RAFAEL GOMES AQUINO DE ARAÚJO

**TRANSPORTADOR ABC E RESISTÊNCIA A
BENZNIDAZOL EM *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

RAFAEL GOMES AQUINO DE ARAÚJO

Transportador ABC e resistência a benznidazol em
Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Pátogeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Parasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales

Versão original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Araújo, Rafael Gomes Aquino de.

Transportador ABC e resistência a benznidazol em *Trypanosoma cruzi* / Rafael Gomes Aquino de Araújo. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Bianca Silvana Zingales.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*.

Versão do título para o inglês: ABC transporter and benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*.

Descritores: 1. *Trypanosoma cruzi* 2. Benznidazol 3. Transportador ABC 4. Transfecção 5. Resistência a drogas 6. Cepas I. Zingales, Bianca Silvana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0159/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Gomes Aquino de Araújo.

Título da Dissertação: Transportador ABC e resistência a benznidazol em *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Bianca Silvana Zingales.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:

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

Of.CEPSH.140.09
PMAZ/mcgn

São Paulo, 18 de junho de 2008.

Prezado Senhor,

A comissão em sessão de 16.06.09 analisou o pedido de isenção para o Projeto: "*Transportador ABC e resistência a benznidazol em trypanosoma cruzi*", deliberou em solicitar autorização do responsável para o uso das amostras e o cadastro da teca junto a esta comissão. Modelo constante no site: icb.usp.br/ética em pesquisa com seres humanos.

Contando com a sua atenção e providências, despeço-me.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO A. M. ZANOTTO
Vice Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
RAFAEL GOMES AQUINO DE ARAÚJO
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Aos meus pais principalmente e atenciosamente, com afeto, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença, apoio incansável e amor incondicional ao longo do período de elaboração deste trabalho e desde o dia em que cheguei a este mundo.

AGRADECIMENTOS

Mais um ciclo de minha vida se completa com a finalização deste trabalho. Recomeça-se um novo caminho a ser traçado com expectativa e entusiasmo, agora sob uma perspectiva mais madura, consciente e otimista em relação ao futuro, que acena como um novo raio de sol brilhante no horizonte de possibilidades.

Agradeço a Deus, pela oportunidade de viver com saúde, paz e alegria.

Meu anjo da guarda, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, nos melhores e naqueles mais difíceis também.

Profa. Bianca Zingales, pelas oportunidades de estudo e aprendizagem concedidas, pela confiança em meu trabalho, pela revisão cuidadosa de relatórios, apresentações e desta tese, por me ensinar a buscar o conhecimento profundo sobre a Biologia Molecular, auxiliando-me a raciocinar, planejar metodologias, analisar dados e escrever como um cientista, por estimular minha proatividade e autonomia intelectual e, particularmente, por inspirar-me a ser um profissional com excelência acadêmica.

Meus grandes amigos: Jany Pereira, Maína Machado, Carol Machado, Ana Luiza Cecconi, Marc Halsberghe, Elcio Fernandes e Guilherme Carmelo, pelo companheirismo durante todos estes anos, especialmente no período em que estive na USP, pela ajuda nos momentos difíceis, pelas discussões acadêmicas (ou não), pelas conversas maravilhosas, pelos conselhos amigos, pelas horas de amor fraternal divididas, pelo ombro nas horas tristes, pelas dificuldades superadas, pela proximidade afetuosa e pela amizade verdadeira.

Susan Ienne, pelo trabalho em equipe, colaboração, exemplo de organização e incentivo profissional, pelos ensinamentos e pelas conversas íntimas, pelo caráter e integridade moral, pela amizade que começou no laboratório e tenho certeza de que durará para sempre.

Marcelo Nunes, por ser um profissional solícito e prestativo, constantemente disposto a colaborar, além de ser um amigo e companheiros de todos, sempre com um sorriso no rosto. Jaques Franco, pelo esforço, dedicação e bom humor costumeiros. Simone Fernandes e Vanessa Vidotto, pelo alto astral, convivência e amizade. Solange Lessa, pelas conversas e

conselhos sobre os mais diversos assuntos, especialmente os profissionais e espiritualistas. Eva Souza, pelo exemplo de dedicação e perseverança, mesmo diante das situações mais difíceis na vida. Obrigado a todos pela força!

Prof. Carlos Renato Machado, pela colaboração neste trabalho, pela acolhida em Belo Horizonte, por toda a atenção, cuidado e orientação nas semanas em que passei pela UFMG. Pedro Aguiar, pelo acompanhamento dedicado e fraterno em meus experimentos no Laboratório de Genética Bioquímica. João Pedro da Rocha, Matheus Rajão, Carolina Furtado, Selma Santos e a todos os queridos alunos do LGB, que me trataram com tanto carinho e receptividade, meus sinceros agradecimentos.

Denis Jacob, por me apresentar o mundo fantástico da Filogenia e me indicar excelentes ferramentas, materiais e dicas para meus trabalhos e análises, e por continuar a amizade até o final do mestrado. Todos os meus colegas da Biologia, Bioquímica, Educação e Biomédicas, com quem tive momentos de alegria e com quem muito aprendi durante as disciplinas e excelentes cursos dos quais tive a honra de participar.

Prof. Paulo Cotrim, pelo material fornecido e pelas instruções sobre os testes *in vitro*. Profa. Silvia Uliana e prof. Alejandro Katzin, pelas ótimas discussões sobre o projeto e proveitosos conselhos para o melhor aproveitamento em meus últimos meses de mestrado.

Pessoal dos laboratórios dos professores Hugo Armelin e Fábio Forte, sempre atenciosos e dispostos a ajudar nos momentos em que precisei, além dos laboratórios dos professores Alexander Henning, Ohara Augusto, Carla Columbano e alguns outros, pela ajuda em diversas ocasiões. Luci Navarro, por seu profissionalismo, competência, simpatia e solicitude durante todo o curso do mestrado, sempre no auxílio rápido e eficiente com os sequenciamentos.

Profa. Mari Cleide Sogayar, Marluce Montovani, Ana Cláudia Carreira e todos que me auxiliaram nos experimentos de eletroporação e no uso do microscópio de fluorescência. Meu amigo querido Rômulo Carvalho, pela inspiração como biomédico, pela cativante amizade, pelas conversas agradáveis, pelo carinho ímpar e por todos os incríveis passeios em que me levou na cidade de São Paulo.

Professores Jeffrey Shaw e Myriam Krasilchik, dois de meus honrados e maravilhosos professores de pós-graduação, com os quais muito aprendi e os quais tanto admiro. Pelo exemplo de carisma, didática, ética e por me mostrarem como um verdadeiro professor deve ser: dedicado e amigo, fazendo seu melhor trabalho como educador e formador de alunos profundos e preparados para a vida.

Profa. Margareth Capurro, André Costa da Silva e Bianca Burini, pela paciência, dedicação e acompanhamento em meu primeiro contato com um laboratório científico da USP, e por terem me indicado o bem sucedido mestrado com a profa. Bianca Zingales.

Meus cativantes amigos e colegas do grupo de teatro na USP, especialmente Bia Svat, Lu Pasquarelli, Thomas Fessel, Gustavo Ribeiro, Elisa Estroniolli, Stephanie Brum, Gabriel Mormilho, Deborah Ferraz, Dionísio Gutierrez e meus “filhos” Pedro Pereira e Yasmine Pereira, com os quais aprendi a ser mais humano, a me doar de corpo e alma pela arte, a olhar verdadeiramente nos olhos de pessoas queridas, a revelar o Charles Chaplin que existe dentro de mim, a descobrir que teatro é vida condensada, a me entregar aos palcos da vida.

Grupo Seven da USP, por meio do qual conheci pessoas tão queridas e divertidas, como Cesar Augusto Mayor, Jeferson Hugo Rezende e Marcelo Valpeteris, e todos aqueles que de alguma maneira estiveram ao meu lado e torceram por mim.

Renato Nunes, meu querido amigo, que viajou ao Plano Astral no final do último mês de julho, e a quem continuarei espiritualmente ligado pelos laços sinceros de amizade por toda a eternidade. Obrigado por sempre me dizer palavras de carinho, de incentivo, de apoio, de ternura, de amor fraterno. Amo-te verdadeiramente, amigo!

Meus amigos e familiares de Goiânia, que mesmo distantes fisicamente, conseguiram me dar forças durante o caminho.

CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

“O ignorante afirma, o sábio duvida, o sensato reflete.”

Aristóteles

RESUMO

Araújo RGA. Transportador ABC e resistência a benznidazol em *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Apenas Benznidazol (BZ) e Nifurtimox (NFX) estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Ensaios clínicos indicam haver diferenças regionais na eficácia do tratamento, atribuídas, em parte, a diferenças na suscetibilidade de cepas de *T. cruzi* as duas drogas. Vários transportadores ABC (*ATP binding cassette*) desempenham um papel importante na resistência a drogas. Evidências obtidas por nosso grupo indicam que um transportador ABC de *T. cruzi*, o *TcABCG1*, é superexpresso em cepas resistentes a BZ. Desta forma, o objetivo geral de nosso projeto foi obter evidências adicionais para o envolvimento de *TcABCG1* no fenótipo de resistência a BZ. Os objetivos específicos do estudo foram: (i) verificar a ação de inibidores de transportadores ABC na resistência a BZ; (ii) verificar se a superexpressão do gene *TcABCG1* altera a suscetibilidade a BZ de uma cepa sensível; (iii) determinar o número de cópias do gene *TcABCG1* em algumas cepas de *T. cruzi*; (iv) caracterizar os genes de transportadores ABC presentes no genoma da cepa CL Brener. Após determinação da CI_{50} para BZ de seis cepas e sua classificação em suscetíveis (S) e resistentes (R), o efeito de três inibidores de transportadores ABC de eucariotos foi investigado. Concluímos que apenas verapamil aumentou a suscetibilidade a BZ das cepas. O gene *TcABCG1* das cepas Berenice 62 (S), VL10 (R); Silvio (R) e YuYu (R) foi clonado e sequenciado. Transfectamos em CL Brener (S) os genes *TcABCG1* das cepas VL10, Silvio e YuYu, consideradas resistentes a BZ. Os genes foram clonados no vetor pROCKNeo. Nas culturas transfectadas com os genes de Silvio e YuYu, verificamos aumento da resistência a BZ de 26 e 32%, respectivamente. Nas culturas transfectadas com os genes de VL10 e CL Brener, o incremento da resistência foi da ordem de 10%. Nas culturas transfectadas houve também aumento da resistência a NFX. A abundância relativa dos transcritos do gene *TcABCG1* foi determinada por RT-PCR em tempo real. Nas culturas transfectadas com o gene ABC de CL Brener, Silvio e YuYu houve aumento da abundância relativa de transcritos de *TcABCG1* de 2,70, 2,85 e 2,67 vezes, respectivamente. Nas culturas transfectadas com o gene de VL10 e com o vetor vazio a abundância relativa dos transcritos foi de 1,12 e 0,80 vezes, respectivamente. Não encontramos diferenças no número de cópias do gene *TcABCG1* em cepas naturalmente sensíveis e resistentes a BZ. As evidências obtidas apoiam a hipótese de que o transportador

TcABCG1 seja um dos elementos envolvidos no fenótipo de resistência a BZ (e NFX) em *T. cruzi*. Utilizando ferramentas de bioinformática, identificamos 58 transportadores ABC hipotéticos no genoma de CL Brener, 36 dos quais possuem um alelo anotado. Estes genes distribuem-se em 16 dos 41 cromossomos. Genes ABC ortólogos aos de *T. cruzi* foram identificados em tripanossomas africanos e *Leishmania* spp. Dados referentes a análises filogenéticas e classificação dos transportadores ABC de *T. cruzi* nas oito subfamílias (A-H) das proteínas ABC de eucariotos são apresentados.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Benznidazol. Transportador ABC. Transfecção. Resistência a drogas. Cepas.

ABSTRACT

Araújo RGA. ABC transporter and benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Benznidazole (BZ) and Nifurtimox (NFX) are the only available drugs for the treatment of Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Clinical trials indicate regional differences in the treatment outcome, attributed in part to differences in the drug susceptibility of *T. cruzi* strains. Several ABC (ATP binding cassette) transporters play an important role in drug resistance. Evidence obtained by our group indicates that a *T. cruzi* ABC transporter, *TcABCG1*, is overexpressed in BZ-resistant strains. Thus, the overall goal of our project was to obtain additional evidence for the involvement of *TcABCG1* in BZ resistance. The specific goals of the study were: (i) to verify the activity of ABC transporter inhibitors in BZ resistance; (ii) to assess whether the overexpression of the *TcABCG1* gene alters the susceptibility to BZ in a BZ-susceptible strain; (iii) to determine the number of *TcABCG1* gene copies in some *T. cruzi* strains; (iv) to characterize the ABC transporter genes in CL Brener genome. After determining the IC₅₀ to BZ in six strains and their classification into susceptible (S) and resistant (R), the effect of three inhibitors of eukaryotic ABC transporters was investigated. Only verapamil increased BZ susceptibility in all the strains. The *TcABCG1* gene of Berenice 62 (S), VL10 (R), Silvio (R) and YuYu (R) strains was cloned and sequenced. We transfected in CL Brener (S) *TcABCG1* genes of VL10, YuYu and Silvio strains, considered BZ-resistant. The genes were cloned into the pROCKNeo vector. In cultures transfected with Silvio and YuYu genes, an increased BZ resistance of 26 and 32%, respectively, was observed. In cultures transfected with the VL10 and CL Brener genes, the increase in drug resistance was approximately 10%. In the transfected cultures resistance to NFX was also increased. The relative *TcABCG1* transcript abundance was determined by real time RT-PCR. In cultures transfected with the CL Brener, Silvio and YuYu gene the increase of transcript abundance was 2.70-; 2.85; and 2.67-fold, respectively. In cultures transfected with the VL10 gene and with the empty vector the transcript abundance increased 1.12- and 0.80-fold, respectively. No differences in the *TcABCG1* gene copy number in naturally BZ-susceptible and resistant strains were observed. The evidence obtained in this study support the hypothesis that *TcABCG1* transporter is one of the elements involved in the BZ (and NFX) resistance phenotype. By using bioinformatics tools, we identified 58 hypothetical ABC transporters in CL Brener genome, 36 of which have an annotated allele. The genes are

distributed in 16 of the 41 chromosomes. ABC orthologous genes to those of *T. cruzi* were identified in African trypanosomes and *Leishmania* spp. Data regarding the phylogenetic analysis and classification of *T. cruzi* ABC transporters in eight subfamilies (A-H) of eukaryote ABC proteins are presented.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Benznidazole. ABC transporter. Transfection. Drug resistance. Strains.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	25
Figura 2 – Estrutura química das drogas atualmente disponíveis para o tratamento etiológico da doença de Chagas: Nifurtimox e Benznidazol.....	27
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura de proteínas ABC em parasitas protozoários.....	32
Figura 4 – Abundância relativa de transcritos do gene ABC de <i>T. cruzi</i> em cepas sensíveis e resistentes a BZ.	35
Figura 5 – Representação de um transportador ABC formado por dois meio-transportadores, que necessitam homodimerizar para formar uma proteína funcional.....	36
Figura 6 – Sequência nucleotídica completa do gene <i>TcABCG1</i>	57
Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene <i>TcABCG1</i> de CL Brener haplótipos Esmeraldo e Não Esmeraldo, Berenice 62, Silvio X10, VL10 e YuYu.....	58
Figura 8 – Mapa do vetor pROCKGFPNeo.....	59
Figura 9 – Southern Blot: DNA genômico de CL Brener WT e transfectado com pROCKNeo vazio e pROCKNeo com o <i>TcABCG1</i> de CL Brener e VL10, e da cepa Silvio WT, digerido com <i>Bam</i> HI e <i>Sal</i> I.....	63
Figura 10 – Digestão de DNA genômico com <i>Sac</i> II.....	64
Figura 11 – PCR em Tempo Real para estimar o número de cópias do gene <i>TcABCG1</i> a partir de massa conhecida de DNA de cinco cepas.....	67
Figura 12 – Representação esquemática dos 41 cromossomos de CL Brener e localização de famílias gênicas.....	71
Figura 13 – Localização celular putativa das proteínas ABC de <i>T. cruzi</i>	72
Figura 14 – Árvore de transportadores ABC de <i>T. cruzi</i> gerada pelo método <i>neighbor-joining</i>	73
Figura 15 – Subfamílias de transportadores ABC de <i>T. cruzi</i>	74
Figura 16 – Investimento cumulativo para obter-se uma nova droga.....	81
Figura A.1 – Estrutura secundária da proteína <i>TcABCG1</i> do haplótipo Não-Esmo de CL Brener.....	94

Figura A.2 – Southern Blotting de DNA genômico de seis cepas de *T. cruzi* digerido com *Hind*III e hibridizado com a sonda *TcABCG1* de 616 pb marcada com P³²95

Figura A.3 – Sequência proteica completa de *TcABCG1* de três grupos de cepas.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Associação entre as <i>Discrete Typing Units</i> (DTUs) de <i>T. cruzi</i> e reservatórios silvestres, vetores, distribuição geográfica e manifestações da doença de Chagas.....	26
Tabela 2 – Similaridade por BLASTP do transportador <i>TcABCG1</i> e membros da subfamília ABCG de humanos e de duas espécies de <i>Leishmania</i>	36
Tabela 3 – Características dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene <i>TcABCG1</i>	44
Tabela 4 – Características de cepas de <i>T. cruzi</i> utilizadas no estudo.....	53
Tabela 5 – Efeito de inibidores de transportadores ABC no crescimento de formas epimastigotas da cepa CL Brener e VL10.....	54
Tabela 6 – Efeito de verapamil na suscetibilidade a BZ (CI ₅₀) em cepas de <i>T. cruzi</i>	55
Tabela 7 – Efeito de ciclosporina A na suscetibilidade a BZ (CI ₅₀) em cepas de <i>T. cruzi</i>	55
Tabela 8 – Suscetibilidade a BZ de CL Brener selvagem (WT) e transfectado com o gene <i>TcABCG1</i> de diferentes cepas.....	61
Tabela 9 – Suscetibilidade a NFX de CL Brener selvagem (WT) e transfectado com o gene <i>TcABCG1</i> de diferentes cepas.....	62
Tabela 10 – Sinal de hibridização da sonda do gene ABC a partir de dados do Southern Blot.....	65
Tabela 11 – Razão da abundância relativa de transcritos de <i>TcABCG1</i>	66
Tabela 12 – Estimativa da abundância do gene <i>TcABCG1</i> por PCR em tempo real.....	68
Tabela 13 – Características dos transportadores ABC de <i>T. cruzi</i> identificados no genoma de CL Brener.....	69
Tabela A.1 – Genes de transportadores ABC de <i>T. cruzi</i> alelos e ortólogos a espécies de <i>Leishmania</i> e tripanossomas africanos.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
μl	Microlitros
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ABCP	<i>Placenta Specific ABC</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BZ	Benznidazol
cDNA	Fita complementar de DNA
CI ₅₀	Concentração de droga que inibe o crescimento celular em 50%
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EL	Haplótipo Esmeraldo
FTC	Fumitremorgin C
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HUGO	<i>Gene Nomenclature Committee</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kb	Kilobases
KCl	Cloreto de Potássio
kpxls	Kilopixels
LB	Luria Bertani
LIB	<i>Liver Infusion Broth</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
Mb	Megabases
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>

ml	Mililitros
MLEE	<i>Multi-Locus Enzyme Electrophoresis</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
MXR	<i>Mitoxantrona Resistance Protein</i>
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOAc	Acetato de Sódio
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i>
NEL	Haplótipo Não-Esmeraldo
NFX	Nifurtimox
O ₂	Gás Oxigênio
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OYE	<i>Old Yellow Enzyme</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese de Campo Pulsado
PFGR	<i>Pathogen Functional Genomics Resource Center</i>
PGP	Glicoproteína-P
PRP	<i>Pentamidine Resistance Protein</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNO ₂	Radical Nitroânion
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
SDS	Lauril Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolic repressor</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TMD	<i>Transmembrane Domain</i>
WT	<i>Wild Type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

