABC proteins are the largest family of transmembrane proteins and are found in all living organisms (Higgins, 1992). They have two transmembrane domains and two conserved nucleotide binding domains with three characteristic motifs: the Walker motifs A and B and the signature of the ABC transporters or C motif just upstream of the Walker B site which distinguish members of the ABC family (Higgins, 1992). In *Leishmania*, eight different subfamilies of these highly conserved proteins are present (ABCA to ABCG) (Leprohon, et al., 2006) and several of them have already been characterized in *Leishmania* species. We have previously described the ABC transporter PRP1 of *Leishmania major* termed recently as ABCC7 (Leprohon, et al., 2006), involved in pentamidine resistance and cross-resistance to trivalent antimonials in promastigotes forms (Coelho, et al., 2003). PRP1 is located intracellularly in promastigotes and amastigotes and it is associated with the tubulovesicular element responsible in part for the exocytic and endocytic pathways (Coelho, et al., 2006, Ghedin, et al., 2001, Mullin, et al., 2001) (in press). Considering this localization, pentamidine would be exocytosed by the cell throughout the flagellar pocket (Coelho, et al., 2006).

It would be interesting to evaluate if overexpression of PRP1 (ABCC7) is also seen in lines isolated from mammalian host. However, pentamidine is not widely used as an antileishmanial drug, hindering the development of resistance species *in vivo*. Aiming at the closest possible lines obtained *in vitro*, we used pentamidine to generate *L. amazonensis* promastigotes exhibiting a

drug resistance phenotype at two levels of chemoresistance. Parasites were analyzed at molecular level considering that the ABC transporter PRP1 could be a possible candidate to confer pentamidine resistance. Other characteristics of these mutants related to pentamidine resistance were also analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Drugs, strain and culture conditions. Pentamidine isethionate, verapamil and potassium antimonyl tartrate trihydrate, a trivalent antimonial [Sb(III)] were supplied by Sigma. Promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), a kindly gift of Prof. J. J. Shaw were cultured in M199 medium supplemented as described (Kapler, et al., 1990). Wild-type promastigotes of *L. amazonensis* were adapted to survive in medium containing increasing concentrations of pentamidine, starting at the value corresponding to the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of wild-type parasites. The cultures were stabilized for 5 subcultures before increasing pentamidine level. Mutant PEN^r 5 was selected for pentamidine resistance until it was resistant to 5 µg/ml.

Resistance to the drugs were determined by measuring the IC₅₀ and the fold resistance (IC₅₀ ratio between resistant and wild-type cells) as previously described (Coelho, et al., 2003). For reversal of drug resistance, non toxic concentration of verapamil was used incubating parasites with different concentrations of pentamidine for 72 h. The inhibitory effect on growth was measured as described above.

DNA isolation, Pulse-Field Gel Electrophoresis, Field Inversion Gel Electrophoresis, and Southern blot analysis. Genomic DNA was purified according to the protocol previously described (Medina-Acosta and Cross, 1993). Circular DNA was isolated by Promega Wizard miniprep kit following manufacturer's instructions. Genomic DNA was digested and submitted to electrophoresis in 0.8% agarose gel. DNA was transferred to nylon membrane and then submitted to cross-link in a UV cross-linker (Bio-Rad). The blots were hybridized with denatured [α -³²P]dCTP-

labelled DNA probe using the kit Rediprime II DNA Labelling System (Amershan Pharmacia Biotech). Southern blot analysis was done as previously described (Sambrook, et al., 1989).

For Pulse Field Gel, agarose blocks containing *Leishmania* cells were prepared as described (Grondin, et al., 1993). After washing, the cells were resuspended in PBS at 1×10^8 cells/ml and mixed with low melting agarose (1%). Parasites were lysed in the presence of 0.5 M EDTA (pH 9.5), 1% sodium lauryl sarcosyl and 1 mg/ml proteinase K. Chromosomes were analyzed by a Bio-Rad (Hercules, California, United States) contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) mapper for separating 0.2-2.0 Mbp DNA over a period of 16 h at a constant temperature of 14°C in a 1% agarose gel in 0.5x TBE running buffer (45 mM Tris-borate, 1mM EDTA). Chromosomes were revealed by bromide ethidium staining. *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes were used as size markers (Bio-Rad).