C_T *Cycle Threshold*

$^{\circ}\text{C}$ graus Celsius

AMINOÁCIDOS

Ácido aspártico D

Ácido glutâmico E

Alanina A

Arginina R

Asparagina N

Cisteína C

Fenilalanina F

Glicina G

Glutamina Q

Histidina H

Isoleucina I

Leucina L

Lisina K

Metionina M

Prolina P

Serina S

Tirosina Y

Treonina T

Triptófano W

Valina V

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina A

Citosina C

Guanina G

Timina T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 A doença de Chagas.....	23
1.2 Ciclo evolutivo, variabilidade genética e nomenclatura do <i>T. cruzi</i>	23
1.3 Eficácia do tratamento e suscetibilidade de cepas de <i>T. cruzi</i> a quimioterápicos.....	26
1.4 Mecanismos de resistência a drogas.....	28
1.5 Transportadores ABC	29
1.6 O gene <i>TcABCG1</i>	33
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Meios e Soluções.....	37
3.2 Cepas e culturas de <i>T. cruzi</i>	37
3.3 Determinação da suscetibilidade a drogas	38
3.3.1 Determinação da suscetibilidade a BZ.....	38
3.3.2 Determinação da suscetibilidade a NFX	38
3.4 Efeito de inibidores de transportadores ABC na suscetibilidade a BZ	38
3.5 Manutenção de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> – congelamento e descongelamento	38
3.6 Estocagem de formas epimastigotas para extração de DNA/RNA	39
3.6.1 Extração de DNA total de formas epimastigotas	39
3.6.2 Extração de RNA total de formas epimastigotas	39
3.7 Bactérias competentes	40
3.8 Clonagem do gene <i>TcABCG1</i>	40
3.8.1 Amplificação do gene	40
3.8.2 Purificação do produto de PCR	41
3.8.3 Adição de adenina ao produto de PCR	41
3.8.4 Ligação ao vetor de clonagem	41
3.8.5 Transformação em bactérias competentes <i>DH5α</i>	42
3.8.6 PCR de colônia	42
3.8.7 Purificação de DNA plasmidial.....	43
3.9 Sequenciamento do gene <i>TcABCG1</i>	43
3.10 Transfecção do gene <i>TcABCG1</i> em <i>T. cruzi</i>	44

3.10.1 Liberação do gene <i>TcABCG1</i> do vetor de clonagem.....	44
3.10.2 Clonagem do gene <i>TcABCG1</i> no vetor <i>pROCKNeo</i>	45
3.10.3 Transfecções em <i>T. cruzi</i>	45
3.11 Southern Blot	46
3.12 Obtenção de sondas radioativas e condições de hibridização.....	46
3.12.1 Marcação por random primer extension	46
3.12.2 Hibridização de sondas radioativas com ácidos nucléicos imobilizados	46
3.12.3 Lavagem das membranas	47
3.12.4 Desibridização das membranas	47
3.13 PCR em tempo real para determinação do número de cópias do gene <i>TcABCG1</i> ...	47
3.14 RT-PCR em tempo real.....	48
3.14.1 PCR convencional	48
3.14.2 Síntese da primeira fita de cDNA.....	49
3.14.3 Síntese da segunda fita de cDNA e PCR em tempo real	49
3.14.4 Teste da eficiência de amplificação	49
3.14.5 Análises dos dados	50
3.15 Identificação e caracterização de genes de <i>T. cruzi</i> para transportadores ABC	50
3.16 Análises filogenéticas e classificação dos transportadores ABC de <i>T. cruzi</i>	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Determinação da suscetibilidade a BZ em cepas de <i>T. cruzi</i>	52
4.2 Efeito de inibidores de transportadores ABC na suscetibilidade a BZ	53
4.3 Caracterização do gene do transportador <i>TcABCG1</i> de <i>T. cruzi</i>	55
4.3.1 Amplificação da sequência completa do gene <i>TcABCG1</i>	55
4.3.2 Clonagem no vetor <i>pGEM-T Easy</i>	56
4.3.3 Análises das sequências do gene <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>	56
4.4 Transfecção de genes <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i> em CL Brener	58
4.4.1 Os genes <i>TcABCG1</i>	58
4.4.2 Transfecções em <i>T. cruzi</i>	59
4.4.3 Suscetibilidade a BZ e NFX	60
4.4.4 Localização do gene <i>TcABCG1</i> no genoma dos parasitas transfectados.....	61
4.4.5 Abundância de transcritos de <i>TcABCG1</i> nas culturas transfectadas	65
4.4.6 Quantificação da razão de abundância do gene <i>TcABCG1</i> em cepas selvagens.....	66
4.5 Caracterização de proteínas ABC de <i>T. cruzi</i>	67

4.5.1 Identificação de proteínas ABC no genoma de CL Brener.....	67
4.5.2 Genes alelos e ortólogos	69
4.5.3 Localização cromossômica dos transportadores ABC de <i>T. cruzi</i>	70
4.5.4 Análise da estrutura das proteínas ABC hipotéticas	70
4.5.5 Análise filogenética e classificação dos transportadores ABC de <i>T. cruzi</i>	71
5 DISCUSSÃO	74
5.1 Suscetibilidade a BZ e o efeito de inibidores de transportadores ABC	74
5.2 Cópias do gene <i>TcABCG1</i> em cepas de <i>T. cruzi</i>	76
5.3 Estrutura do gene <i>TcABCG1</i> de cepas de <i>T. cruzi</i>	76
5.5 Abundância de transcritos de <i>TcABCG1</i> nos transfectantes	78
5.6 Filogenia de transportadores ABC de <i>T. cruzi</i>.....	79
5.7 Perspectivas.....	80
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO A - Ilustrações e tabelas	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

O parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, infecta 7,7 milhões de pessoas na América Latina, onde mais de 100 milhões de pessoas se encontram em situação de risco. A doença de Chagas causa cerca de 12.500 mortes anuais (Rassi Jr. et al., 2010). A transmissão do parasita ocorre mais frequentemente quando fezes do inseto vetor triatomíneo, contaminadas com o protozoário, entram em contato com a pele ou mucosa do hospedeiro humano. A maior morbidade da doença ocorre na fase crônica, que pode levar vários anos para se desenvolver. Não existe vacina contra o *T. cruzi* e o tratamento é restrito a duas drogas, benznidazol (BZ) e nifurtimox (NFX), com eficácia parcial, efeitos colaterais potencialmente prejudiciais e tratamentos longos (60 dias) (Urbina, 2010).

As manifestações clínicas clássicas da doença de Chagas derivam da infecção das células musculares cardíacas, levando a uma cardiomiopatia progressiva. A cardiomiopatia chagásica é a maior causa de infarto cardíaco na América Latina, sendo a morte súbita responsável por 55-65% desses casos. No Brasil, o desenvolvimento de megassíndromes também é comum (Rassi Jr. et al., 2010).

A transmissão vetorial é a principal forma de infecção por *T. cruzi*, que também pode ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, ingestão de bebidas ou alimentos contaminados com o parasita, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (Dias, 2000; Moncayo, 2003). Além disso, a migração de indivíduos infectados provenientes de áreas endêmicas tem elevado os índices da doença de Chagas na Europa, América do Norte, Japão e Austrália (Schmunis, 2007). O controle da transmissão vetorial e transfusional permanece como uma das mais importantes formas de profilaxia da doença.

1.2 Ciclo evolutivo, variabilidade genética e nomenclatura do *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um parasita digenético que tem insetos triatomíneos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, comumente chamados de barbeiros, como hospedeiros intermediários, e mamíferos, como hospedeiros definitivos. O parasita apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 1) e três formas evolutivas distintas, que são nomeadas de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e à região de emergência do flagelo. Estas formas evolutivas são: a epimastigota (forma flagelada, replicativa no intestino do inseto e

não infectante); a tripomastigota (forma flagelada, infectante, não replicativa e presente no vetor e nos hospedeiros mamíferos); e a amastigota (forma com pequeno flagelo intracelular, replicativa, presente nos mamíferos e possivelmente infectante). A tripomastigota é a forma que representa o elo de ligação entre o vetor e os hospedeiros mamíferos (Brenner, 1973; De Souza, 2003).

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*. Extraído de *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*:
Fonte: CDC's Division of Parasitic Diseases and Malaria (DPDM, 2010).

Quando o inseto vetor se alimenta com sangue do mamífero, defeca, e as formas tripomastigotas metacíclicas, eliminadas nas fezes, atravessam a pele ou mucosa do hospedeiro e penetram nas células próximas ao local da picada. Na célula, transformam-se em amastigotas, que se multiplicam no citoplasma e, após várias gerações, diferenciam-se em tripomastigotas, que são liberadas na corrente sanguínea e podem infectar células de vários tecidos, como muscular, cardíaco ou nervoso. Mais recentemente, foi descrita uma forma epimastigota intracelular, intermediária entre a forma amastigota e tripomastigota (Silber et al., 2009)

Os insetos triatomíneos são infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ao se alimentarem do sangue do mamífero contaminado. No intestino médio do inseto, as tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas e, no final do tubo digestivo, parte

destas formas se diferencia em tripomastigotas metacíclicas, que são eliminados nas fezes quando o inseto se alimenta novamente, começando assim um novo ciclo de infecção (De Souza et al., 2003).

O *T. cruzi* apresenta considerável polimorfismo genético. Este fato foi demonstrado com base no perfil eletroforético de isoenzimas (*Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*, MLEE) (Miles et al., 1978; Tibayrenc e Breniere, 1988), análise de fragmentos de restrição do DNA do cinetoplasto (Morel et al., 1980), impressões digitais do DNA (*DNA fingerprinting*) (Macedo et al., 1992), amplificação randômica do DNA polimórfico (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) e polimorfismo de genes de RNA ribossômico (rRNA) e do mini-éxon (Souto et al., 1996). Apesar da grande diversidade genética, a primeira evidência da existência de dois grupos principais de *T. cruzi* foi sugerida a partir da interpretação de dados de tipagem do gene de rRNA 24S α e mini-éxon (Souto et al., 1996), dados de MLEE e RAPD (Tibayrenc, 1995) e atividade do promotor de rRNA (Floeter-Winter et al., 1997), dentre outros.

Tabela 1 – Associação entre as *Discrete Typing Units* (DTUs) de *T. cruzi* e reservatórios silvestres, vetores, distribuição geográfica e manifestações da doença de Chagas.

DTU	Reservatórios silvestres	Vetores silvestres	Distribuição Geográfica	Doença de Chagas
TcI	Marsupiais, roedores e primatas	<i>Rhodnius</i> <i>Panstrongylus</i> <i>Triatoma</i> <i>Eratyrus</i>	Américas do Sul, Norte e Central	Cardiomiopatia
TcII	Primatas de florestas do Atlântico e marsupiais	Não conhecidos completamente	Cone Sul	Cardiomiopatia e megassíndromes
TcIII	Tatus	<i>P. geniculatus</i>	América do Sul	Raro em humanos. Forma clínica pouco conhecida
TcIV	Primatas	<i>Rhodnius</i> , <i>Panstrongylus</i> , <i>Triatoma</i>	Américas do Sul e do Norte	Causa secundária de doença de Chagas na Venezuela. Casos esporádicos em outras regiões da América do Sul
TcV	Pouco conhecidos	Pouco conhecidos	Cone Sul	Cardiomiopatia e megassíndromes
TcVI	Pouco conhecidos	Pouco conhecidos	Cone Sul	Cardiomiopatia e megassíndromes

Fonte: Compilada a partir de Miles et al., 2009.

Múltiplas estratégias de genotipagem apoiam a subdivisão de *T. cruzi* em seis grupos filogenéticos principais, recentemente nomeados como DTUs (TcI-TcVI) por consenso internacional (Zingales et al., 2009). A associação de cada DTU com vetores e reservatórios mamíferos, e com as manifestações da doença de Chagas, bem como sua distribuição geográfica, foi definida recentemente (Miles et al., 2009) (Tabela 1). Deste quadro, resulta que as seis DTUs são capazes de promover a doença de Chagas humana, embora sejam raros os casos promovidos por TcIII (Miles et al., 2009) (Tabela 1).

Experimentos *in vitro* e em modelos experimentais indicam uma variação fenotípica significativa entre as cepas de *T. cruzi* (De Souza et al., 2011; Machado et al., 2006; Ramirez et al., 2010; Zingales et al., 1999) e em características do parasita relacionadas com a virulência, parasitemia, tropismo tissular, patologia e resistência a drogas (De Diego et al., 1998; Mejia e Triana, 2005; Toledo et al., 2002).

1.3 Eficácia do tratamento e suscetibilidade de cepas de *T. cruzi* a quimioterápicos

O objetivo do tratamento específico da doença de Chagas é a eliminação total do parasita do indivíduo infectado, evitando assim o desenvolvimento da doença. Apenas duas drogas, benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) e nifurtimox (5-nitrofurano 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamina) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxido) (Figura 2) estão disponíveis para o tratamento da doença, sendo bastante eficazes na fase aguda e crônica recente.

Figura 2 – Estrutura química das drogas atualmente disponíveis para o tratamento etiológico da doença de Chagas: Nifurtimox e Benznidazol.

De fato, numerosas triagens clínicas mostraram até 80% de cura parasitológica na fase aguda e 60-70% de cura na fase crônica recente em crianças de até 14 anos de idade (De Andrade et al., 1996; Sosa-Estani et al., 1998, 2009; Yun et al., 2009). Em adultos na fase crônica, apenas 5-20% de pacientes foram considerados curados (Cançado, 2001; Dias 2006). Por outro lado, o tratamento com BZ na fase crônica leva a um melhor prognóstico da evolução clínica das cariomiotopias chagásicas e é recomendado por especialistas (Sosa-Estani et al., 2009; Viotti et al., 2006).

Novas drogas para o tratamento da doença de Chagas, que permitam um tratamento mais curto e apresentem menos efeitos colaterais, são necessárias. Azóis antifúngicos, como posaconazol, ravuconazol e TAK187, têm-se mostrado eficazes em modelos experimentais (Corrales et al., 2005; Pinazo et al., 2010; Urbina et al., 2003). Um estudo clínico de fase 2 foi iniciado em meados de 2010 com o composto triazólico de nova geração E-1224 (Azoles E1224 & Biomarker, 2011). Além disso, estudos estão em andamento para produzir novos derivados de BZ (Nogueira Silva et al., 2008). A combinação de compostos já existentes, que apresentam diferentes mecanismos de ação, vem sendo proposta como uma abordagem alternativa para o desenvolvimento de novos tratamentos (Benaim et al., 2006).

BZ e NFX são pró-drogas que agem diretamente no parasita após serem ativadas por nitrorredutases próprias (Wilkinson et al., 2008). Durante o processo de bioativação, metabólitos quimicamente reativos são formados. Para NFX, forma-se o radical nitroânion (RNO_2^-), ao passo que para BZ forma-se o radical hidronitróxido (RNHO). As reações do RNO_2^- com oxigênio podem levar ao ciclo de oxidorredução para a formação no ânion superóxido de O_2^- (Castro et al., 2006). No caso de BZ, o processo nitrorredutivo é seguido pela formação do amino derivado correspondente e, durante a biotransformação, um metabólito reativo é formado (RNHO). Acredita-se que a toxicidade de BZ surja a partir da interação de alguns destes metabólitos reativos com o DNA, proteínas e lipídeos ou outros componentes celulares importantes (De Toranzo e Castro, 1994; Gorla et al., 1986; Masana et al., 1985).

As razões para a diferença marcante na eficácia antiparasitária de compostos nitro-heterocíclicos nas fases agudas e crônicas da doença não são claros (Cançado, 2002), mas podem estar relacionadas com as propriedades farmacocinéticas das drogas, como por exemplo, meia-vida curta e baixa penetração nos tecidos (Raaflaub, 1980; Workman et al., 1984), o que limita sua ação na fase crônica quando os parasitas estão confinados nos tecidos onde apresentam replicação lenta (Urbina, 2003; Urbina e Docampo, 2003).

Foram descritas diferenças regionais no declínio de anticorpos anti-*T. cruzi* em resposta ao tratamento com BZ. A queda no nível de anticorpos ocorre mais prontamente em pacientes de países do norte da América do Sul e América Central, quando comparada com pacientes de países do Cone Sul e Estados Unidos (Yun et al., 2009). Esta observação fala a favor de diferentes suscetibilidades das cepas infectantes às drogas utilizadas, bem como de possíveis diferenças na imunogenética dos indivíduos infectados.

Nos últimos 25 anos, foram claramente documentadas diferenças de suscetibilidade a BZ e NFX em muitas cepas de *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros e áreas geográficas (Andrade et al., 1992; Filardi e Brener, 1987; Murta et al., 1998; Toledo et al., 2002).

Em trabalho seminal, Filardi e Brener (1987) determinaram a suscetibilidade a BZ e NFX em 47 cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes, vetores domésticos e silvestres e de reservatórios silvestres. Estes isolados foram inoculados em camundongos que foram tratados alternativamente com os dois nitroderivados, monitorando-se a porcentagem de cura 20 dias pós-tratamento. Os autores verificaram que a eficiência terapêutica variava entre 0% a 100%, classificando as cepas em resistentes (0 a 33% de cura); intermediárias (33 a 66%) e sensíveis (66 a 100%). Curiosamente, neste modelo foi verificado um comportamento semelhante na eficácia de NFX e BZ. É também relevante comentar que cepas resistentes às duas drogas são resistentes a outros compostos (revisto em Coura e Castro, 2002; Urbina e Docampo, 2003).

Em seu projeto de doutoramento, realizado em nosso laboratório, Margoth Moreno Vigo padronizou um ensaio *in vitro* para quantificar a sensibilidade a BZ em formas epimastigotas de cerca de 20 isolados do *T. cruzi* (Moreno Vigo, 2008). O valor de CI_{50} , concentração de droga que inibe o crescimento celular em 50%, dos isolados variou de 7,6 μM a 127 μM BZ (Moreno et al., 2010). Cinco dos isolados analisados constaram do trabalho de Filardi e Brener (1987) descrito acima, observando-se uma correlação entre o valor de CI_{50} para BZ de epimastigotas e a eficácia do tratamento em camundongos infectados.