For field inversion gel electrophoresis (FIGE), chromosomes were prepared as described above and the molecular size standards 8-48 kb ladder (Bio-Rad) and Lambda DNA - *HindIII* digested (Invitrogen) were loaded onto a 1% agarose gel in 0.5 x TBE. Gel electrophoresis was performed in FIGE Mapper Electrophoresis System (Bio-Rad) at room temperature using a 0.1–0.8 s linear shape switch time ramp with 180 V forward voltage and 120 V reverse voltage over a period of 11 h. The gel was stained with 0.5 µg/ml ethidium bromide, photographed and transferred onto nylon filter.

RNA isolation and Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR). Total RNA was isolated from *L. amazonensis* promastigotes in the mid-log phase of growth using RNeasy kit (QIAGEN). The RNAs were treated with RNase-free DNase I (Ambion) to remove any genomic DNA contamination and then analyzed by using RNA 6000 Nano assay chips on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

For Real-time RT-PCR, we first synthesized cDNA from 50 ng of total RNA using Superscript II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen) and Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using SYBR Green Supermix (Bio-Rad) for detection in a Rotor Gene-3000 (Corbett Research) as previously described (Gagnon, et al., 2006). The primers used for *PRP1* gene were designed using the GeneRunner software

(forward 5'-CGGCAGCTCAGCTACCTTTC and reverse 5'-CACAGTGTCCAGTGCAAACATG). The relative amount of PCR products generated from each primer set was determined based on the threshold cycle (C_T) value and amplification efficiencies and was normalized by dividing the values by the relative amount of the *GAPDH* gene used as control using the following primers (forward 5'-GAAGTACACGGTGGAGGCTG and reverse 5'-CGCTGATCACGACCTTCTTC).

RESULTS

Characterization of pentamidine resistant mutants. Two cloned lines of *L. amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine (PEN^r) were used throughout this study. One resistant line, PEN^r 0.5 was maintained in 0.5 µg/ml of pentamidine without increasing drug concentration for more than 6 months. The other line, PEN^r 5 was selected by increasing drug pressure up to 5 µg/ml. PEN^r 0.5 and PEN^r 5 promastigotes showed 9- and 22-fold resistance to pentamidine respectively when compared to wild-type parasites (Table 1; Fig. 1A). Resistant promastigotes were checked for cross-resistance to potassium antimonyl tartrate trihydrate [Sb(III)] and verapamil but no cross-resistance was observed (Table 1). Actually, we observed in PEN^r 5 a decrease in verapamil susceptibility considering the IC₅₀ for *L. amazonensis* wild-type higher than for mutant PEN^r 5 (Table 1). Interestingly, even the mutant PEN^r 0.5 maintained in low levels of pentamidine, 0.5 µg/ml, considering 0.37 ± 0.06 µg/ml for wild-type parasite were highly resistant to pentamidine in almost 10 fold (Table 1). On the other hand, for *L. amazonensis* transfected with the plasmid pSNBR/8kb *Sma*I-A that contains the *PRP1* gene, parasites are resistant to pentamidine in almost 7 fold and cross-resistant to potassium antimonyl tartrate trihydrate (data not shown) as observed in *L. major* (Coelho, et al., 2003).

Growing rates in log phase of PEN^r 0.5 was 6.4 hours, a doubling time close for wild-type parasites (6.0 h), while for PEN^r 5 an approximately 3 fold increasing in doubling time was observed (16.0 h) (Fig. 1B). In this mutant, we also observed a lower density of parasites in stationary phase but no difference was detected between PEN^r 0.5 and wild-type parasites (Fig. 1B). In *L. mexicana* amastigotes, it has previously been shown that low level of pentamidine

resistance is rapidly lost once the drug selection is removed while high level of resistance is stable (Sereno and Lemesre, 1997). Pentamidine resistance of parasites PEN^r 0.5 and PEN^r 5 were stable after 2 or 6 months without pressure although the IC_{50} of the mutants had declined (data not shown). After 6 months without pentamidine, PEN^r 5 mutants had a doubling time of 7.5 h, a similar value for that one observed in wild-type parasites (6.0 h) (Fig. 1B).

Verapamil, a calcium channel blocker known to reverse multidrug resistance in mammalian cells and *Plasmodium falciparum* (Bitonti, et al., 1988, Gottesman and Pastan, 1993, Safa, et al., 1987), was described as a classical inhibitor of ABC transporters associated to efflux activity in *Leishmania* (Essodaigui, et al., 1999). In *L. mexicana* resistant pentamidine mutants, verapamil may reverse pentamidine resistance (Basselin, et al., 2002). Using non toxic concentrations of verapamil (20 μ M), a reversion of pentamidine resistance was observed when compared with parasites not treated with verapamil. The IC_{50} for the parasites containing pentamidine plus verapamil were 0.41 ± 0.06 for PEN^r 5 and 1.54 ± 0.11 for PEN^r 0.5. A significant effect was observed in PEN^r 5 mutants whose IC_{50} was close to the wild-type (Table 1) while in PEN^r 0.5 the reduction was not so effective like in PEN^r 5 mutants.

Molecular characterization of *L. amazonensis* mutants resistant to pentamidine. Gene amplification has been frequently observed in *Leishmania* promastigotes mainly when the resistance is induced *in vitro* (Beverley, 1991, Borst and Ouellette, 1995, Segovia, 1994). However, in a stepwise selected pentamidine resistant line of *L. major* (PT-R20), no amplification was observed (Ellenberger and Beverley, 1989). To test whether amplifications are present in PEN^r 0.5 and PEN^r 5 mutants, we compare the molecular karyotype of the mutants and wild type parasites. After separation of chromosomes by PFGE, no amplification was observed in this analysis (Fig. 2A). In the FIGE analysis, only the circular amplicon corresponding to the plasmid pSNBR/8kb *Sma*I-A, containing the *PRP1* gene of *L. major* (Coelho, et al., 2003), was observed in *L. amazonensis* transfectants, while no other amplicon was observed in the mutants (Fig. 2B). To check the presence of circular DNAs in resistant parasites, a standard plasmid alkaline lysis preparation and analysis in agarose gel was done. Circular DNA molecules were observed only in our control parasites transfected with the plasmid pSP1.2 LUC α HYG α (Roy, et al., 2000) (data not

shown). We also looked for the presence of any restriction fragment amplified in the resistant lines through digestion of total DNA with different enzymes and then checking intensity pattern of bands. Both, pentamidine resistant mutants and *L. amazonensis* wild-type parasites displayed the same intensity of bands (data not shown).

Since the ABC transporter PRP1 overexpression is involved in pentamidine resistance in transfectants of *L. major* (Coelho, et al., 2003) we checked whether PRP1 overexpression is related to pentamidine resistance in our pentamidine resistant mutants. Southern blot analysis using a specific probe of *L. major* PRP1 gene indicated no amplification of PRP1 gene in the PEN^r 0.5 and PEN^r 5 lines (Fig. 2C and 2D). These data indicated that DNA amplification of genes, including PRP1 is not significant for parasites become resistant to pentamidine in *L. amazonensis*.

Overexpression of genes not associated to gene amplification were already described in *Leishmania* mutants to SbIII and methotrexate (Guimond, et al., 2003, Marquis, et al., 2005). Other interesting data showed that some ABC transporters expression is modulated during the life cycle of *Leishmania* parasites, but no alteration was observed for PRP1 (ABCC7) expression (Leprohon, et al., 2006). Analysis of ABC transporters transcripts by Northern blot in wild-type parasites of *Leishmania* is difficult to detect because of the low levels of expression (Araujo-Santos, et al., 2005, Coelho, et al., 2006, Henderson, et al., 1992, Papadopoulou, et al., 1994, Parodi-Talice, et al., 2003). To check PRP1 expression, we carried out a RT-PCR from resistant and wild-type promastigotes and we detected PRP1 transcripts in the three lines tested (data not shown). Real-time RT-PCR assay of PRP1 gene using total RNA showed no alteration in PRP1 transcripts levels between resistant and wild-type parasites (Fig. 3). Finally, we can exclude the involvement by amplification and/or overexpression of the ABC transporter PRP1 in mediate resistance to pentamidine in the drug resistant parasites PEN^r 0.5 and PEN^r 5.

DISCUSSION

Differently from the Sb(V), pentamidine is a second line drug used in anti-*Leishmania* chemotherapy. Promastigotes lines of *L. amazonensis* resistant to pentamidine were selected by