1.4 Mecanismos de resistência a drogas

Os mecanismos envolvidos no fenômeno de resistência a BZ e NFX foram investigados por diferentes abordagens em isolados cuja resistência foi induzida por pressão seletiva com as drogas. Neste contexto, foi verificado que a deleção de cópias do gene que codifica a “old yellow enzyme” (*TcOYE*) promove resistência a BZ (Murta et al., 2006). A proteína *TcOYE* é uma flavina oxidorreductase NAD(P)H dependente, que pode estar envolvida no metabolismo de BZ, gerando radicais ânions tóxicos para o parasita. Cabe

ressaltar, no entanto, que a expressão do gene *TcOYE* encontra-se reprimida unicamente em parasitas com resistência induzida, mas não em parasitas que apresentaram resistência natural a BZ (Murta et al., 2006). Mais recentemente, foi descrito que a perda de uma cópia do gene que codifica uma nitrorredutase mitocondrial, responsável pela ativação das pró-drogas NFX e BZ, é suficiente para causar resistência a uma variedade de drogas nitroheterocíclicas (Wilkinson et al., 2008). Superóxido dismutases (SOD) também foram implicadas no fenótipo de resistência a drogas em *T. cruzi*. Esta classe de enzimas atua removendo o excesso O_2^- , gerado no estresse oxidativo, via dismutação a O_2 e H_2O_2 . Temperton et al. (1998) transfectaram formas epimastigotas com um vetor contendo o gene Fe-SOD e observaram que a superexpressão desta enzima promovia um aumento na suscetibilidade a BZ. Por outro lado, em trabalho posterior, Nogueira et al. (2006) verificaram que parasitas com resistência a BZ induzida *in vitro* apresentavam superexpressão de FeSOD-A. Estes autores levantaram a possibilidade de que nestes parasitas haveria também a superexpressão de outras enzimas antioxidantes envolvidas no metabolismo de H_2O_2 e, desta forma, ocorreria a detoxificação do hidroperóxido, promovendo o fenótipo de resistência.

O conjunto de dados descritos acima sugere que o fenótipo de resistência induzida por pressão seletiva com BZ seja resultante da ação de diferentes mecanismos, que podem atuar de forma independente ou concertada. Além disto, sugerem diferenças entre os determinantes que atuam no processo de resistência induzida e resistência natural a BZ.

A aquisição de resistência a multidrogas é um sério problema no tratamento de muitas doenças virais, bacterianas, parasitárias e no câncer. A resistência celular a uma única classe de drogas citotóxicas pode surgir de diversas maneiras, incluindo a inativação da droga, alteração do elemento alvo, diminuição da permeabilidade da membrana, mudanças no metabolismo da droga e bombeamento da droga para fora da célula (revisto em Dean e Anillo, 2005).

1.5 Transportadores ABC

Um dos principais mecanismos de resistência a multidrogas é o transporte ativo de drogas para fora da célula, mediado por transportadores que bombeiam um largo espectro de compostos citotóxicos, incluindo antibióticos, antimaláricos, herbicidas e quimioterápicos usados no tratamento de câncer (revisto em Higgins, 2007).

Estes transportadores são proteínas transmembranares de uma superfamília específica que apresenta sítios de ligação de ATP, sendo, por este motivo, denominados transportadores

ABC (*ATP binding cassette*). A unidade funcional mínima de todos os transportadores ABC consiste em quatro domínios. Dois domínios citoplasmáticos, NBDs (*nucleotide binding domains*), que ligam e hidrolisam o ATP, e dois domínios transmembrana, TMDs (*transmembrane domains*), compostos por α -hélices múltiplas (geralmente seis), que formam a estrutura pela qual os compostos atravessam a membrana. Os domínios estão unidos em um único polipeptídeo nas proteínas ABC completas. Os NBDs contêm em sua sequência os motivos Walker A e Walker B (Walker et al., 1982) que são comuns a todas as proteínas que ligam ATP. Além disso, os domínios NBD possuem uma pequena sequência conservada chamada assinatura ABC, que é típica dos membros da superfamília ABC (revisto em Higgins, 2007).

Dados estruturais, em conjunto com a caracterização genética e bioquímica destes transportadores, permitiram propor um modelo de transporte do tipo “ATP-interruptor” (Higgins e Linton, 2004). A força motriz para o transporte da droga é a mudança conformacional do dímero NBD. A ligação de ATP promove a rotação dos domínios NBDs e a formação de um dímero fechado que engloba duas moléculas de ATP. A hidrólise do ATP e liberação de ADP e Pi determinam a abertura do dímero. Esta cinética pode diferir entre transportadores, dependendo da extensão da cooperatividade entre os dois NBDs e os sinais provenientes dos TMDs. A ligação de ATP pelos NBDs e a formação do dímero fechado induzem mudanças conformacionais substanciais nos TMDs (Rosenberg et al., 2001), que medeiam a translocação do substrato – uma redução na afinidade de ligação ao composto – e a reorientação do sítio de ligação, que passa a ser exposto à face extracelular da membrana, momento em que o composto pode ser liberado (revisto em Higgins, 2007).

A superfamília de transportadores ABC está dividida em oito subfamílias (A-H), que se diferenciam quanto à homologia, número e arranjo dos NBDs e TMDs, localização celular e função. Membros das subfamílias B, C e G estão intimamente relacionados com o transporte de drogas, bombeando o composto para fora da célula, contra um gradiente de concentração, num processo dependente de energia (revisto em Higgins, 2007). Este é um dos mecanismos de resistência a drogas mais bem conhecidos, conservado desde bactérias até o homem (Lage, 2003). Membros da superfamília ABC, que incluem as glicoproteínas P (PGP ou ABCB) e outras proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MDR, MRP ou ABCC), conferem o fenótipo de resistência a células tumorais (Germann, 1996). A representação esquemática da estrutura das subfamílias de transportadores ABC em parasitas protozoários (Sauvage et al., 2009) é mostrada na Figura 3.

protein 1), foi correlacionado com resistência a pentamidina (Coelho et al., 2003, 2007, 2008).

Em isolados de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina foi verificado que o efluxo desta droga encontra-se aumentado (Krogstad et al., 1987). A adição de verapamil, agente clássico de reversão de MDR em células animais, foi capaz de restaurar parcialmente a suscetibilidade a cloroquina (Martin et al., 1987). Estas observações levaram ao isolamento do gene do transportador ABC *pfmdr1*, que apresenta uma estrutura e sequência similar ao gene de glicoproteínas-P de mamíferos (Foote et al., 1989; Wilson et al., 1989). A ação antimalárica da cloroquina parece ocorrer no vacúolo digestivo dos estágios intraeritrocíticos do parasita, onde a droga interfere com a polimerização e detoxificação do grupo heme da hemoglobina. Mutações no gene de uma proteína transmembrana deste vacúolo, denominada PfCRT, foram associadas ao fenômeno de resistência à droga, por promoverem alteração em seu transporte e ligação ao heme (Fidock et al., 2000).

Dois transportadores ABC, *TbMRPA* e *TbMRPE*, estão envolvidos na resistência de *Trypanosoma brucei* a drogas tripanocidas (Shahi et al., 2002). O transportador TbAT1 é exigido para o bombardeamento para o meio extracelular de drogas arsenicais e de diamidinas (Barrett e Fairlamb, 1999). Isolados de *T. brucei gambiense* de pacientes do Sudão, Uganda e Angola resistentes a drogas apresentaram uma mutação no gene *TbAT1* (Matovu et al., 2001).

Alguns transportadores ABC de *T. cruzi* foram caracterizados, os quais, aparentemente, não estão envolvidos em quimiorresistência. Inicialmente foram descritos os genes da *Tcpgp1* e *Tcpgp2* (Dallagiovanna et al., 1994, 1996). A sequência de aminoácidos codificada por *Tcpgp1* apresenta similaridade com segmentos dos transportadores LtpgpA de *L. tarentolae* e HuMRP de humanos e o produto codificado por *Tcpgp2* apresenta similaridade com a glicoproteína P de *L. tarentolae*, com o fator de calmodulina (YCF1) de levedura e com proteínas MDR associadas à resistência a drogas em humanos (Dallagiovanna et al., 1996). Estudos subsequentes mostraram que o fenótipo de resistência a BZ de *T. cruzi* não está associado à superexpressão ou à amplificação dos dois genes (Murta et al., 2006). Este resultado é concordante com as características e a classificação das proteínas por eles codificadas. Realizamos uma busca dos domínios conservados (Banco Prosite) nas proteínas Tcpgp1 e Tcpgp2 e pudemos constatar que Tcpgp1 não apresenta o motivo Walker B, mas sim o motivo Walker A e a assinatura ABC. Esta proteína não possui o domínio transmembrana e, desta forma, sua localização seria citoplasmática. Este transportador poderia ser membro das subfamílias ABCE ou ABCF, para as quais nenhuma função de transporte foi atribuída. Por outro lado, o transportador Tcpgp2 é um transportador ABC

típico, com dois domínios citoplasmáticos de ligação de ATP e dois domínios transmembrana. Através de busca por homologia com transportadores de espécies próximas evolutivamente, deduzimos que este transportador pertenceria à subfamília ABCA. Membros desse grupo também não estão relacionados com o transporte de drogas.

Outro transportador ABC da subfamília A foi identificado em *T. cruzi* (Torres et al., 2004). *TcABC1* (ou *TcABCA1*) é um gene de cópia única diferencialmente expresso durante o ciclo celular do parasita e ausente em tripomastigotas. TcABC1 está localizado na membrana plasmática, bolsa flagelar e vesículas intracelulares. Estudos funcionais de TcABC1 em parasitas transfectados sugerem que a proteína esteja implicada no tráfego intracelular e envolvida em vias de endocitose e exocitose (Torres et al., 2004).

O envolvimento de transportadores ABC no fenótipo de resistência a drogas pode ser confirmado pelo uso de inibidores específicos destes transportadores, tais como: verapamil, fumitremorgin C e ciclosporina A (Doyle e Ross, 2003; Ejendal e Hrycyna, 2004; Robey et al., 2008). Verapamil é um bloqueador de canais de Cálcio que também reverte a MDR em células de mamífero. Em *Leishmania*, um transportador ABC (ABCC7), denominado PRP1, foi associado ao fenótipo de resistência a pentamidina. Esta resistência foi revertida utilizando-se concentrações não tóxicas de verapamil (Coelho et al., 2003, 2007). A ciclosporina A inibe o transporte da droga mediado por Pgp e MRP, por interferir no reconhecimento do substrato e a hidrólise de ATP (Wagner-Souza et al., 2003). Fumitremorgin C (FTC) é um inibidor específico e seletivo da proteína do câncer de mama (BCRP) que confere resistência a doxorubicina, mitoxantrano e topotecano. A BCRP é um transportador ABC, pertencente à subfamília G (ABCG2). FTC não atua em transportadores do tipo Pgp e MRP (Imai et al., 2002; Susanto et al., 2008).

1.6 O gene *TcABCG1*

Em seu projeto de doutoramento, Margoth Moreno Vigo analisou a expressão diferencial de genes em isolados de *T. cruzi* naturalmente suscetíveis ou resistentes a BZ, utilizando lâminas de microarranjos de DNA preparadas pelo *Pathogen Functional Genomics Resource Center* (PFGRC) do TIGR, que contêm oligonucleotídeos representantes de 12.288 ORFs de CL Brener (Moreno Vigo, 2008).

Dentre a série de genes diferencialmente expressos entre a cepa sensível e a cepa resistente a BZ, foram identificados três genes que codificam transportadores ABC putativos, superexpressos na cepa resistente. Os estudos foram concentrados em um destes genes ABC

(Tc00.1047053508231.190), que apresenta 1998 pb e codifica 665 aminoácidos. Ensaios de RT-PCR em tempo real (Figura 4) confirmaram os dados dos microarranjos e mostraram maior abundância de transcritos deste gene em 5 isolados resistentes a BZ em relação a 3 isolados sensíveis (com 95% de confiança ao se aplicar o teste de *Student*) (Moreno Vigo, 2008).

Figura 4 – Abundância relativa de transcritos do gene ABC de *T. cruzi* em cepas sensíveis (barras cinzas) e resistentes (barras pretas) a BZ. Dados obtidos por RT-PCR em tempo real
Fonte: Moreno Vigo, 2008.

O transportador ABC mais expresso em cepas resistentes apresenta um único NBD e um único TMD composto de seis α -hélices, sendo um meio-transportador. A análise da filogenia e da estrutura de sua sequência proteica sugere que o transportador pertença à subfamília G (Figura 3). Sendo o primeiro membro desta subfamília identificado em *T. cruzi*, decidimos denominá-lo *TcABCG1*. Meio-transportadores necessitam dimerizar (ver esquema na Figura 5) para tornarem-se funcionais (Xie et al., 2008).

Membros da subfamília ABCG estão envolvidos em processos de quimiorresistência em muitos eucariotos. Dentro desta subfamília, o mais conhecido é o transportador ABCG2 humano, chamado também de ABCP (*placenta specific ABC*), BCRP (*breast cancer resistance protein*) ou MXR (*mitoxantrona resistance protein*). Este transportador confere a células tumorais uma significativa resistência a diferentes fármacos como mitoxantrona, daunorrubicina, doxorubicina, metotrexato, entre outros (Doyle et al., 1998; Ross et al., 1999; Scheffer et al., 2000; Shigeta et al., 2010). Em *Leishmania*, a superexpressão dos

transportadores ABCG4 e ABCG6 confere resistência a fármacos hidrofóbicos como miltefosina, edelfosina e perifosina (Castanys-Muñoz et al., 2007, 2008).

Figura 5 – Representação de um transportador ABC formado por dois meio-transportadores, que necessitam homodimerizar para formar uma proteína funcional.

Uma busca com o programa BLASTP mostrou elevada similaridade do transportador *TcABCG1* com cinco transportadores da subfamília G (ABCG1-ABCG5) de humanos e de duas espécies de *Leishmania* (Tabela 2).

Tabela 2 – Similaridade por BLASTP do transportador *TcABCG1* e membros da subfamília G de humanos e de duas espécies de *Leishmania*.

Organismo	Similaridade				
	ABCG1	ABCG2	ABCG3	ABCG4	ABCG5
<i>Homo sapiens</i>	28%	29%	28%	28%	26%
<i>Leishmania major</i>	57%	60%	37%	25%	-
<i>Leishmania infantum</i>	59%	57%	26%	26%	-

2 OBJETIVOS

Os resultados obtidos por nosso grupo até o momento sugerem que o transportador *TcABCG1* seja um dos elementos implicados na resistência natural a BZ em *T. cruzi*. Tendo em vista que BZ e NFX são compostos nitro-heterocíclicos e que Filardi e Brener (1987) observaram uma resistência análoga aos dois compostos em cepas de *T. cruzi*, é possível que *TcABCG1* também atue na resistência a NFX.

Desta forma, o objetivo geral do presente estudo é verificar o envolvimento de *TcABCG1* no fenótipo de resistência natural de *T. cruzi* a BZ. Para esta finalidade, iremos utilizar cepas suscetíveis e resistentes a BZ, criopreservadas em nosso banco.

Os objetivos específicos do estudo são:

1. Verificar a ação de inibidores de transportadores ABC na resistência a BZ;
2. Verificar se a superexpressão do gene *TcABCG1* altera a suscetibilidade a BZ e NFX de uma cepa sensível;
3. Determinar o número de cópias do gene *TcABCG1* em algumas cepas de *T. cruzi* cuja suscetibilidade a BZ é conhecida;
4. Como objetivo adicional, pretendemos caracterizar os genes de transportadores ABC presentes no genoma da cepa CL Brener, organismo de referência do projeto Genoma de *T. cruzi*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios e Soluções

- Meio LB – Bacto Triptona 1%; Bacto Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 1%, pH 7,0;
- Meio LB/ágar – Meio LB contendo 1,5% ágar, pH 7,0;
- Meio LIT – NaCl 2%; KCl 0,2%; Na₂HPO₄ anidro 4%; Triptose 2,5%; LIB 0,5%; Glicose 0,4%; Penicilina 0,02%; Estreptomicina 0,02%; Hemina 0,0025%; Soro Fetal Bovino 10%, pH 7,4;
- Meio PBS 1x – Tampão Fosfato de Sódio 10 mM, pH 7,2; NaCl 150 mM, pH 7,4;
- Meio SOC – Glicose 20 mM; Bacto Triptona 2%; Bacto Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 0,0585%; KCl 0,0186%, pH 7,0;
- SDS – Lauril Sulfato de Sódio;
- SSC 1x – NaCl 0,15 M; Citrato de Sódio 0,015 M, pH 7,0;
- Tampão de Eletroporação – Sacarose 272 mM, Tampão Fosfato de Sódio 7 mM, pH 7,2, MgCl₂ 1mM;
- TBE 1x – Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0;
- TE – Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0;
- Benznidazol – solução estoque 25 mM em DMSO;
- Nifurtimox (Bayer, Alemanha) – solução estoque 50 mM em DMSO.

3.2 Cepas e culturas de *T. cruzi*

As características das cepas utilizadas neste estudo quanto à sua classificação, origem geográfica e hospedeiro do qual foram isoladas são descritas na Tabela 4 (Resultados). Formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). O meio foi preparado segundo Castellani et al. (1967). As culturas foram mantidas a 28 °C sem agitação e repicadas na fase exponencial de crescimento.

3.3 Determinação da suscetibilidade a drogas

3.3.1 Determinação da suscetibilidade a BZ

Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento em meio LIT-10% SFB foram distribuídas em placas de 24 poços numa densidade de 10^7 células/ml e expostas a diferentes concentrações de BZ (0 a 160 μ M) por 72 horas a 28 °C. Ao término deste período, a densidade celular das amostras foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A porcentagem de inibição do crescimento foi calculada em relação ao controle em ausência do composto. Os ensaios foram realizados em duplicata numa mesma placa e repetidos em dias diferentes. Para o cálculo da CI_{50} , que corresponde à concentração de droga que inibe o crescimento celular em 50%, os dados foram tratados com os programas *Sigma Plot* (versão 11) empregando o algoritmo *Four Parametric Logistic*. O cálculo da média e desvio-padrão da CI_{50} foi obtido com o programa *Microsoft Office Excel* (versão 2010).

3.3.2 Determinação da suscetibilidade a NFX

A suscetibilidade a NFX de formas epimastigotas foi determinada como descrito no item 3.3.1. As culturas foram expostas a diferentes concentrações do composto (0 a 80 μ M) por 72 horas a 28 °C.

3.4 Efeito de inibidores de transportadores ABC na suscetibilidade a BZ

Utilizamos como inibidores de transportadores ABC verapamil, ciclosporina A e fumitremorgin C. Inicialmente determinamos o efeito de cada inibidor na viabilidade dos parasitas (CI_{50}), utilizando o mesmo ensaio descrito acima. A seguir, a suscetibilidade a BZ foi determinada na presença de duas concentrações fixas de cada inibidor (doses inferiores à CI_{50}).