stepwise increases in drug pressure, as shown with other drugs in *Leishmania* (Arana, et al., 1998, Haimeur and Ouellette, 1998, Mbongo, et al., 1998, Singh, et al., 2001) and even with other *Leishmania* species in presence of pentamidine for promastigotes forms (Basselin, et al., 2002, Basselin, et al., 1997, Mukherjee, et al., 2006) and amastigotes (Sereno and Lemesre, 1997). The resistant lines PEN^r 0.5 and PEN^r 5 selected for pentamidine resistance showed 9- and 20-fold higher IC₅₀ values for pentamidine than wild-type parasites. No cross-resistance was observed for potassium antimonyl tartrate trihydrate and verapamil in both mutants, although a cross-resistance to other diamidines as propamidine, stilbamidine and berenil may occur as observed for pentamidine resistant mutants of *L. mexicana* and *L. donovani* (Basselin, et al., 2002, Mukherjee, et al., 2006). Interestingly, PEN^r 0.5 mutants even maintained in low levels of pentamidine were highly resistant to pentamidine (Table 1), and their phenotype was stable after 6 months without drug pressure. Several mutants resistant to pentamidine in *Leishmania* have been described, but none of them were submitted to an intense molecular analysis (Basselin, et al., 2002, Basselin, et al., 1997, Mukherjee, et al., 2006). Considering the role of the ABC transporter PRP1 in pentamidine resistance in *Leishmania* promastigotes and amastigotes (Coelho, et al., 2003) (in press), we checked if pentamidine resistance in *L. amazonensis* mutants is associated to this ABC transporter through mechanisms like gene amplification and overexpression. *Leishmania* species are able to amplify certain parts of their genome in response to stress such as drug resistance (Beverley, 1991, Borst and Ouellette, 1995, Segovia, 1994). Our analyses indicated no *PRP1* gene amplification and even no other extrachromosomal circles or linear elements in the pentamidine resistant lines (Fig. 2). In mutants resistant to pentamidine of *L. major* no amplification was detected (Ellenberger and Beverley, 1989), the same data we observed in this work. Real time RT-PCR of *PRP1* transcripts indicated no significant alteration in *PRP1* transcripts when we compared total RNA of wild-type and resistant parasites (Fig. 3). No alteration in transcript levels of *PRP1* was also observed between promastigotes and amastigotes in *Leishmania* (Leprohon, et al., 2006) and in sensitive and resistant parasites to pentavalent antimonials (Decuypere, et al., 2005). These data show that expression of *PRP1* gene is not modulated during life cycle of the parasites and between resistant and sensitive parasites to drugs as demonstrated here.

The absence of any DNA amplification and the stability of the resistant phenotype for at least 6 months in the absence of drug pressure suggest that stable mutations in one or more genes may be responsible for pentamidine resistance. Mutations in *PRP1* gene could increase the activity of this ABC transporter conferring pentamidine resistance. Sequencing of *PRP1* gene may indicate whether this ABC transporter is involved in pentamidine resistant mutants of *Leishmania*.

Alterations in the sequence of kDNA minicircles was observed especially in AT-rich regions, known as binding sites of the drug in pentamidine resistant parasites (Basselin, et al., 1998). In *L. mexicana* and *L. donovani* pentamidine resistant parasites, the drug is not accumulated in the mitochondrion, like in wild-type parasites. In pentamidine resistant parasites the drug remains free in the cytosol (Basselin, et al., 2002, Mukherjee, et al., 2006). Similarly, in resistant parasites of *L. amazonensis* studied here, the same phenotype may be present as a possible mechanism. Pentamidine accumulated in the cytosol would be removed throughout an ABC transporter and the agents verapamil, trifluoperazine and prochlorperazine may lead pentamidine to accumulate in the cytosol to levels which drive accumulation in the mitochondrion (Basselin, et al., 2002). In *Leishmania*, verapamil was already described as a classical inhibitor of ABC transporters associated to efflux activity (Essodaigui, et al., 1999). Here, we observed the same phenotype, since when we treated resistant parasites with non toxic concentration of verapamil a reversion of drug resistance was observed in both resistant parasites. A better effect was observed with PEN^r 5, the highest resistant mutant. A none described ABC transporter could remove pentamidine from cell, PRP1 may not be involved except by gene mutation(s) as we discuss above. In the *L. major* genome 42 members of ABC transporters family was described, and 8 members are present in ABCC subfamily which PRP1 is one of members (Leprohon, et al., 2006).

It should be considered that other studies are necessary like DNA microarrays which have been demonstrated as an important tool to identification of genes associated to drug resistance and maybe any of these ABC transporters may be involved to pentamidine efflux in *Leishmania* resistant mutants (Basselin, et al., 2002). Interestingly, this efflux activity was not observed in *L. donovani* resistant to pentamidine when treated with ABC transporters inhibitors prochlorperazine and trifluoperazine (Mukherjee, et al., 2006). Differences at molecular level between *Leishmania* species may affect the activity of these ABC transporters in the drug efflux.