3.5 Manutenção de formas epimastigotas de *T. cruzi* – congelamento e descongelamento

O congelamento de formas epimastigotas foi realizado quando as culturas estavam em fase exponencial de crescimento, preparando-se três tubos de criopreservação por cultura. Aproximadamente $2,4 \times 10^8$ células foram centrifugadas a 7000 rpm por 7 minutos e

ressuspensas em 3 ml de meio LIT suplementado com SFB 10% e Dimetilsufóxido (DMSO) 10%. Alíquotas de 1 ml foram distribuídas em tubos de criopreservação e mantidas em nitrogênio líquido. Para descongelar-se determinada cultura, o tubo foi imediatamente mantido a 37 °C por alguns minutos. O estado da cultura foi monitorado em microscópio óptico. Transferiu-se todo seu conteúdo para 10 ml de meio LIT-10% SFB, centrifugou-se a cultura a 7000 rpm por 7 minutos e ressuspendeu-se o sedimento em 2 ml de meio LIT-10% SFB. A cultura foi então mantida em estufa a 28 °C por três dias, e, após este período, se elevou o volume de meio para 10 ml. A partir deste momento, a cultura passou a ser repicada regularmente ao ser atingida a fase exponencial de crescimento.

3.6 Estocagem de formas epimastigotas para extração de DNA/RNA

Para a extração de DNA e RNA total utilizaram-se, respectivamente, 3×10^9 e 5×10^8 formas epimastigotas. Os parasitas foram centrifugados a 7000 rpm por 7 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspendido em 10 ml de meio PBS 1x (*Phosphate Buffer Saline*), seguido de centrifugação a 7000 rpm por 7 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1,5 ml de meio PBS 1x, com nova centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o tubo mantido em gelo seco por 30 minutos, em freezer a -80 °C por 24 horas e então estocado em nitrogênio líquido.

3.6.1 Extração de DNA total de formas epimastigotas

Para a extração de DNA, um sedimento contendo 3×10^9 epimastigotas foi ressuspendido em 10 ml de PBS 1x e 500 µl de Qiagen Proteinase K, proveniente do QIAamp Blood Maxikit (Qiagen). A extração foi conduzida de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA purificadas e eluídas em TE foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.6.2 Extração de RNA total de formas epimastigotas

Todos os materiais e soluções utilizados para a preparação de RNA foram tratados para remover-se RNase. Materiais de vidro foram mantidos em forno a 180 °C por 4 horas e

materiais de plástico foram autoclavados. A água utilizada foi acrescida de dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% final, incubada a 37 °C por 16 horas e autoclavada.

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen). O sedimento de parasitas (5×10^8 células) foi ressuspensionado em 1 ml de Trizol frio e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Um volume de 200 µl de clorofórmio foi adicionado, com incubação por 3 minutos à temperatura ambiente seguido de centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos de 2 a 8 °C. A fase aquosa (contendo o RNA) foi coletada e misturada com 0,5 ml de isopropanol e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugação nas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado. O precipitado de RNA foi lavado com etanol 75% gelado, seguido de nova centrifugação (10000 rpm por 5 minutos). O precipitado foi seco com bomba de vácuo e então ressuspensionado em 35 µl de água tratada com DEPC. Para eliminar a contaminação do RNA com DNA, a amostra foi tratada com 10U de DNase (Promega) por 30 minutos a 37 °C, extraída com fenol, precipitada com etanol e analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.7 Bactérias competentes

Estoques de *Escherichia coli* DH5α (*Bethesda Research Laboratories*) competentes foram preparados de acordo com Sambrook e Russel (2001) e mantidos a -80 °C.

3.8 Clonagem do gene *TcABCG1*

3.8.1 Amplificação do gene

DNA genômico (100 ng) das cepas de *T. cruzi* foi amplificado em um meio reacional (volume final de 25 µl) contendo 0,625 U da enzima *Pfu* DNA polimerase (Fermentas), 2,5 µl do tampão 10x fornecido pelo fabricante, 2 mM de MgSO₄, 200 mM de dNTPs e 4 mM dos iniciadores *TcABCG1*kbF (5'- TCTAGAAATGTCTTGCTGCCGAGC - 3', sítio de restrição para a enzima *Xba*I sublinhado) e *TcABCG1*kbR (5'- CTCGAGCTAAACTTTGTACGCGCG -3', sítio de restrição para a enzima *Xho*I sublinhado). Os iniciadores foram desenhados sobre as regiões que flanqueiam o gene *TcABCG1* da cepa CL Brener (GenBank: Tc00.1047053508231.190). O DNA foi desnaturado por incubação a 95 °C durante 5 minutos. A amplificação foi realizada em equipamento *Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research* em 30 ciclos de três temperaturas: 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1,5 minutos

para anelamento dos iniciadores a 58 °C e 4 minutos de extensão a 72 °C, seguidos de uma extensão final de 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.8.2 Purificação do produto de PCR

Os produtos da amplificação de *TcABCG1* das cepas foram purificados a partir da PCR ou a partir do gel de agarose utilizando-se os kits *PureLink™ PCR Purification Kit* (Invitrogen) ou *HiYield™ Gel/PCR DNA Mini Kit* (Real Biotech), respectivamente. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm.

3.8.3 Adição de adenina ao produto de PCR

DNA polimerases termoestáveis com atividade *proofreading*, tal como a *Pfu* DNA Polimerase, geram fragmentos com pontas cegas ao final da amplificação por PCR. Os fragmentos gerados podem ser modificados utilizando-se um procedimento de ligação de adenina à extremidade 3' destes fragmentos e, assim, permitindo sua ligação ao vetor pGEM-T *Easy*, que possui uma timina em sua extremidade 5'. Utilizamos este método conforme instruções do kit pGEM-T *Easy Vector System* (Promega). Ao realizarmos a clonagem através de vetor-T, não houve a necessidade de proceder-se a desfosforilação do vetor, e obteve-se, assim, baixo índice de vetor religado.

3.8.4 Ligação ao vetor de clonagem

A ligação do gene *TcABCG1* ao vetor pGEM-T *Easy* foi realizada conforme instruções do kit pGEM-T *Easy Vector System* (Promega). As reações foram feitas em 10 µl de volume, contendo até 4 µl de volume de inserto (respeitando-se a proporção inserto:vetor de 3:1), 5 µl de Tampão *Rapid Ligation 2x* e 1 µl da enzima T4 DNA ligase. As reações foram incubadas por 16 horas a 4 °C.

3.8.5 Transformação em bactérias competentes DH5α

Alíquotas de 100 µl de bactérias *E. coli* (cepa DH5α) competentes foram descongeladas do freezer a -80 °C e a cada uma acrescentou-se 4 µl da reação de ligação, seguindo-se de incubação por 20 minutos no gelo. Após este período, os tubos foram incubados a 42 °C por exatamente 50 segundos e recolocados no gelo por mais 2 minutos. A cada tubo acrescentou-se 260 µl de meio SOC e os mesmos foram incubados a 37 °C sob agitação de 150 rpm por 1,5 horas. O volume total da suspensão bacteriana foi então semeado em placas de LB/ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina, previamente tratadas com 50 µl de X-gal 20 mg/ml (USB) e 100 µl de IPTG 100 mM (Gibco). Isso foi feito porque o plasmídeo pGEM-T *Easy* contém o gene da β-galactosidase, e as bactérias transformadas com o plasmídeo selvagem são capazes de degradar a X-gal como substrato e adquirem a cor azul. Se algum gene for inserido no *polylinker* do vetor e rompe o gene da β-galactosidase, as bactérias transformadas perdem a capacidade de degradar a X-gal e ficam brancas. Desta forma, podem-se distinguir por um método visual as colônias que contêm os insertos. Seguiu-se com a incubação das placas por 16-20 horas em estufa a 37 °C para seleção dos clones resistentes ao antibiótico. As colônias brancas foram então selecionadas para análise posterior.

3.8.6 PCR de colônia

Para confirmação e análise dos plasmídeos recombinantes, colônias bacterianas brancas foram inoculadas em 4 ml de meio LB/amp e incubadas a 37 °C durante 16 horas, sob agitação constante de 200 rpm. A presença do inserto nos plasmídeos foi analisada por PCR de colônia. Pequena alíquota de cultura bacteriana (1 µl) foi incubada em um meio reacional (volume final de 15 µl) contendo 0,375 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1,5 µl do tampão 10x fornecido pelo fabricante, 4 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTPs e 4 mM dos iniciadores *TcABCG616F* (5' – ACTTTGAGTCCATCGGATTCCTTG – 3') e *TcABCG616R* (5' – CGGTAAAGACCCACCATCCAGTATA – 3'). Os iniciadores foram desenhados sobre as regiões que flanqueiam uma região de 616 pb, entre as posições 911 e 1527 do gene *TcABCG1* da cepa CL Brener (Tabela 4). O DNA plasmidial foi desnaturado por incubação a 95 °C durante 10 minutos. A amplificação foi realizada em equipamento *Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research* em 30 ciclos de três temperaturas: 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1,5 minutos para anelamento dos iniciadores a 58 °C e 1,5 minutos de

extensão a 72 °C, seguidos de uma extensão final de 9 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.8.7 Purificação de DNA plasmidial

A purificação de DNA plasmidial dos clones recombinantes confirmados pela PCR de colônia foi realizada a partir de 4 ou 250 ml da cultura bacteriana, conforme instruções dos kits *Pureyield Plasmid Miniprep System* ou *Pureyield Plasmid Maxiprep System* (Promega), respectivamente. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio e quantificado por espectrofotometria a 260 nm.

3.9 Sequenciamento do gene *TcABCG1*

A reação de sequenciamento das duas fitas do gene *TcABCG1* clonado em pGEMT-*Easy* foi realizada com o kit *Big Dye Terminator* v.3.1 (Applied Biosystems) conforme protocolo do fabricante, em sequenciador ABI-PRISM® 3100 (IQ-USP). Para o sequenciamento, foram utilizados iniciadores específicos do plasmídeo – T7 e SP6 – e iniciadores desenhados para o gene *TcABCG1*, compostos por pares de iniciadores senso e anti-senso para amplificação de fragmentos de 616 e 492 pb (Tabela 4).

Tabela 3 – Características dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene *TcABCG1*.

Iniciador	Localização	Sequência (5' para 3')	Temperatura de anelamento (°C)
T7	Vetor pGEMT- <i>Easy</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	53
SP6	Vetor pGEMT- <i>Easy</i>	ATTTAGGTGACACTATAG	55
<i>TcABCG616F</i>	911-935 nt ^a (produto 616 pb)	ACTTTGAGTCCATCGGATTCCTTG	53
<i>TcABCG616R</i>	1502-1526 nt ^a (produto 616 pb)	CGG TAAAGACCCACCATCCAGTATA	53
<i>TcABCG492F</i>	509-528 nt ^a (produto 492 pb)	GCTTTTCGCTGCGCGTGAGG	58
<i>TcABCG492R</i>	974-1000 nt ^a (produto 492 pb)	CCTTGGAATTCTGGATCTTGGAGCA	58

^aPosição no gene *TcABCG1*

O DNA plasmidial de cada clone (200 ng) foi incubado em um meio reacional (volume final de 10 µl) contendo 1 µl da solução de Big Dye, 2 µl do tampão 5x fornecido

pelo fabricante e 3,2 μ M dos iniciadores. O DNA foi desnaturado por incubação a 95 °C durante 3 minutos. A amplificação foi realizada em equipamento *Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research* em 35 ciclos de três temperaturas: 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 15 segundos para anelamento dos iniciadores (com temperatura específica para cada *primer* – ver Tabela 4) e 4 minutos de extensão a 60 °C.

As reações de sequenciamento, realizadas em tubos de microcentrífuga, foram transferidas para placa de 96 poços seguidas pela precipitação por glicogênio. Aos 10 μ l de cada reação foram adicionados 17 μ l de *cocktail* de precipitação gelado (etanol 92,5%, NaOAc 100 mM pH 5,2, glicogênio 36 μ g/ml). A placa foi mantida em gelo por 15 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente, descartando-se o excesso de *cocktail* por inversão da placa e um pulso de 1000 rpm com a placa invertida. Adicionou-se 50 μ l de etanol 70% gelado por poço, repetindo-se a centrifugação (10 minutos) e drenagem da placa, conforme descrito anteriormente. A placa foi secada a 95 °C em termociclador por 1 minuto, selada, protegida da luz e mantida a -20 °C até o momento de ser levada aos procedimentos de leitura no sequenciador.

Foram sequenciados no mínimo seis clones de cada cepa. As sequências individuais de cada gene foram montadas pelo programa BioEdit a partir dos *contigs* formados pelas sequências parciais de cada gene específico. O clone 1 de cada cepa foi aquele escolhido para a clonagem no vetor de expressão.

3.10 Transfecção do gene *TcABCG1* em *T. cruzi*

3.10.1 Liberação do gene *TcABCG1* do vetor de clonagem

O gene *TcABCG1* de diferentes cepas, clonado em pGEM-T *Easy*, foi liberado por dupla digestão com as enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I a 37 °C por 16 horas. A reação de digestão foi interrompida pela adição de tampão de amostra e submetida à eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídio. O inserto de DNA foi visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta e a banda foi excisada com bisturi. O DNA foi purificado conforme descrito no item 3.8.2.

3.10.2 Clonagem do gene *TcABCG1* no vetor *pROCKNeo*

O gene *TcABCG1* foi ligado ao vetor *pROCKNeo* (DaRocha et al., 2004), digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI*, na proporção inserto:vetor de 3:1, conforme descrito no item 3.8.4. A transformação de bactérias competentes com o plasmídeo recombinante foi realizada conforme descrito no item 3.8.5. As bactérias foram semeadas em LB/ágar contendo ampicilina. Os plasmídeos recombinantes foram identificados por PCR de colônia (item 3.8.6) e sequenciamento (item 3.9). Para os experimentos de transfecção, 100 µg de DNA plasmidial foram digeridos com 10 µl (unidades não fornecidas pelo fabricante) de *FastDigest NotI* (Fermentas) por 16 horas a 37 °C. O DNA foi purificado por precipitação com isopropanol (Sambrook e Russel, 2001), e quantificado por espectrofotometria a 260 nm.

3.10.3 Transfecções em *T. cruzi*

Para cada transfecção foram utilizadas 2×10^8 formas epimastigotas de CL Brener. Os parasitas foram centrifugados a 7000 rpm por 7 minutos a 4 °C e ressuspensos em 10 ml de PBS 1x estéril. Em seguida, foram novamente centrifugados e ressuspensos em pequeno volume (inferior ao necessário para a eletroporação) de tampão de eletroporação (ver item 3.1), sendo mantidos em gelo. Determinou-se a densidade celular e acrescentou-se volume de tampão de eletroporação necessário para se obter 5×10^8 células/ml. Transferiu-se 0,4 ml da suspensão para cada cubeta de 0,2 cm (BioRad) resfriada em gelo e adicionou-se 50 µg de DNA plasmidial linearizado e purificado (item 3.10.2) em 50 µl de H₂O. Como controle negativo, os parasitas foram incubados com 50 µl de H₂O. Para medir a eficiência de transfecção, uma alíquota de parasitas foi incubada com o plasmídeo pTREXGFP (DaRocha et al., 2004). As amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos e eletroporadas usando o *BioRad Cell Porator*, com 2 pulsos sucessivos de 200V a 250 µF. Os parasitas foram mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos e transferidos para frascos com 10 ml de meio LIT-10% SBF. Nas amostras transfectadas com *pROCKNeo*, 200 µg/ml de neomicina foi adicionado ao meio de cultura. A viabilidade/sobrevivência das células foi monitorada em microscópio de fase imediatamente após eletroporação. Os parasitas foram incubados a 28 °C. A eficiência de transfecção foi monitorada após 24 horas. As culturas foram repicadas periodicamente.

3.11 Southern Blot

Após digestão de 5 µg de DNA com diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs) por 16 horas a 37 °C, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. Após eletroforese, o DNA foi depurinado com HCl 0,2 M por 10 minutos, desnaturado duas vezes com NaOH 0,5 M por 15 minutos, e neutralizado com NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 e EDTA 1 mM por 30 minutos (duas vezes). O DNA foi transferido para membranas de Nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia) em 20x SSC por 16 horas e fixado por exposição à luz UV por 5 minutos e aquecimento a 80 °C por 2 horas. Em seguida, as membranas foram hibridizadas com sondas derivadas dos genes de interesse, marcadas com [α -P³²]dATP.

3.12 Obtenção de sondas radioativas e condições de hibridização

3.12.1 Marcação por *random primer extension*

Para a incorporação de nucleotídeos radioativos, sondas de DNA foram marcadas com [α -P³²]dATP com o kit de marcação de DNA utilizando *random primers* (Invitrogen). O equivalente a 150 ng de DNA foi diluído para um volume apropriado de água e desnaturado em banho fervente por 5 minutos. O tubo contendo o DNA foi transferido para o gelo, adicionando-se em seguida: 20 µM de dTTP, dCTP, dGTP e [α -P³²]dATP (50 µCi), tampão de mistura do *random primer* (Hepes 0,67 mM, Tris-HCl 0,17 mM, MgCl₂ 17 mM, β -mercaptoetanol 33 mM, BSA 1,33 mg/ml, hexanucleotídeos iniciadores 18 DO₂₆₀ unidades/ml, pH 6,8) e 3U de Klenow em volume final de reação de 50 µl. A reação desenvolveu-se à temperatura ambiente por 3 horas e foi interrompida pela adição de tampão de parada (EDTA 0,5 M, pH 8,0). A sonda foi purificada de nucleotídeos não incorporados por passagem em coluna Sephadex G50 (Sambrook e Russel, 2001). Para a medida de incorporação, foi feita contagem em contador de cintilação líquida.

3.12.2 Hibridização de sondas radioativas com ácidos nucléicos imobilizados

As membranas contendo DNA imobilizado foram pré-hibridizadas em forno *HyBaid* a 60 °C por 90 minutos com 10 ml de tampão de hibridização (Ficol 01%, PVP 0,05%, EDTA 1 mM, SSC 3x, SDS 0,1% e DNA de espermatozoides de salmão 100 µg/ml). Esta solução foi

substituída por 10 ml de tampão de hibridização contendo a sonda desnaturada. A hibridização ocorreu por 16 horas a 60 °C.

3.12.3 Lavagem das membranas

Após hibridização, as membranas de Southern Blot foram lavadas sequencialmente a 60 °C nas seguintes condições: 2 lavagens em solução SSC 3x, SDS 0,1% por 15 minutos; e 2 lavagens com solução SSC 1x, SDS 0,1% por 30 minutos. Caso houvesse necessidade de maior estringência de hibridização, as membranas foram lavadas 1 ou 2 vezes com SSC 0,1x, SDS 0,1% por 30 minutos. As imagens provenientes das membranas foram coletadas em *Phosphor Screens* (Kodak), expostas por 24 horas e escaneadas com o aparelho *Storm* (Molecular Dynamics). A análise densitométrica do sinal radioativo foi obtida com o programa *ImageQuant Molecular Dynamics*. As imagens também foram obtidas por exposição de cada membrana a dois *Phosphor Screens* intensificadores (Kodak) em cassetes apropriados (Fuji Film) por 24-72 horas (o tempo de exposição variou conforme a intensidade das bandas observadas na imagem obtida pelo *Storm*) a -80 °C.

3.12.4 Desibridização das membranas

Para reutilização das membranas de Southern Blot, as sondas foram retiradas por lavagem com SSC 0,1x, SDS 0,5 % a 90 °C por 60 minutos. Para verificar a eficiência do processo, as membranas foram expostas a *Phosphor Screens* e reveladas no *Storm*.

3.13 PCR em tempo real para determinação do número de cópias do gene *TcABCG1*

O número de cópias do gene *TcABCG1* foi estimado por PCR em tempo real seguindo abordagens descritas anteriormente (Lee et al., 2008; Schmidt e Parrott, 2001; Song et al., 2002). O plasmídeo pGEM-T contendo o gene *TcABCG1* de CL Brener foi utilizado para construir uma curva padrão representando 10^0 a 10^7 cópias do gene. Os valores de C_T foram plotados contra o logaritmo do número de cópias. Amplificações por PCR em tempo real foram realizadas com 0,1 ng de DNA genômico das cepas. Estas reações foram feitas em paralelo com as reações da curva padrão. Os valores de C_T foram usados para o cálculo do número de cópias do gene. A quantidade de DNA das cepas utilizada nas amplificações foi convertida em número de genomas, utilizando-se o tamanho do genoma de estimado para CL

Brener (110 Mb) (El-Sayed et al., 2005) e a informação de que esta cepa possui duas cópias de *TcABCG1* por genoma diplóide (TriTrypDB, 2011). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.14 RT-PCR em tempo real

Os iniciadores foram desenhados sobre a sequência nucleotídica completa dos genes *TcABCG1* e *TcGAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*, utilizado como gene normalizador), com o auxílio do programa *Primer Express* (Applied Biosystems), que os desenha com as características necessárias para os experimentos de PCR em tempo real. As sequências dos iniciadores que originam produtos de 76 pb são *TcABCG76F* (5'-GTGAACGCAAACGCACAAGTA-3') e *TcABCG76R* (5'-TTGCTGGATGAACCCACCTC-3'); e *TcGAPDH76F* (5'-GACGACACGCCCATGTTTG-3') e *TcGAPDH76R* (5'-ACGAGGCGTTGGAGACGAT-3'). O RNA utilizado nos ensaios foi obtido conforme descrito no item 3.6.2.

3.14.1 PCR convencional

Para averiguar a adequação dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados, realizamos uma PCR convencional com 100 ng de DNA genômico de CL Brener e cada par de iniciadores. Ainda, para comprovar a ausência de DNA contaminante nas amostras de RNA tratadas com DNase, realizamos também uma PCR convencional com RNA de cada cepa e os iniciadores. Neste caso, esperaríamos não obter nenhum produto de amplificação.

Para cada reação, utilizamos amostra de DNA ou RNA, 2,5 mM de mix de dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (específico para cada gene), 1U de *Taq* DNA polimerase (GO Taq) e 5 µl de tampão de reação 5x fornecido pelo kit. A PCR foi realizada nas seguintes condições: 94 °C por 4 minutos; passo 2: 94 °C por 1 minuto; passo 3: 58 °C por 1 minuto; passo 4: 72 °C por 1 minuto. Repetiu-se desde o passo 2 até o passo 4 por 33 vezes. Passo 5: 94 °C por 1 minuto; passo 6: 58 °C por 1 minuto; passo 7: 72 °C por 10 minutos e para finalizar, passo: 4 °C por tempo indeterminado. Para todas as reações foi incluído um controle negativo (sem DNA ou RNA).

3.14.2 Síntese da primeira fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado 5 µg de RNA total tratado com DNase, 1,5 µl de dNTP mix 10 mM, 2 µg de hexâmeros randômicos e o volume da reação foi completado a 19 µl com água. A solução foi aquecida por 5 minutos a 65 °C e imediatamente colocada em gelo. A esta reação foi adicionado 6 µl de tampão 5x; 3 µl de DTT 0,1 M e 1 µl de inibidor de RNase. A amostra foi aquecida por 2 minutos a 42 °C e, após este período, foram adicionadas 20 U de Transcriptase Reversa *Super Script II* (Invitrogen), incubando-se a 25 °C por 10 minutos e 42 °C por 50 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 70 °C por 15 minutos e a amostra foi diluída 4 vezes com água livre de nucleases.

3.14.3 Síntese da segunda fita de cDNA e PCR em tempo real

Para a síntese da segunda fita de cDNA e consequente incorporação do corante *Syber Green*, foram utilizados 6 µl de cDNA simples fita, 2 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (específico para cada gene testado) e 10 µl de *Syber Green*, num volume final de 20 µl. A reação foi desenvolvida no equipamento *Mastercycler Realplex* (Eppendorf), nas seguintes condições: 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos e 68 °C por 20 segundos.

3.14.4 Teste da eficiência de amplificação

Para testar a eficiência dos *primers*, uma série de diluições de 10^0 até 10^7 cópias molares de um plasmídeo contendo o gene alvo ou inserto de GAPDH de *T. cruzi* foram utilizados para construir as curvas-padrão de amplificação. Os valores de C_T (*Cycle Threshold*) foram plotados contra o logaritmo de suas concentrações de cópias iniciais. As curvas-padrão foram geradas para cada *primer* por uma linha de regressão dos pontos plotados no gráfico. A partir da inclinação de cada curva, a eficiência de amplificação de PCR (E) foi calculada (Lee et al. 2008). A eficiência da amplificação dos genes alvo e de referência foi calculada similarmente e utilizada para calcular o ΔC_T .

3.14.5 Análises dos dados

Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os dados foram analisados usando o 7300 System Software (Applied Biosystems) e normalizados para os valores do *housekeeping gene GAPDH*. Para cada amostra foi obtido o C_T , que é definido com o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*. Foi obtida a média dos C_T das triplicatas e seu desvio-padrão.

Uma vez que a expressão do gene é analisada em relação ao controle interno (GAPDH), foi então calculado o ΔC_T , ou seja, a diferença entre as médias do C_T de cada amostra e a média do C_T do controle interno (GAPDH). Posteriormente, foi calculado o $\Delta\Delta C_T$, que consiste na diferença do ΔC_T de cada amostra em relação ao ΔC_T da amostra de referência (cepa CL Brener não transfectada). Os $\Delta\Delta C_T$ encontrados refletem as diferenças de abundância de produto entre os ciclos, mas não refletem diretamente a diferença de produto entre as amostras. Para calcular a razão relativa dos transcritos de cada gene em relação à abundância de transcritos na cepa de referência, foi aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, que parte do princípio de que a cada ciclo da PCR a quantidade de produto dobra, sendo então necessário contemplar que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de $\Delta\Delta C_T$ (Pfaffl, 2001). A análise estatística dos resultados de comparação da abundância de transcritos entre as cepas foi obtida com o programa *Sigma Plot* com os dados de duas réplicas biológicas.

3.15 Identificação e caracterização de genes de *T. cruzi* para transportadores ABC

Genes de CL Brener anotados como *putative ABC transporter* foram identificados no banco de dados TriTrypDB (TriTrypDB, 2011). Genes ABC hipotéticos adicionais foram obtidos por buscas com o programa BLAST P (versão 2.2.25+) (Altschul et al., 1997) no banco de dados do genoma de *T. cruzi* do NCBI (Johnson et al., 2008), utilizando-se como entrada (*query*) sequências da assinatura ABC dos putativos transportadores ABC de *T. cruzi*. As ORFs (*Open Reading Frames*) das sequências resultantes desta busca com *E-value* menores que 10^{-5} foram selecionadas e avaliadas no banco de estruturas de proteínas do NCBI (Wang et al., 2007) pela busca de domínios e motivos do transportador ABC e no banco de dados do programa Pfam (Bateman et al., 2004; Finn et al., 2010) pela confirmação da presença da assinatura ABC em cada sequência. Os dois haplótipos de um mesmo gene (Esmeraldo e Não-Esmeraldo) foram identificados, assim como possíveis genes ortólogos,

através do programa OrthoMCL (Chen et al., 2006; Li et al., 2003), de outras espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania*. A estrutura de cada proteína ABC hipotética, referente à localização cromossômica, localização celular, número e disposição dos domínios, foi analisada com o TriTrypDB e banco de estrutura de proteínas PDB (*Protein Data Bank*) (Berman et al., 2000).

3.16 Análises filogenéticas e classificação dos transportadores ABC de *T. cruzi*

As sequências de aminoácidos dos NBDs de membros ABC hipotéticos de CL Brener e as sequências de um representante de cada uma das subfamílias A a G de humanos (Sheps et al., 2004) e subfamília H de *Leishmania major* (Leprohon et al., 2006) foram alinhadas com o programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994) e submetidas à checagem manual no programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor for Windows) (Hall, 1999). Quando uma proteína ABC completa apresentava dois NBDs, cada domínio foi tratado independentemente nas análises. As genealogias foram determinadas a partir do alinhamento múltiplo montado com a exclusão de regiões com lacunas (*gaps*), contendo principalmente as porções correspondentes às regiões Walker A, Walker B e assinatura ABC.

O alinhamento múltiplo foi utilizado para a reconstrução filogenética utilizando-se o programa PAUP (versão 4.0b10) (Swofford, 2001). A reconstrução foi realizada utilizando-se os métodos de distância (*Neighbor-Joining*, NJ) (Saitou e Nei, 1987) e de máxima parcimônia (descrito por Fitch, 1971), com o algoritmo de busca heurística (por *stepwise addition*, que consiste na adição sequencial de táxons, os quais são inseridos sempre na posição que minimiza o incremento no comprimento da árvore). Para a visualização das árvores geradas foi usado o programa TreeView (versão 1.6.6) desenvolvido por Page (1996).

De acordo com a posição das sequências nos ramos das árvores e sua comparação com a posição das sequências de ABCs humanos (subfamílias A a G) e de *Leishmania major* (subfamília H), as proteínas ABC de *T. cruzi* puderam ser classificadas nas respectivas subfamílias. Para esta finalidade seguiram-se as recomendações da *HUGO Gene Nomenclature Committee* para genes ABC (HUGO, 2011; Ishikawa et al., 2000). A confiabilidade desta classificação foi reforçada pela análise da porcentagem de similaridade entre membros de uma mesma subfamília de *T. cruzi* com representantes de subfamílias das outras duas espécies (*Homo sapiens sapiens* e *L. major*) escolhidas como referência.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da suscetibilidade a BZ em cepas de *T. cruzi*

As características das cepas utilizadas neste estudo são descritas na Tabela 4. A suscetibilidade a BZ foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos e o valor da CI_{50} consta da Tabela 4. Nas seis cepas analisadas, verificamos que a CI_{50} para BZ variou de $13,2 \pm 0,8$ a $58,6 \pm 5,7$ μ M. A suscetibilidade a BZ destas cepas foi previamente determinada em modelos experimentais infectados e tratados (Filardi e Brener, 1987). De acordo com estes autores, as cepas foram classificadas em resistentes (taxas de cura < 33%), parcialmente suscetíveis (taxas de cura 33% a 66%) ou suscetíveis (taxas de cura > 66%). Para efeito de comparação, na Tabela 4 apresentamos a porcentagem de cura descrita por Filardi e Brener (1987).

Tabela 4 – Características de cepas de *T. cruzi* utilizadas no estudo.

Cepa	DTU ^b de <i>T. cruzi</i>	Hospedeiro/Origem	CI_{50}^c BZ (μ M) (média $\pm$ dp) ^d	% de cura ^e
CL Brener ^a	TcVI	<i>T. infestans</i> /Rio Grande do Sul	$13,2 \pm 0,8$	100
Berenice 62	TcII	Humano/Minas Gerais	$14,6 \pm 3,6$	93
VL10	TcII	Humano/Minas Gerais	$30,4 \pm 6,9$	27
Colombiana	TcI	Humano/Colômbia	$58,6 \pm 5,7$	7
YuYu	TcI	<i>T. infestans</i> /Bahia	$40,5 \pm 1,8$	0
Silvio X10 cl1 ^a	TcI	Humano/Pará	$26,1 \pm 2,5$	69

^aAs cepas CL Brener e Silvio X10 cl1 são clones.

^bSegundo a nova nomenclatura (Zingales et al., 2009).

^c CI_{50} : concentração efetiva de BZ que diminui o número de parasitas viáveis em 50%.

^dCada valor representa média e desvio-padrão (dp) de duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes.

^ePorcentagem de cura determinada em modelo experimental (Filardi e Brener, 1987).

A análise dos dados indica haver uma concordância entre o grau de suscetibilidade a BZ determinado *in vitro* para formas epimastigotas (valor da CI_{50}) e o sucesso terapêutico determinado *in vivo*. As três cepas consideradas resistentes por Filardi e Brener (VL10, Colombiana e YuYu) apresentam CI_{50} para BZ que varia de $30,4 \pm 6,9$ e $58,6 \pm 5,7$ μ M. As duas cepas consideradas suscetíveis (CL Brener e Berenice 62) apresentam CI_{50} para BZ da ordem de 14 μ M. Uma possível discrepância refere-se à cepa Silvio, que foi considerada

suscetível por Filardi e Brener (1987) e que em nossos ensaios apresentou um valor de CI_{50} para BZ de $26,1 \pm 2,5 \mu M$ (Tabela 4). Devemos ressaltar, no entanto, que em nosso estudo utilizamos um clone da cepa Silvio (Silvio X10 cl1) que pode ter uma suscetibilidade a BZ diferente da cepa da qual derivou. Desta forma, neste trabalho a cepa Silvio X10 cl1 será considerada resistente a BZ e denominada apenas Silvio.

4.2 Efeito de inibidores de transportadores ABC na suscetibilidade a BZ

A fim de obter evidências adicionais para o envolvimento de transportadores ABC no fenótipo de resistência a BZ em *T. cruzi*, investigamos o efeito de três inibidores conhecidos de transportadores ABC: verapamil, ciclosporina A e fumitremorgin C (revisto por Doyle e Ross, 2003; Ejendal e Hrycyna, 2004; Hiroyuki e Sugiyama, 2007; Qadir et al., 2005; Robey et al., 2008). Na escolha dos inibidores, priorizamos aqueles cuja ação tivesse sido comprovada em diferentes subfamílias de ABC. Verapamil é considerado um inibidor preferencial de ABCB, podendo, porém, também atuar nas subfamílias ABCC e ABCG, que conferem fenótipo de resistência a drogas (Robey et al., 2008). A ciclosporina A é um inibidor preferencial de ABCB e ABCC e não inibe transportadores ABCG (Ejendal e Hrycyna, 2004; Qadir et al., 2005). O efeito inibitório de fumitremorgin C em uma classe de transportadores ABCG de células humanas foi estabelecido (revisto em Kusuhara e Sugiyama, 2007).

Inicialmente determinamos a CI_{50} de cada inibidor (Tabela 5) no crescimento das cepas CL Brener (sensível a BZ) e VL10 (resistente a BZ), utilizando a mesma abordagem experimental empregada para a análise da suscetibilidade a BZ.

Tabela 5 – Efeito de inibidores de transportadores ABC no crescimento de formas epimastigotas da cepa CL Brener e VL10.

Inibidor	$CI_{50} (\mu M)^a$ (média $\pm$ dp) ^b	
	CL Brener	VL10
Verapamil	$32,1 \pm 1,6$	$56,1 \pm 2,3$
Ciclosporina A	$1,1 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,2$

^a CI_{50} : concentração efetiva do composto que diminui o número de parasitas viáveis em 50%.

^bCada valor representa média e desvio-padrão (dp) das duplicatas de pelo menos dois experimentos independentes.

Para fumitremorgin C (FTC) não foi possível determinar a CI_{50} , pois não houve inibição do crescimento das culturas expostas desde 2,5 até 10 μM do composto por 72 horas a 28 °C. Não foi possível aumentar a concentração de FTC em função de sua solubilidade em DMSO. Concentrações maiores levariam a uma dose de DMSO tóxica para os parasitas. Dados da literatura indicam que FTC atua como inibidor de transportadores ABCG humanos em concentrações de até 10 μM (Susanto et al., 2008; Tiwari et al., 2009).

Tabela 6 – Efeito de verapamil na suscetibilidade a BZ (CI_{50}) em cepas de *T. cruzi*.

Cepa	0 μM verapamil	20 μM verapamil ^a		30 μM verapamil ^a	
	CI_{50} BZ (μM)	CI_{50} BZ (μM)	Inibição ^b (%)	CI_{50} BZ (μM)	Inibição ^b (%)
CL Brener	13,2	11,1	16	6,7	51
Berenice 62	9,4	7,6	19	4,6	51
VL10	23,6	19,6	17	11,6	51
Colombiana	50,2	31,2	38	24,0	52

^aConcentrações abaixo da CI_{50} do verapamil.

^bPorcentagem de inibição da CI_{50} de BZ em relação à CI_{50} da cultura controle em ausência de verapamil. Média de dois experimentos independentes.

Em seguida, determinamos o efeito de duas concentrações fixas de verapamil (20 e 30 μM), concentrações abaixo de sua CI_{50} , na suscetibilidade a BZ em quatro cepas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas foram incubadas com diferentes concentrações de BZ, em ausência ou em presença das duas concentrações de verapamil (Tabela 6). Os dados obtidos indicam que na concentração de 30 μM este composto diminui em cerca de 50% a CI_{50} para BZ, aumentando, portanto, a suscetibilidade das cepas a esta droga.

Tabela 7 – Efeito de ciclosporina A na suscetibilidade a BZ (CI_{50}) em cepas de *T. cruzi*.

Cepa	0 μM ciclosporina A	1 μM ciclosporina A ^a	
	CI_{50} BZ (μM)	CI_{50} BZ (μM)	Inibição ^b (%)
VL10	22,9	25,7	2
Colombiana	63,7	62,4	0

^aConcentração abaixo da CI_{50} da ciclosporina A.

^bPorcentagem de inibição da CI_{50} de BZ em relação à CI_{50} da cultura controle em ausência de ciclosporina A. Média de dois experimentos independentes.

O efeito de ciclosporina A no fenótipo de resistência a BZ foi investigado em duas cepas resistentes a BZ, utilizando-se uma concentração fixa do composto (1 μM), abaixo de sua CI_{50} (ver Tabela 5). Na Tabela 7 apresentam-se os resultados obtidos (média de dois

experimentos independentes), que indicam que este composto não tem efeito apreciável na suscetibilidade a BZ de *T. cruzi*.

O efeito de FTC no fenótipo de resistência a BZ foi investigado em CL Brener e VL10, utilizando-se concentrações fixas do composto (1, 5 e 7 μ M). Verificamos que o composto não alterou a suscetibilidade a BZ nas cepas analisadas (dados não mostrados).

4.3 Caracterização do gene do transportador *TcABCG1* de *T. cruzi*

4.3.1 Amplificação da sequência completa do gene *TcABCG1*

Para a amplificação do gene do transportador *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*, desenhamos oligonucleotídeos iniciadores com base na sequência nucleotídica do haplótipo não Esmeraldo de CL Brener (GenBank: Tc00.1047053508231.190). A ORF do gene tem 1998 pb e codifica 665 aminoácidos, o que corresponde a uma proteína de cerca 75 kDa. Na Figura 6 apresentamos a sequência nucleotídica deste gene, indicando a localização dos motivos Walker A, Walker B e assinatura ABC e a posição e sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação. Os iniciadores contêm os sítios de restrição para *Xba*I (iniciador *forward*) e *Xho*I (iniciador *reverse*). A PCR foi realizada com a enzima Pfu DNA polimerase, que possui alta atividade de correção de erros durante o processo de síntese do DNA, e que gera fragmentos com pontas cegas. Os produtos da amplificação de *TcABCG1* foram purificados com o kit *PureLinkTM PCR Purification Kit* (Invitrogen).