Acknowledgements – We thank Prof. Marc Ouellette for helpful discussions and suggestions. This work was supported by CNPq (473121-2), FAPESP (06/04656-4), LIM-48 and by fellowships from CNPq (LGG, JFS and PCC) and CAPES (ACC).

REFERENCES

1. Arana, F. E., Perez-Victoria, J. M., Repetto, Y., Morello, A., Castanys, S., and Gamarro, F., 1998. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* 56, 1201-1208.
2. Araujo-Santos, J. M., Parodi-Talice, A., Castanys, S., and Gamarro, F., 2005. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 349-355.
3. Basselin, M., Badet-Denisot, M. A., and Robert-Gero, M., 1998. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop* 70, 43-61.
4. Basselin, M., Denise, H., Coombs, G. H., and Barrett, M. P., 2002. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3731-3738.
5. Basselin, M., Lawrence, F., and Robert-Gero, M., 1997. Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. *Parasitol Res* 83, 413-418.
6. Beverley, S. M., 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 45, 417-444.
7. Bitonti, A. J., Sjoerdsma, A., McCann, P. P., Kyle, D. E., Oduola, A. M., Rossan, R. N., Milhous, W. K., and Davidson, D. E., Jr., 1988. Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science* 242, 1301-1303.
8. Borst, P., and Ouellette, M., 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 49, 427-460.
9. Cheesman, S. J., 2000. The topoisomerases of protozoan parasites. *Parasitol Today* 16, 277-281.
10. Coelho, A. C., Beverley, S. M., and Cotrim, P. C., 2003. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 130, 83-90.
11. Coelho, A. C., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Bastos, S. F., Mortara, R. A., and Cotrim, P. C., 2006. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 150, 378-383.
12. Croft, S. L., and Coombs, G. H., 2003. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19, 502-508.
13. Croft, S. L., Sundar, S., and Fairlamb, A. H., 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19, 111-126.
14. Das, A., Dasgupta, A., Sharma, S., Ghosh, M., Sengupta, T., Bandopadhyay, S., and Majumder, H. K., 2001. Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. *Nucleic Acids Res* 29, 1844-1851.
15. Decuypere, S., Rijal, S., Yardley, V., De Doncker, S., Laurent, T., Khanal, B., Chappuis, F., and Dujardin, J. C., 2005. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 4616-4621.
16. Ellenberger, T. E., and Beverley, S. M., 1989. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 264, 15094-15103.
17. Essodaigui, M., Frezard, F., Moreira, E. S., Dagger, F., and Garnier-Suillerot, A., 1999. Energy-dependent efflux from *Leishmania* promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. *Mol Biochem Parasitol* 100, 73-84.
18. Gagnon, D., Foucher, A., Girard, I., and Ouellette, M., 2006. Stage specific gene expression and cellular localization of two isoforms of the serine hydroxymethyltransferase in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 150, 63-71.
19. Ghedin, E., Debrabant, A., Engel, J. C., and Dwyer, D. M., 2001. Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. *Traffic* 2, 175-188.

20. Gottesman, M. M., and Pastan, I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427.
21. Grondin, K., Papadopolou, B., and Ouellette, M., 1993. Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 21, 1895-1901.
22. Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., and Bryceson, A. D., 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2, 494-501.
23. Guimond, C., Trudel, N., Brochu, C., Marquis, N., El Fadili, A., Peytavi, R., Briand, G., Richard, D., Messier, N., Papadopolou, B., Corbeil, J., Bergeron, M. G., Legare, D., and Ouellette, M., 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 31, 5886-5896.
24. Haimeur, A., and Ouellette, M., 1998. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1689-1694.
25. Henderson, D. M., Sifri, C. D., Rodgers, M., Wirth, D. F., Hendrickson, N., and Ullman, B., 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 12, 2855-2865.
26. Herwaldt, B. L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
27. Higgins, C. F., 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113.
28. Jean-Moreno, V., Rojas, R., Goyeneche, D., Coombs, G. H., and Walker, J., 2006. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Exp Parasitol* 112, 21-30.
29. Kapler, G. M., Coburn, C. M., and Beverley, S. M., 1990. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* 10, 1084-1094.
30. Leprohon, P., Legare, D., Girard, I., Papadopolou, B., and Ouellette, M., 2006. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* 5, 1713-1725.
31. Marquis, N., Gourbal, B., Rosen, B. P., Mukhopadhyay, R., and Ouellette, M., 2005. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 57, 1690-1699.
32. Mbongo, N., Loiseau, P. M., Billion, M. A., and Robert-Gero, M., 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 352-357.
33. Medina-Acosta, E., and Cross, G. A., 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol* 59, 327-329.
34. Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Sahani, M. H., Barrett, M. P., and Madhubala, R., 2006. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 145, 1-10.
35. Mullin, K. A., Foth, B. J., Ilgoutz, S. C., Callaghan, J. M., Zawadzki, J. L., McFadden, G. I., and McConville, M. J., 2001. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell* 12, 2364-2377.
36. Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., and Saravia, N. G., 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
37. Papadopolou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B. P., and Ouellette, M., 1994. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltpgpA* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* 269, 11980-11986.
38. Parodi-Talice, A., Araujo, J. M., Torres, C., Perez-Victoria, J. M., Gamarro, F., and Castanys, S., 2003. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1612, 195-207.
39. Roy, G., Dumas, C., Sereno, D., Wu, Y., Singh, A. K., Tremblay, M. J., Ouellette, M., Olivier, M., and Papadopolou, B., 2000. Episomal and stable expression of the luciferase

reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. Mol Biochem Parasitol 110, 195-206.

40. Safa, A. R., Glover, C. J., Sewell, J. L., Meyers, M. B., Biedler, J. L., and Felsted, R. L., 1987. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. J Biol Chem 262, 7884-7888.
41. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
42. Segovia, M., 1994. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. Ann Trop Med Parasitol 88, 123-130.
43. Sereno, D., and Lemesre, J. L., 1997. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. Antimicrob Agents Chemother 41, 1898-1903.
44. Singh, A. K., Papadopoulou, B., and Ouellette, M., 2001. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. Exp Parasitol 99, 141-147.

Table 1. Resistance to pentamidine and cross-resistance to verapamil and potassium antimonyl tartrate trihydrate (PATH) of *L. amazonensis* wild-type (La WT) and the drug resistant clones PEN^r 0.5 and PEN^r 5.

Drug	Mean $\pm$ SD IC ₅₀			Fold resistance	
	La WT	PEN ^r 0.5	PEN ^r 5	PEN ^r 0.5	PEN ^r 5
Pentamidine	0.37 $\pm$ 0.06	3.3 $\pm$ 1.25	8.2 $\pm$ 0.7	9	22
PATH	58.1 $\pm$ 15.7	73 $\pm$ 12.4	67.6 $\pm$ 16.1	1.3	1.2
Verapamil	58 $\pm$ 4.4	57 $\pm$ 11.04	42.4 $\pm$ 3.1	0.98	0.73

The mean $\pm$ S.D. of 3 independent experiments done in duplicate are given.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Characterization of pentamidine resistant mutants. (A) Growth curve of wild-type and mutant resistant parasites in presence of pentamidine. (B) Growth *in vitro* of promastigotes. Parasites were inoculated at 2×10^5 /ml and densities were measured. The mean of three independent experiments were done. Legend: (○) *L. amazonensis* (wild-type); (◆) PEN^r 0.5; (▲) PEN^r 5; (▼) PEN^r 5 without drug pressure after 6 months.

Figure 2. Analysis of DNA amplification and extrachromosomal elements in *L. amazonensis* wild-type and mutants PEN^r 0.5 and PEN^r 5. (A) Comparison of the molecular karyotype of wild type and mutants lines. Chromosomal bands were separated by CHEF electrophoresis and stained with ethidium bromide; (B and C) Identification of circular amplicons in the mutant lines by FIGE. Total DNA was separated by FIGE, stained with ethidium bromide (B), transferred onto nylon membranes and hybridized with a PRP1 gene probe (an 1.2 kb *PvuII* fragment encoding the 2nd transmembrane domain of PRP1 of *L. major*) (C); (D) Southern blot analysis of *PRP1* gene amplification. DNA of parasites were digested with *PstI* and hybridized with the same probe described above. This filter was rehybridized with the tubulin probe. Lanes: 1 – *L. amazonensis* (wild-type); 2 - PEN^r 0.5; 3 - PEN^r 5; 4 - *L. amazonensis* transfected with pSNBR/8kb *SmaI*-A. c – compression zone. The size markers are indicated on the left.

Figure 3. Relative gene expression levels of *PRP1* gene. Real time RT-PCR analysis of *PRP1* in *L. amazonensis* (wild-type) and resistant parasites PEN^r 0.5 and PEN^r 5. *PRP1* RNA expression ratios of pentamidine resistant mutants relative to the wild-type parasites. The mean of three independent experiments performed from three different RNA preparations were done.

Figure 1

A

B

Figure 2

Figure 3