O gene *TcABCG1* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de cinco cepas (ver abaixo).

```
TCTAGAATGTCTTGCTGCGAGCGGAGGTGAATGAGCCAGTAAGTCCAGCTCCGCCTCATCATTGGAGT
CTGACGACCAAATCGCGCCGAAGCAGAAGGGTAACGAACCCCAAATCGAAGACTATAGCATCATCGCCCC
CGGATTCTCCATCAAGGGCTCCGTCGCGCAGTTCGACGCTGTGGAACAAAATAAGAGCTCCGTGAGTGGA
CGCTTTTCTATTCCCGTCTCATGGCATAATTTGTCATATTCGGCAAACGGCACGAAAATTCTTTGCGGCC
TCACAGGAACAGCGTTACCATCACGATGCCTTGCTGTGATGGATCCAGCGGTGCGGGCAAGACGACTTT
TCTCAATGCTATCTCTGACCGACTTACAACCTCGCGTACCCTCAAGCTGACAGGGAAACGCCAGCTGGGG
GACTTGGAGTACAAGCGTCATTACCGCAGGATGTTTGGTTTTGTGGCGCAAGACGACATTCTCTCCCCAC
GGGCAACACCCGAAGATTCCCTTCGCTTTTCGCTGCGCGTGAGGCGTGGCACAAGCATAAGTGAAACGAA
TAAATTTGTTGAGGAACTTTGGAGGAATTACGCCTTGTCCACTGCCGCGAGACCATTGTTGGTATCCCT
GGCCTTGCTCTGGTCTTTTCGGGTGGTGAACGCAACGCACAAGTATTGGTGTGGAGCTCATTGCGATC
CTAAAATTCTGTTGCTGGATGAACCCACCTCTGGTCTGGACTCCGTGACATCTGTGAAGATTGTGCATCT
TCTGAATAACATTGCCCGAACTGGCCGCACGGTGATTTACACCATTACCCAGCCCACTGCTGAGACATTG
ACGTACTTTGATGATCTCATGCTTCTACCGGGGGTGCATGTGCTTATCATGGCACGATGGCAAAATCCG
TGGAATACTTTGAGTCCATCGGATTCCCTTGTCCTGAACGATATACGCCAAGCGATTTCTTTATGAAGTT
GCTCCAAGATCCAGAAATTTCCAAGGTAAGTAAATAAGAGCTATCTAAAACATGGTGTGAGA
ACCCACATACAACCGCGGTTGAGCTAAATCCCAATCCCTCCGAGTCTCCACCGCGAAAAATATTGAAA
GCTACCTTGGTAGGTTTGGGAGCACCTCGTGTATCCAATTCCAGGAGCTTTTTCGTCGTTTTTCCATGGA
```



```

TCTCAGTCGGAATCATGTATACATTTTTTTCACATTTTATACAGGCTGCCTTCTTTGCAGTGATTGTGGGT
CTCATATTTCTGAATGTTAAAGATGATTTAGCTGGTATGCAGGATCGCGAGGGAGTTTTTTTCATGGTAA
CGATGAATCGGGCTATGGGGCAGACTTTTATCATGGTCAACTCCTTTATGCAAGATAAGGCCTTGACGT
GCGGGAGCAAATGGTTGGCTCATACTCCCCTTTTATTTTCTTTTATCAAAAACCCTGGTGGAGTTTCCA
ATGCGCGTATTTTTTGCCTTTCTTGAGTGCTGTATTTTATACTGGATGGTGGGTCTTTACCGCCAGGCAG
GAGCTTTTTTTTACTACTTTGCGGTCATCGCGCTGCTTACTGAAGTGGCCTCGGGTCTTGGGTTTGCCAT
TGGTGCCACGTTTAAAAGTTTGGTCGTTGCTTCCGGTACCGCGCCTGTGATTTTGCTACCGCTTGCCATG
GTCGGTGGTCTTTTGGCGAACACAGATCGACTGCATCCGTATTGGTACTGGTTGGAGAAGCCATCCTTTA
TTCGTCAAGGCCTATATTCTTCTTGCCCGCAATGAATTTAAGCATATCGACCACATTCCGGTGTGATGGTAG
AGGCAAACCACCGGGCTTCTGTAAAGATAAGCCCCAAAACGGCGAGGATATCTTGCGCCAACCTGGGTTT
CAGCAGAAGCAATATGAAAAGTGGGTTTGTGGCTAACTCTTGCCCTTTTATATATTGCTTTCCGCGGTT
GGGCCGTTATTTCTTGTACTCTGCCGCGGTACAAAGTTTAGCTCGAG

```

Figura 6 – Sequência nucleotídica completa do gene *TcABCG1* (haplótipo não Esmeraldo de CL Brener). A posição dos iniciadores para a PCR é indicada em amarelo e os sítios para as enzimas de restrição, em cinza. Motivos: Walker A em azul, assinatura ABC em verde e Walker B em vermelho.

4.3.2 Clonagem no vetor *pGEM-T Easy*

O vetor de clonagem *pGEM-T Easy* (Promega) tem um tamanho de 3015 pb e apresenta uma timina protuberante em cada uma de suas extremidades 5'. Para a clonagem do gene *TcABCG1* neste vetor, adicionamos adenina nas extremidades 3' do produto de PCR, seguida de uma reação de ligação com razão molar de 3:1 (inserto:vetor). O DNA dos clones recombinantes, obtidos após transformação de bactérias competentes *E.coli* DH5- α , foi sequenciado.

4.3.3 Análise das sequências do gene *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*

As sequências do gene *TcABCG1* das cepas Berenice 62, Silvio, VL10 e YuYu foram obtidas e comparadas com as sequências dos haplótipos Esmo e Não Esmo de CL Brener por múltiplo alinhamento de sequências pela utilização do CLUSTALW e visualização/edição pelo BioEdit (Figura 7). No BioEdit foram obtidas as sequências de aminoácidos pela ferramenta de tradução de sequências nucleotídicas. As variações alélicas entre as sequências são destacadas (Figura 7).

Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *TcABCG1* de CL Brener haplótipos Esmeraldo e Não Esmeraldo (CL EL e CL NEL, respectivamente), Berenice 62, Silvio, VL10 e YuYu. Os aminoácidos variantes em relação à sequência CL NEL estão realçados em amarelo. As regiões com os motivos conservados estão delimitadas por caixas coloridas: Walker A em azul, assinatura ABC em vermelho e Walker B em verde.

Encontramos 41 variações alélicas entre as sequências nucleotídicas de Esmo e Não Esmo de CL Brener (Figura A.1 no Anexo A). A sequência de aminoácidos do transportador *TcABCG1* de cada cepa foi comparada com a sequência proteica Não Esmo de CL Brener, uma vez que este haplótipo apresentou expressão aumentada na cepa resistente, quando comparada com a cepa sensível nas análises dos dados de microarranjos de DNA (ver Introdução; Moreno Vigo, 2008). Desta forma, verificamos que as sequências proteicas do transportador ABC de Berenice 62 e VL10 são idênticas àquela do haplótipo Esmo de CL

Brener, enquanto que as sequências de aminoácidos de *TcABCG1* de Silvio e YuYu são idênticas entre si, porém, diferenciam-se em 10 mutações não-sinônimas de aminoácidos em relação à sequência Não Esmo de CL Brener. Interessantemente, todas estas mutações encontram-se em regiões consideradas não-conservadas, não sendo encontradas nos motivos Walker A, assinatura ABC e Walker B (Figura 7).

Estas análises determinaram a escolha dos genes *TcABCG1* a serem transfectados em CL Brener (ver item seguinte).

4.4 Transfecção de genes *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi* em CL Brener

4.4.1 Os genes *TcABCG1*

Decidimos transfectar em CL Brener os genes *TcABCG1* das cepas VL10, Silvio e YuYu, consideradas resistentes a BZ (Tabela 4). A cepa VL10 pertence à DTU TcII e o gene codifica uma proteína de sequência idêntica à do haplótipo Esmo de CL Brener. As cepas Silvio e YuYu pertencem à DTU TcI, seus genes *TcABCG1* têm sequências idênticas, e apresentam 10 mutações não-sinônimas de aminoácidos em relação à sequência Não Esmo de CL Brener. Como controle, foi transfectado também o haplótipo Não Esmo de CL Brener.

Figura 8 – Mapa do vetor pROCKGFPNeo (DaRocha et al., 2004). O gene *TcABCG1* foi inserido no lugar do gene da GFP (em azul). O vetor permite a integração do gene a ser expresso no locus da beta-tubulina (em vermelho).

Os genes *TcABCG1* clonados em pGEM-T *Easy* foram liberados do vetor por dupla digestão com *XbaI* e *XhoI*. Após purificação a partir de gel de agarose, os genes foram clonados no vetor pROCKNeo linearizado com as duas enzimas (DaRocha et al., 2004) (Figura 8). Este vetor permite a integração do gene de interesse no locus de tubulina, por recombinação homóloga.

pROCKNeo contém a região promotora do gene ribossômico e também sequências derivadas das regiões flanqueadoras do gene GAPDH de *T. cruzi*, permitindo a expressão constitutiva e a maturação do mRNA do gene clonado em todos os estágios do parasita (DaRocha et al., 2004). Os plasmídeos recombinantes e plasmídeo vazio foram transfectados em CL Brener, conforme descrito em Material e Métodos. Os transfectantes foram selecionados em meio com G418 (neomicina). Nestas culturas, foi avaliada a suscetibilidade a BZ e NFX.

4.4.2 Transfecções em *T. cruzi*

Os vetores pROCKNeo recombinantes com o gene *TcABCG1* das quatro cepas e pROCKNeo não recombinante foram linearizados com *NotI*, purificados e eletroporados na cepa CL Brener. Em cada transfecção, utilizou-se massa de 50 µg de DNA de cada plasmídeo, conforme descrito no item 3.12 de Materiais e Métodos.

No esquema abaixo, resumem-se os pontos experimentais da eletroporação:

- Controle 1: H₂O;
- Controle 2: pTREXGFP contendo o gene da GFP;
- Controle 3: pROCKNeo não recombinante;
- pROCKNeo*TcABCG1* de CL Brener;
- pROCKNeo*TcABCG1* de VL10;
- pROCKNeo*TcABCG1* de Silvio;
- pROCKNeo*TcABCG1* de YuYu.

Após eletroporação, as culturas foram mantidas em meio de seleção contendo 200 µg/ml de G418. A cultura transfectada com pTREXGFP, que contém o gene da GFP, foi utilizada para monitorar a eficiência da eletroporação. Após 24 horas, nesta cultura observamos que 4% dos parasitas apresentavam emissão de luz fluorescente verde. Este resultado indica alta eficiência de transfecção (DaRocha et al., 2004). A seleção dos parasitas

transfectados se completou em 8 semanas, quando ocorreu a morte de todos os parasitas do Controle 1.

4.4.3 Suscetibilidade a BZ e NFX

Nos transfectantes contendo o gene *TcABCG1* e na cepa CL Brener selvagem (*wild type*, WT) foi avaliada a suscetibilidade a BZ e NFX (Tabela 8). Nas culturas de CL Brener transfectadas com pROCKNeo contendo o gene *TcABCG1*, observa-se um aumento da resistência a BZ que varia de 11 a 32%. Os maiores índices de aumento são observados para os genes das cepas Silvio e YuYu, 26 e 32%, respectivamente. A transfecção do haplótipo Não Esmo de CL Brener e do haplótipo Esmo de VL10 causa incremento da resistência à droga da ordem de 10% (Tabela 8).

Tabela 8 – Suscetibilidade a BZ de CL Brener selvagem (WT) e transfectado com o gene *TcABCG1* de diferentes cepas.

Cultura ^a	CI ₅₀ BZ (μM) (média ± dp) ^b	Aumento da CI ₅₀ BZ (%) ^c
CLBr WT	12,7 ± 0,5	-
CLBr + pROCK	13,0 ± 0,4	2%
CLBr + ABC _{CLBr}	14,5 ± 0,2	14%
CLBr + ABC _{Silvio}	16,1 ± 0,4	26%
CLBr + ABC _{VL10}	17,1 ± 0,7	11%
CLBr + ABC _{YuYu}	16,8 ± 0,4	32%

^aOs experimentos foram realizados com formas epimastigotas de CL Brener selvagem (CLBr WT) e dos transfectantes com pROCKNeo vazio ou pROCKNeo contendo o gene *TcABCG1* de diferentes cepas (ver texto).

^bMédia e desvio padrão das duplicatas de dois experimentos independentes.

^cAumento da CI₅₀ para BZ em relação à CI₅₀ de CL Brener WT.

O maior aumento da resistência a BZ nos transfectantes contendo o gene de Silvio e YuYu sugere que as características estruturais do transportador *TcABCG1* das duas cepas resistentes à droga e pertencentes à DTU TcI confirmam maior eficiência no efluxo da droga. Por outro lado, a cepa de CL Brener transfectada com estes genes não atinge os valores de CI₅₀ para BZ (Tabela 4) observados nas cepas Silvio (26,1 ± 2,5 μM) e YuYu (40,5 ± 1,8 μM).

Uma vez que alguns transportadores ABC podem atuar na resistência a múltiplas drogas, decidimos avaliar a suscetibilidade dos transfectantes a NFX (Tabela 9). Verificamos o aumento da resistência a NFX nas culturas transfectadas com os genes de todas as cepas, variando de 27 a 74%. Neste caso, o maior aumento foi observado com a cepa transfectada com o gene de VL10.

Tabela 9 – Suscetibilidade a NFX de CL Brener selvagem (WT) e transfectado com o gene *TcABCG1* de diferentes cepas.

Cultura ^a	CI ₅₀ NFX (média ± dp µM) ^b	Aumento da CI ₅₀ NFX (%) ^c
CLBr WT	6,9 ± 1,1	-
CLBr + pROCK	6,3 ± 0,9	-
CLBr + ABC _{CLBr}	9,3 ± 0,6	34%
CLBr + ABC _{VL10}	12,0 ± 2,3	74%
CLBr + ABC _{Silvio}	8,8 ± 2,0	27%
CLBr + ABC _{YuYu}	9,5 ± 1,5	37%

^aOs experimentos foram realizados com formas epimastigotas de CL Brener selvagem (CLBr WT) e dos transfectantes com pROCKNeo vazio ou pROCKNeo contendo o gene *TcABCG1* de diferentes cepas (ver texto).

^bMédia e desvio padrão das duplicatas de dois experimentos independentes.

^cAumento da CI₅₀ para NFX em relação à CI₅₀ de CL Brener WT.

4.4.4 Localização do gene *TcABCG1* no genoma dos parasitas transfectados

Em estudo inicial, investigamos a localização do gene *TcABCG1* nas culturas transfectadas com o gene de CL Brener e VL10 e com pROCKNeo vazio. O DNA dos transfectantes foi digerido independentemente com *Bam*HI e *Sal*I e submetido à eletroforese em gel de agarose (Figura 9, painel A). Em seguida, o DNA foi transferido para membranas de nylon e hibridizado com sonda de 616 pb derivada do gene *TcABCG1* de CL Brener e com sonda de 435 pb derivada do gene de resistência à neomicina, marcador de pROCKNeo (ver Figura 9). Esta sonda foi obtida conforme descrito em DaRocha et al. (2004).

No Painel B da Figura 9, observa-se que a sonda do gene *TcABCG1* hibridiza com uma banda adicional na amostra transfectada com o gene de CL Brener e digerida com *Bam*HI. Este dado confirma a presença de uma cópia extra do gene. Curiosamente, esta banda não aparece na amostra transfectada com o gene de VL10. Este painel também mostra que a sonda do gene de CL Brener hibridiza mais fracamente com o DNA genômico de Silvio

(WT), quando comparado com a hibridização com CL Brener (WT), confirmando diferenças na sequência nucleotídica do gene nas duas cepas.

Figura 9 – Southern Blot: DNA genômico de CL Brener WT e transfectado com pROCKNeo vazio e pROCKNeo com o *TcABCG1* de CL Brener e VL10, e da cepa Silvío WT, digerido com *Bam*HI e *Sal*I. Painel A: coloração do gel de agarose com brometo de etídio; painel B: hibridização com sonda do gene *TcABCG1*; painel C: hibridização com sonda do gene de resistência a neomicina. À esquerda dos painéis indica-se o tamanho molecular em kb. No painel C, seta indica a posição do gene *TcABCG1*.

Para comprovar a integração do vetor pROCKNeo no genoma dos transfectantes, o DNA das amostras foi hibridizado com sonda derivada do gene de resistência à neomicina (Figura 9, painel C). Os dados indicam que o vetor está presente no genoma de todos os transfectantes. No entanto, o padrão das bandas de hibridização varia nas diferentes culturas, sugerindo que o vetor possa estar integrado em diferentes regiões do genoma de CL Brener. Esta situação foi observada anteriormente (Carlos Renato Machado, comunicação pessoal). Para verificar esta possibilidade, futuramente, as sondas dos genes *TcABCG1* e de resistência a neomicina deverão ser hibridizadas com as bandas cromossômicas dos transfectantes separadas por eletroforese de campo pulsado (PFGE).

Figura 10 – Digestão de DNA genômico com *SacII*. Painei A: Padrão da migração em gel de agarose corado com brometo de etídio. Painei B: Hibridização com sonda de *TcABCG1*. Painei C: Hibridização com sonda do gene de resistência à neomicina. À esquerda dos painéis indica-se o tamanho molecular em kb.

A localização do gene *TcABCG1* nas culturas transfectadas com o gene de CL Brener, VL10, YuYu e Silvio foi investigada por Southern Blot após digestão do DNA com a enzima *SacII* (Figura 10). No painel A mostra-se o padrão da coloração do DNA com brometo de etídio, que indica que a amostra referente à transfecção com o gene de VL10 contém 76% da massa de DNA que as outras amostras. As amostras foram hibridizadas com uma sonda para o gene *TcABCG1* constituída pela mistura dos produtos de amplificação (616 pb) do gene de CL Brener e de Silvio, isto porque a sonda de CL Brener hibridiza fracamente com o DNA de

Silvio (ver Figura 9). No painel B da Figura 10 observa-se que o padrão de hibridização da sonda do gene ABC é o mesmo para todas as amostras. No entanto, o sinal de hibridização é mais fraco na amostra de CL Brener não transfectado (WT), além da amostra transfectada com o gene de VL10, pelo motivo exposto acima. Esta observação sugere que nas amostras transfectadas com os genes ABC de CL Brener, Silvio e YuYu o número de cópias do gene seja maior.

Após remoção da sonda do gene ABC, a membrana foi hibridizada com sonda do gene de resistência à neomicina (Figura 10, painel C). Uma banda de hibridização foi verificada nas quatro culturas transfectadas (com os genes de CL Brener, VL10, Silvio e YuYu). Entretanto, na amostra transfectada com o gene de VL10 a banda de hibridização apresenta um tamanho molecular diferente das demais, reforçando a hipótese de que o vetor pROCKNeo contendo o gene de VL10 tenha se integrado num locus diferente.

Tabela 10 – Sinal de hibridização da sonda do gene ABC a partir de dados do Southern Blot^a.

DNA ^a	Banda 1 ^b (Kpxls)	Banda 2 ^b (Kpxls)	Banda 3 ^b (Kpxls)	Total ^c (Kpxls)	Total corrigido (Kpxls) ^d	Abundância relativa de <i>TcABCG1</i> ^e
CLBr WT	136,0	153,4	112,2	401,6	401,6	1,00
CLBr + ABC _{CLBr}	146,3	258,1	220,3	624,7	624,7	1,55
CLBr + ABC _{VL10}	130,9	113,6	60,5	305,0	536,8	1,37
CLBr + ABC _{Silvio}	175,2	256,6	448,7	880,5	880,5	2,19
CLBr + ABC _{YuYu}	178,7	283,0	469,6	931,3	913,3	2,27

^aDados extraídos do Southern da Figura 10, Painel B.

^bBanda 1, alto peso molecular; Banda 2, peso molecular intermediário; Banda 3, menor peso molecular. ^cSomatória do sinal de hibridização das três bandas.

^dSomatória do sinal de hibridização das três bandas, corrigido pela massa de DNA aplicada no gel.

^eAbundância relativa do gene ABC foi calculada atribuindo ao valor de pixels totais de CL Brener WT, o valor unitário.

O sinal de hibridização da sonda do gene ABC (Painel B da Figura 10) foi determinado para cada uma das três bandas de hibridização das amostras. O cálculo foi realizado a partir do número de pixels capturado pelo programa ImageJ 1.44 (ImageJ, 2004), a partir da imagem gerada pela exposição ao Storm. Na Tabela 10 mostra-se o valor do sinal de cada banda, a somatória do sinal e a somatória do sinal corrigida pela massa de DNA aplicada na membrana. A partir deste valor, estimamos a abundância relativa do gene *TcABCG1* nas amostras (Tabela 10). Os dados sugerem que nas amostras transfectadas com os genes de

Silvio e YuYu haja o dobro de genes presentes em CL Brener WT. Nas culturas transfectadas com o gene de CL Brener e VL10 haveria, respectivamente, 1,55 e 1,37 vezes maior conteúdo gênico. Ressalta-se que esta estimativa é preliminar e estudos posteriores deverão ser conduzidos para sua comprovação.

4.4.5 Abundância de transcritos de *TcABCG1* nas culturas transfectadas

A abundância relativa dos transcritos do gene *TcABCG1* foi determinada por RT-PCR em tempo real, a partir de amostras de RNA total tratado com DNase. Para comprovar a ausência de DNA contaminante nas amostras, realizamos uma PCR convencional com os iniciadores específicos para o gene ABC. Nenhum produto de amplificação foi obtido.

Nos ensaios de RT-PCR em tempo real utilizamos, para todas as amostras, uma massa de 200 ng de cDNA (ver Material e Métodos). As amostras foram amplificadas com iniciadores específicos do gene ABC e de GAPDH de *T. cruzi* (este *housekeeping gene* foi utilizado como gene normalizador). Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. Os dados foram analisados conforme descrito em Materiais e Métodos, e são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Razão da abundância relativa de transcritos de *TcABCG1*. Análise por RT-PCR em tempo real.

Cepa	Abundância relativa de transcritos de <i>TcABCG1</i>
CLBr WT	1,00
CLBr + pROCK	0,80
CLBr + ABC _{CLBr}	2,70
CLBr + ABC _{VL10}	1,12
CLBr + ABC _{Silvio}	2,85
CLBr + ABC _{YuYu}	2,67

Observamos uma maior razão na abundância relativa de transcritos de *TcABCG1* nas culturas de CL Brener transfectadas com o gene ABC de CL Brener (2,70), Silvio (2,85) e YuYu (2,67). O valor da abundância de transcritos da cultura transfectada com o gene ABC de VL10 foi menor (1,12), próximo ao valor obtido para as culturas de CL Brener WT (1,00) e CL Brener transfectada com o vetor vazio (0,80). Este resultado sugere que o gene de VL10

tenha se integrado no genoma de CL Brener no locus do gene ABC original, por recombinação homóloga. Esta hipótese deverá ser confirmada por hibridização das bandas cromossômicas, conforme explicitado acima.

4.4.6 Quantificação da razão de abundância do gene *TcABCG1* em cepas selvagens

Levantamos a possibilidade de as diferenças na suscetibilidade das cepas a BZ (Tabela 4) serem ocasionadas pelo aumento do número de cópias do gene *TcABCG1*. Desta forma, estimamos a abundância deste gene no genoma das cepas em ensaios de PCR em tempo real (ver Material e Métodos). A curva padrão representando 10^0 a 10^7 cópias do gene foi construída utilizando-se o plasmídeo pGEM-T *Easy* contendo o gene ABC de CL Brener. As duas curvas padrão foram lineares ($R^2 > 0,999$) (Figura 11).

Figura 11 – PCR em Tempo Real para estimar o número de cópias do gene *TcABCG1* a partir de massa conhecida de DNA de cinco cepas. As duas retas do gráfico foram obtidas por duplicatas de diluições seriadas do plasmídeo pGEMTcABCG1 (de 10^0 a 10^7 cópias).

^aOs pontos coloridos do gráfico representam o *Cycle Threshold* em relação ao log do número de cópias obtido com 0,1 ng de DNA genômico de cada cepa.

Em paralelo, foi amplificado 0,1 ng de DNA de cada cepa. Para efeito de cálculo, a quantidade de genomas contida nesta massa foi calculada a partir do tamanho do genoma estimado para CL Brener (110 Mb) (El-Sayed et al., 2005) e a informação de que esta cepa possui duas cópias de *TcABCG1* por genoma diplóide (TriTrypDB, 2011). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas. Na Tabela 12 resumem-se os dados obtidos.

Tabela 12 – Estimativa da abundância do gene *TcABCG1* por PCR em tempo real.

Cepa	Abundância do gene <i>TcABCG1</i>	Abundância relativa do número de cópias do <i>TcABCG1</i>
CL Brener	1,87	1,00
115	1,52	0,81
VL10	2,84	1,52
Colombiana	3,05	1,63
YuYu	2,22	1,18

O valor de abundância do gene *TcABCG1* encontrado para a cepa referência CL Brener (1,87 cópias) foi bem próximo ao valor esperado de 2 de cópias do gene presentes no genoma desta cepa. A abundância relativa do número de cópias do gene *TcABCG1* das cepas foi calculado em relação ao número de cópias do gene de CL Brener, atribuindo-lhe valor unitário (Tabela 12). Verificamos haver pequena variação numérica que não apóia a hipótese de que o aumento da resistência a BZ seja resultante do aumento do número de cópias do gene do transportador ABC.

4.5 Caracterização de proteínas ABC de *T. cruzi*

4.5.1 Identificação de proteínas ABC no genoma de CL Brener

Numa primeira etapa, foram selecionados os genes de CL Brener anotados no banco de dados TriTrypDB como *putative ABC transporter*. Identificamos 42 genes. Em seguida, outros genes ABC hipotéticos foram identificados por buscas com o programa BLAST P utilizando-se, como entrada, algumas sequências da assinatura ABC de transportadores de *T. cruzi* previamente anotados. A sequência da assinatura ABC é específica dos transportadores ABC e os distingue das demais proteínas ligantes de ATP. Com este procedimento, o número de transportadores ABC hipotéticos subiu para 58 (Tabela 13 e Tabela A.1 no Anexo A). Este número representa 0,23% do número total de genes anotados em *T. cruzi* (~ 25.000) (El-Sayed et al., 2005).

Tabela 13 – Características dos transportadores ABC de *T. cruzi* identificados no genoma de CL Brener.

(continua)

Código de acesso do gene	Subfamília	Haplótipo ^a	Cromossomo ^b	Topologia ^c	Pseudogene
Tc00.1047053510149.80	A	EL	36	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053506989.30	A	NEL	36	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053504881.50	A	EL	7	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053510045.20	A	NEL	7	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053503573.9	A	NEL	27	TMD-NBD	
Tc00.1047053504149.20	A	EL	27	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053507099.80	A	EL	14	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053511725.80	A	NEL	35	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053503749.60	B	EL	35	NBD	
Tc00.1047053511021.70	B	NEL	35	TMD-NBD	
Tc00.1047053511537.8	B	EL	35	TMD-NBD	
Tc00.1047053507093.260	B	EL	39	TMD-NBD	
Tc00.1047053510885.70	B	NEL	6	NBD	
Tc00.1047053506529.160	B	EL	6	NBD	
Tc00.1047053510785.10	B	NEL	-	NBD	
Tc00.1047053506619.90	B	NEL	23	NBD	
Tc00.1047053508809.30	B	EL	23	NBD	
Tc00.1047053506817.20	B	NEL	35	TMD-NBD	
Tc00.1047053507105.70	B	EL	35	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053509007.99	B	EL	31	NBD	sim
Tc00.1047053511385.120	B	NEL	31	NBD	
Tc00.1047053510231.29	C	EL	34	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053506559.100	C	NEL	34	(TMD-NBD) ₂	
Tc00.1047053447255.29	C	EL	34	NBD	
Tc00.1047053508965.14	C	NEL	31	TMD-NBD	
Tc00.1047053507079.30	C	EL	31	NBD	
Tc00.1047053457101.30	C	-	-	NBD	
Tc00.1047053506417.83	C	EL	-	NBD	sim
Tc00.1047053506417.10	C	EL	-	NBD	sim
Tc00.1047053510431.150	D	EL	39	TMD-NBD	
Tc00.1047053506925.530	D	EL	39	TMD-NBD	
Tc00.1047053508927.20	D	EL	31	TMD-NBD	
Tc00.1047053509237.30	D	NEL	31	TMD-NBD	
Tc00.1047053464879.9	E	NEL	10	NBD-NBD	
Tc00.1047053508637.150	E	NEL	10	NBD-NBD	
Tc00.1047053511913.9	E	NEL	10	NBD	sim
Tc00.1047053504867.20	F	EL	36	NBD-NBD	
Tc00.1047053510943.80	F	NEL	36	NBD-NBD	
Tc00.1047053508897.30	F	NEL	40	NBD-NBD	
Tc00.1047053509105.130	F	NEL	37	NBD-NBD	
Tc00.1047053506249.70	G	NEL	37	NBD-TMD	
Tc00.1047053508231.190	G	EL	37	NBD-TMD	

Tabela 13 – Características dos transportadores ABC de *T. cruzi* identificados no genoma de CL Brener

(conclusão)

Código de acesso do gene	Subfamília	Haplótipo ^a	Cromossomo ^b	Topologia ^c	Pseudogene
Tc00.1047053506579.10	G	EL	7	NBD-TMD	
Tc00.1047053507241.39	G	NEL	7	NBD	
Tc00.1047053506457.149	G	EL	10	NBD	
Tc00.1047053509693.190	G	NEL	10	NBD-TMD	
Tc00.1047053507951.280	G	NEL	36	NBD-TMD	
Tc00.1047053507681.100	G	NEL	4	NBD-TMD	
Tc00.1047053503593.60	G	EL	39	NBD-TMD	
Tc00.1047053506127.120	G	EL	39	NBD-TMD	
Tc00.1047053504425.70	G	EL	22	NBD-TMD	
Tc00.1047053509331.200	G	NEL	22	NBD-TMD	
Tc00.1047053509617.80	H	NEL	36	NBD	
Tc00.1047053509669.30	H	EL	36	NBD	
Tc00.1047053510381.20	H	EL	27	NBD	
Tc00.1047053506905.40	H	NEL	27	NBD	
Tc00.1047053511501.30	H	NEL	37	NBD-NBD	
Tc00.1047053511753.100	H	EL	32	NBD	

^aHaplótipos do tipo Esmeraldo (EL) ou Não-Esmeraldo (NEL).

^bLocalização cromossomal.

^cOrdem dos domínios NBD e TMD.

4.5.2 Genes alelos e ortólogos

A partir de informações do TriTrypDB, verificamos que dentre os 58 transportadores ABCs de *T. cruzi*, 36 possuem um alelo identificado, confirmando a presença de 18 pares de alelos de transportadores ABC (Tabela 13). Por outro lado, 22 haplótipos não foram encontrados, sugerindo erros na montagem do genoma de CL Brener ou até mesmo perda gênica.

O programa OrthoMCL foi utilizado para a busca de genes ABC ortólogos aos de *T. cruzi* nas espécies *L. braziliense*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *T. brucei*, *T. gambiense*, *T. congolense* e *T. vivax*. Dos 58 genes de *T. cruzi*, encontramos 74% (43/58) de genes ortólogos no genoma de *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*; e 60% (35/58) de genes ortólogos no genoma de *T. brucei*, *T. congolense*, *T. brucei gambiense* e *T. vivax*.

4.5.3 Localização cromossômica dos transportadores ABC de *T. cruzi*

A localização cromossômica de 54 proteínas ABC putativas foi identificada a partir de informações do TriTrypDB (Tabela 13). Na Figura 12 compilamos sua distribuição nos 41 cromossomos de CL Brener, previamente descritos (Wethearly et al., 2009). Observa-se que os genes ABC distribuem-se em 16 cromossomos, sendo que o gene *TcABCG1* localiza-se no cromossomo 37. Os cromossomos 7, 10, 27, 31, 35, 36, 37 e 39 apresentam uma maior abundância de genes ABC (quatro ou mais genes).

Figura 12 – Representação esquemática dos 41 cromossomos de CL Brener e localização de famílias gênicas. A localização e número das proteínas ABC hipotéticas são indicadas. Destaca-se a localização do gene *TcABCG1*.

Fonte: compilada por Weatherly et al., 2009.

4.5.4 Análise da estrutura das proteínas ABC hipotéticas

A estrutura de cada proteína ABC hipotética, no que se refere à presença, disposição e número dos domínios NBDs e TMDs foi analisada a partir de dados do TriTrypDB e banco de

estrutura de proteínas PDB (Berman et al., 2000). Os dados são compilados na Tabela 13. Conforme descrito na Introdução (ver Figura 3, extraída de Sauvage et al., 2009), as proteínas ABC que apresentam dois TMDs e dois NBDs (TMD-NBD)₂ são consideradas transportadores completos (*full-size transporters*), ao passo que meio-transportadores (*half-size transporters*) são constituídos por um único NBD fusionado com um único TMD. A localização N- ou C-terminal desses domínios determina a organização estrutural da proteína, sendo representada por TMD–NBD ou NBD–TMD.

Verificamos ainda que das 58 ORFs identificadas, 36 (62%) apresentam motivos transmembrana, podendo estar localizadas na membrana plasmática ou na membrana de organelas. Não apresentam domínio transmembranar 22 ORFs (38%), podendo estar localizadas no citoplasma (Figura 13).

Figura 13 – Localização celular putativa das proteínas ABC de *T. cruzi*.

4.5.5 Análises filogenéticas e classificação dos transportadores ABC de *T. cruzi*

A metodologia utilizada para as análises filogenéticas dos transportadores ABC de *T. cruzi* seguiu as abordagens de Leprohon et al. (2006), Sheps et al. (2004) e Sauvage et al. (2009).

Com base na informação relativa às 58 sequências proteicas dos transportadores ABC hipotéticos de CL Brener, extraímos as sequências correspondentes aos motivos Walker A, Walker B e assinatura ABC dos NBDs. Os dois NBDs de transportadores completos (*full-size transporters*) foram tratados independentemente nos alinhamentos, e estão identificados pelas letras minúsculas “a” e “b” logo após o conjunto de letras que identifica as sequências, na Figura 14. Sequências de um representante de cada uma das subfamílias A-G (de humanos) e H (de *L. major*, visto que não há esta subfamília em humanos) foram incorporadas à análise para a definição de cada subfamília.

A partir do múltiplo alinhamento foi gerada árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining* (Figura 14). A árvore resultante permite a visualização de agrupamentos

distintos das subfamílias. Os transportadores ABC das subfamílias A, D, E, F, G e H formam grupos monofiléticos, ao passo que transportadores ABCB e ABCC formam grupos parafiléticos. Desta forma, o critério para classificação dos transportadores dentro das subfamílias B e C, baseado apenas em filogenia, não é suficiente para a classificação destes transportadores em subfamílias distintas.

Figura 14 – Árvore de transportadores ABC de *T. cruzi* gerada pelo método *neighbor-joining*. As sequências de aminoácidos de NBDs das proteínas de *T. cruzi* (indicadas com a letra T) foram alinhadas com NBDs de um representante de cada subfamília ABC (A-G) de humanos (indicadas com a letra H) e de um membro da subfamília H de *Leishmania* (indicado com a letra L). Os cinco primeiros algarismos do código no Genbank de cada ABC (Tabela 13) foram escolhidos para a nomenclatura dos táxons. Os NBDs de transportadores completos foram tratados independentemente nas análises, e identificados com as letras “a” e “b”. A distância relativa dos ramos medida pelo método de distância de Saitou e Nei é representada na parte inferior da figura.

De acordo com a posição das sequências nos ramos das árvores e sua comparação com a posição das sequências de ABCs humanos e de *L. major*, os transportadores ABC de *T. cruzi* foram avaliados com relação à porcentagem de similaridade com estas sequências de referência e finalmente classificados em subfamílias segundo as recomendações da *HUGO Gene Nomenclature Committee* para genes ABC (Tabela 13). Concluímos a seguinte distribuição das subfamílias de CL Brener (Figura 15): A (14%), B (21%), C (10%), D (7%), E (3%), F (7%), G (21%) e H (10%).

Figura 15 – Subfamílias de transportadores ABC de *T. cruzi* (n amostral = 58).

5 DISCUSSÃO

5.1 Suscetibilidade a BZ e o efeito de inibidores de transportadores ABC

O grau de suscetibilidade a BZ determinado em nosso trabalho *in vitro* para formas epimastigotas (valor da CI_{50}) teve concordância com o sucesso terapêutico *in vivo* determinado por Filardi e Brener (1987). As três cepas consideradas pelos autores como resistentes em modelos murinos (VL10, Colombiana e YuYu), apresentaram valores de CI_{50} para BZ maiores que aqueles das duas cepas consideradas suscetíveis (CL Brener e Berenice 62). Para o clone Silvio, os dados, aparentemente, são discrepantes, mas a possível justificativa para este fato foi apresentada em Resultados. Em nosso trabalho, a cepa Silvio X10 cl1 foi considerada resistente a BZ, e abreviada como Silvio.

Os três estágios do ciclo evolutivo de *T. cruzi* têm sido usados em testes *in vitro* de suscetibilidade a drogas. Apesar de a forma amastigota intracelular ser considerada o estágio mais consistente para medidas da atividade de compostos tripanocidas *in vivo*, dados da literatura indicam uma forte correlação qualitativa entre a atividade destes compostos em formas epimastigotas de determinada cepa e em camundongos infectados com a mesma cepa (Urbina, 2009). Vale ressaltar, no entanto, que foram relatadas diferenças de algumas ordens de grandeza entre os valores de CI_{50} para formas epimastigotas e amastigotas.

Moreno e colaboradores constataram que ensaios *in vitro* com BZ não predizem o sucesso terapêutico com esta droga em pacientes tratados (Moreno et al., 2010). A busca pela melhoria do tratamento etiológico, utilizando-se como ferramenta testes de suscetibilidade *in vitro*, ainda permanece um desafio. A crítica mais pertinente de alguns especialistas contra o uso das formas epimastigotas em testes *in vitro* seria o fato de que estas formas não são infectivas para o hospedeiro humano e sua suscetibilidade a BZ não refletiria a suscetibilidade dos outros estágios (tripomastigotas e amastigotas) no homem. Por outro lado, dados do nosso grupo e de outros reforçam a hipótese de que o sucesso terapêutico dependa da interação entre três fatores principais: a suscetibilidade do parasita à droga tripanocida, o acesso da droga e seu acúmulo em diferentes ambientes celulares e teciduais, e a resposta imune do hospedeiro. Estes parâmetros dependem de investigações mais aprofundadas para o entendimento da atividade tripanocida de BZ e o desenvolvimento racional de novos compostos contra a doença de Chagas.

Em função de dados preliminares de nosso grupo, que apontam o possível envolvimento de um transportador ABC da subfamília G (*TcABCG1*) no fenótipo de

resistência a BZ (Moreno Vigo, 2008), no presente trabalho analisamos o efeito de inibidores de transportadores ABC na reversão desse fenótipo. Priorizamos os inibidores cuja ação foi previamente comprovada em diferentes subfamílias de ABC de outros organismos (revisto por Doyle e Ross, 2003; Ejendal e Hrycyna, 2004; Hiroyuki e Sugiyama, 2007; Qadir et al., 2005; Robey et al., 2008).

Dos três inibidores ensaiados: verapamil, ciclosporina A e fumitremorgin C, apenas verapamil diminuiu a CI_{50} para BZ, aumentando, portanto, a sensibilidade a esta droga. Este efeito foi observado em cepas suscetíveis e resistentes BZ e foi dependente da concentração de verapamil utilizada (20 e 30 μ M, Tabela 6). A ação do verapamil na modulação da atividade de efluxo de drogas mediada por transportadores ABC de *Leishmania* foi investigada por vários autores. A resistência à pentamidina, importante leishmanicida, pôde ser revertida pelo uso de concentrações não tóxicas de verapamil em promastigotas de *L. mexicana* (Basselin et al., 2002) e em formas intracelulares de três espécies de *Leishmania* (Coelho et al., 2003, 2007). A combinação de pentamidina e concentração fixa de verapamil aumentou a suscetibilidade de amastigotas à pentamidina em *L. major* (15 μ M de verapamil), *L. amazonensis* (15 μ M de verapamil) e *L. infantum* (20 μ M de verapamil) em 37%, 59% e 53%, respectivamente (Coelho et al., 2007). Este efeito é análogo àquele por nós determinado para cepas de *T. cruzi*.

Assim como observado no presente estudo para *T. cruzi*, a ciclosporina A não atua no fenótipo de resistência a drogas em *Leishmania* (Coelho et al., 2003, 2007), apesar de sua ação moduladora ter sido documentada em *Cryptosporidium parvum* (Bonafonte et al., 2004), *Plasmodium falciparum* (Galvigan et al., 2007) e *Toxoplasma gondii* (Sauvage et al., 2004), dentre outros parasitas.

Em *Leishmania*, o efeito de fumitremorgin C não foi investigado. A subfamília G dos transportadores ABC apresenta cinco membros (ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, e ABCG8). Apenas para os transportadores ABCG2, dos quais a BCRP (*breast cancer resistance protein*) é o transportador mais estudado, a atividade inibitória de fumitremorgin C está bem documentada (revisto em Hiroyuki e Sugiyama, 2007). Em nossas análises de similaridade da sequência de aminoácidos do transportador *TcABCG1* com transportadores ABC dos cinco membros da subfamília G de *Homo sapiens*, *L. major* e *L. infantum* (Tabela 2 da Introdução), verificamos que o transportador de *T. cruzi* apresenta uma similaridade de cerca 57-60% com o transportador ABCG2 de *Leishmania* e uma similaridade 29% com o transportador ABCG2 de humanos. O fato de fumitremorgin C não ter aumentado a suscetibilidade a BZ em *T. cruzi* não afasta a hipótese de que um transportador da subfamília

G esteja envolvido na resistência a esta droga. Desta forma, inibidores específicos para transportadores ABCG de protozoários deverão ser buscados.

5.2 Cópias do gene *TcABCG1* em cepas de *T. cruzi*

Em espécies de *Leishmania*, cuja resistência a metotrexato foi induzida por pressão seletiva com a droga, foi observada o aumento da amplificação do gene de um transportador ABC (*pgpA*), no DNA extracromossômico (Ouellette et al., 1990). Nós investigamos a possibilidade de haver maior amplificação do gene *TcABCG1* em cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a BZ (VL10, YuYu e Colombiana). Utilizando ensaios de PCR em tempo real, concluímos não haver diferenças na abundância relativa do número de cópias do gene nas cepas sensíveis e resistentes à droga.

5.3 Estrutura do gene *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi*

O gene *TcABCG1* das cepas Berenice 62, Silvio, VL10 e YuYu foi clonado e sua sequência comparada com a dos haplótipos Esmo e Não Esmo de CL Brener. Inicialmente observamos 41 variações nucleotídicas entre os dois haplótipos de CL Brener (Figura A.1 no Anexo A), das quais 28 originam o mesmo aminoácido (mutações sinônimas); 6 promovem alteração do aminoácido, mas manutenção de sua polaridade e 7, alteração do aminoácido e de sua polaridade. Verificamos que o transportador de Berenice 62 e VL10 (ambas DTU TcII) tem sequência proteica idêntica àquela codificada pelo haplótipo Esmo de CL Brener, embora o gene das duas cepas apresente três mutações sinônimas. A identidade de aminoácidos do gene de VL10 e Berenice 62 com a do haplótipo Esmo de CL Brener é condizente com a origem evolutiva de CL Brener (TcVI) que seria um híbrido de cepas TcII e TcIII. Por sua vez, TcIII seria um híbrido de TcI e TcII, segundo vários autores (Elias et al., 2005; Ienne et al., 2010; Sturm e Campbell, 2010).

As sequências proteicas de *TcABCG1* das cepas Silvio e YuYu (DTU TcI) são idênticas e diferenciam-se em 10 variações não-sinônimas de aminoácidos em relação à sequência Não Esmo de CL Brener. Este resultado é interessante e apoiaria a hipótese de que TcI seria um ancestral de TcIII que, por sua vez, seria ancestral de CL Brener. Sabe-se que um único SNP é capaz de alterar a funcionalidade do transportador ABCG2 (Morisaki et al., 2005; Yanase et al, 2006). Em nosso laboratório, em seu projeto de mestrado, Jaques Franco de Carvalho Júnior está analisando a sequência do gene *TcABCG1* de várias cepas,

representantes das diversas DTUs, para possível identificação de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e inferências filogenéticas.

A localização do gene *TcABCG1* foi avaliada por Southern Blot de DNA genômico das cepas 115, Berenice 62, CL Brener, Colombiana, VL10 e YuYu digerido com *HindIII* e hibridizado com a sonda do gene ABC. Estruturalmente, o gene localiza-se em diferentes contextos no genoma destas cepas. Há um padrão distinto da estrutura do gene ABC entre os genomas dos pares CL Brener-115, Berenice-VL10 e Colombiana-YuYu (Figura A.2 no Anexo A).

5.4 Transfecção do gene *TcABCG1* de cepas de *T. cruzi* e análise da suscetibilidade a BZ e NFX

A superexpressão de transportadores ABC por transfecção gênica tem sido obtida com sucesso em *T. cruzi* (Torres et al., 2004) e em espécies de *Leishmania* (Coelho et al., 2003; Do Monte-Neto et al., 2011; Leprohon et al., 2009).

Em base à análise da sequência proteica do transportador ABC das cepas, decidimos transfectar em CL Brener o gene *TcABCG1* de três cepas resistentes a BZ: VL10 (TcII), Silvio (TcI) e YuYu (TcI). Transfectamos ainda o haplótipo Não Esmo de CL Brener a fim de comparar o efeito da transfecção com o gene de VL10 (haplótipo Esmo) e o vetor vazio. Todas as culturas transfectadas tiveram igual taxa de crescimento em meio contendo 200 µg/ml de G418. Nas culturas transfectadas com o gene das cepas Silvio e YuYu observamos um aumento da resistência a BZ de 26 e 32%, respectivamente, ao passo que nas culturas transfectadas com o haplótipo Não Esmo de CL Brener e gene de VL10 o aumento foi de cerca 10%. Na transfecção com pROCK vazio o aumento foi de 2%. O maior aumento da resistência a BZ promovido pelos genes das duas cepas da DTU TcI pode ser resultante de suas características estruturais (ver acima). Por outro lado, a transfecção do gene dessas cepas não promove o nível de resistência a BZ verificado nas cepas de origem. De fato, a análise dos dados de suscetibilidade a BZ das cepas (Tabela 4) mostra que a cepa Silvio e YuYu têm uma CI_{50} que é de 2 e 3 vezes maior, respectivamente, que a CI_{50} de CL Brener. Tendo em vista que transportadores da subfamília G necessitam dimerizar-se para exercer sua função, é possível que o transportador *TcABCG1* de cepas TcI sofra uma dimerização parcial ou “híbrida” (TcI-CL Brener) no citoplasma de CL Brener. O fato de o gene *TcABCG1* de TcI não promover em CL Brener o nível de resistência a BZ observado nas cepas TcI apoia a hipótese de que este transportador não seja o único elemento envolvido na resistência à droga.

O fato de o gene de VL10 promover um aumento de resistência a BZ de apenas 10% foi intrigante. Desta forma, analisamos a localização do gene *TcABCG1* no genoma dos parasitas transfectados. O conjunto dos dados de Southern blot sugeriu que nos parasitas transfectados o gene de VL10 teria se integrado em um locus diferente do locus onde os demais genes haviam se integrado. Uma possibilidade seria que este gene tenha se integrado no locus do gene *TcABCG1* de CL Brener, substituindo-o.

Para verificar se uma ou ambas as cópias do gene de CL Brener haviam sido substituídas, clonamos o gene *TcABCG1* da cultura transfectada com o gene de VL10 (dados não mostrados). Dos 8 clones sequenciados, verificamos que 3 clones apresentavam a sequência de VL10, 3 clones, do haplótipo Não Esmo de CL Brener e 2 clones, do haplótipo Esmo. Estes resultados indicam que as três cópias gênicas estariam presentes no genoma de CL Brener transfectado. Isto também ocorreria na cepa transfectada com o haplótipo Não Esmo de CL Brener. O fato de as cepas transfectadas com o gene de VL10 e de CL Brener terem um aumento de 10% da CI_{50} para BZ, menor que o aumento verificado com o gene das cepas TcI, fala a favor de diferenças nas características estruturais dos transportadores ABC desta DTU. Estudos adicionais deverão ser realizados para o melhor entendimento do local de integração dos genes, como a análise de sua localização cromossômica por PFGE.

Nos transfectantes também verificamos aumento da CI_{50} para NFX. Isto seria sugestivo de o transportador ABC também promover o efluxo de outra droga nitro-heterocíclica. Este aspecto também deverá ser explorado futuramente. Por outro lado, não temos explicação para o fato de o gene de VL10 promover um incremento da CI_{50} para NFX muito maior em relação àquele promovido pelos genes das outras cepas.

5.5 Abundância de transcritos de *TcABCG1* nos transfectantes

A abundância relativa de transcritos do gene ABC foi avaliada por RT-PCR em tempo real nas cepas transfectadas. Atribuindo o valor unitário para a abundância de transcritos na cepa CL Brener não transfectada, verificamos que nas culturas transfectadas com os genes de CL Brener, Silvio e YuYu houve um incremento de transcritos de 2,70; 2,85; e 2,67 vezes. Na cultura transfectada com o gene de VL10 a abundância de transcritos teve um valor próximo ao valor obtido para as culturas de CL Brener WT e transfectada com o vetor vazio. Esta observação reforça a hipótese que neste transfectante o gene esteja numa região diferente do genoma, quando comparado com os demais genes transfectados.

Analisando-se a abundância relativa dos transcritos do gene ABC nos transfectantes, observa-se que não ultrapassam o valor de 3. Em diversos trabalhos, onde microarranjos de DNA foram utilizados para avaliar a expressão gênica em tripanossomatídeos, raramente a razão de hibridização do cDNA entre estágios evolutivos ou cepas ultrapassa o valor de 3 (ver por exemplo Baptista et al., 2004; Minning et al., 2003). Esta característica reflete o mecanismo de controle da expressão gênica dos Kinetoplastida, nos quais as ORFs estão dispostas em arranjos policistrônicos longos e mRNAs monocistrônicos são originados por processamento pós-transcricional (revisto em Clayton e Shapira, 2007). A estabilidade dos transcritos está relacionada, preferencialmente, ao tipo de sequências localizadas na região 3'-UTR (revisto em Clayton e Shapira, 2007). Em nosso estudo, transfectamos apenas as ORFs do gene ABC das cepas. É possível que as UTRs dos genes de cada cepa tenham características específicas que lhes confiram maior estabilidade e, desta forma, sua abundância e tradução sejam superiores nas cepas originais. Este aspecto também deverá ser explorado. Outra possibilidade é a de utilizar para a transfecção vetores que não se integram no genoma do parasita e que promovam expressão transitória do gene de interesse.

5.6 Filogenia de transportadores ABC de *T. cruzi*

No presente trabalho identificamos, caracterizamos e classificamos 58 genes de CL Brener codificadores de proteínas ABC hipotéticas. Nas análises filogenéticas, os transportadores ABC das subfamílias A, D, E, F, G e H formaram grupos monofiléticos. Em nossa árvore construída pelo método de *neighbor-joining* (Figura 14), os membros da subfamília G, dentre os quais se encontram o *TcABCG1*, formaram um clado bem definido e seguramente separado dos demais clados. Por outro lado, os transportadores ABCB e ABCC ficaram reunidos no mesmo agrupamento. Neste caso, a filogenia avaliada a partir de sequências de aminoácidos entre os membros ABCB e ABCC de *T. cruzi* e membros ABCB e ABCC de humanos precisaria ser aprimorada para separar estes transportadores em grupos monofiléticos distintos.

Foi interessante verificar o número relativamente elevado de transportadores ABC (58) no genoma de *T. cruzi*, em comparação com os 48 ABC presentes no genoma humano (Dean e Anillo, 2005), evidenciando sua importância no organismo deste protozoário. Transportadores das subfamílias B, C e G, sabidamente relacionados à resistência a multidrogas, compõem 52% do total de ABC encontrados. Um maior estudo sobre outros

membros especificamente pertencentes a estas três subfamílias certamente elucidará ainda mais os mecanismos de transporte de drogas por transportadores ABC.

As análises filogenéticas deverão ser mais aprofundadas através de filogenia usando análise Bayesina (MrBayes) e análise de rede (Network) em colaboração com a professora Renata Carmona e Ferreira (Departamento de Microbiologia e Imunologia/UNIFESP). Pretendemos contribuir com a identificação e a anotação completa no Genbank de todos os transportadores ABC presentes organismo da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Estas informações, juntamente com o estudo da função de transportadores ABC, poderão futuramente fornecer novas informações sobre o papel destes transportadores na biologia do parasita e na resistência a drogas.

5.7 Perspectivas

Na continuidade do projeto, um fator importante de regulação que certamente deverá ser explorado refere-se ao efeito das modificações pós-traducionais da proteína do transportador *TcABCG1* em sua função e eficiência de transporte. Verificamos, em nossas análises, sítios de modificações pós-traducionais na sequência de aminoácidos da proteína ABC de CL Brener, VL10, Silvio e YuYu, como sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina, de glicosilação, de acetilação e de metilação (Figura A.3 no Anexo A). Alguns sítios de fosforilação diferenciam as sequências em relação à cepa referência (haplótipo Não-Esmo de CL Brener) e tais modificações poderiam estar ligadas a alterações na atividade de transporte de drogas por estas proteínas.

Nas duas últimas décadas, a divulgação de diferentes alelos relacionados à resistência a drogas tem impactado a epidemiologia de várias doenças parasitárias, alterando as opções de tratamento. Um estudo extenso realizado no oeste africano, mostrou que a falha terapêutica no tratamento da malária com cloroquina é determinado pela presença de um alelo de um transportador ABC de *Plasmodium falciparum* (*pfcr1*), no qual há uma substituição de lisina por treonina no códon de posição 76 (Gavigan et al., 2007). O nível de resistência é também modulado por outro transportador, codificado pelo gene *pfmdr1*, onde uma mutação promove o aparecimento de tirosina no códon 86 (revisto em Conway, 2007). Em face à resistência a cloroquina, o tratamento da malária com drogas de nova geração tem sido adotado em vários países africanos, como a combinação entre sulfadoxina e pirimetamina (revisto em Conway, 2007).

Várias drogas tripanocidas estão em desenvolvimento com resultados promissores, tais como inibidores da síntese de hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, de bisfosfonatos e do ergosterol. Alguns compostos encontram-se em testes pré-clínicos e seu potencial no desenvolvimento clínico é esperado de médio a longo prazo (10-15 anos) (revisto em Urbina, 2009). A razão para o desenvolvimento relativamente lento de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas deve-se claramente à falta de incentivos econômicos para a pesquisa por novos medicamentos nos laboratórios e em indústrias farmacêuticas investigacionais. No início da década de 2000, o custo estimado para a introdução de uma nova droga no mercado farmacêutico era de aproximadamente 800 milhões de dólares (Preziosi, 2004), e dados mais recentes colocam este valor acima de um bilhão (revisto em Pronker et al., 2011) (Figura 16). A busca de maior apoio para a pesquisa básica sobre os mecanismos de resistência a drogas e para a investigação de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas, em particular, e de doenças negligenciadas, em geral, é de fundamental importância.

Figura 16 – Investimento cumulativo para obter-se uma nova droga. Todos os custos excluem investimentos em vacinas. O gráfico não mostra uma tendência. São apresentados três custos e cálculos de riscos independentes (extraído de Pronker et al., 2011).

Os dados apresentados neste trabalho apoiam a hipótese de que o transportador *TcABCG1* seja um dos elementos envolvidos na resistência a drogas nitro-heterocíclicas. Um

estudo mais abrangente sobre a presença de variações alélicas entre cepas sensíveis e resistentes, localização e abundância celular do transportador está em andamento em nosso laboratório. Estes dados poderão ser utilizados para a identificação de cepas resistentes ao tratamento com as duas drogas disponíveis. O mapeamento recente de genes de resistência a drogas em populações de *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* fornece uma perspectiva otimista para estudos de análise de polimorfismos genéticos e detecção de alelos gênicos, que poderão ser utilizados como potentes ferramentas no diagnóstico diferencial em pacientes infectados. A escolha do tratamento mais indicado para cada paciente poderá ser facilitada pela identificação do tipo populacional do parasita infectante, cujos mecanismos de resistência a uma determinada droga possuem grande variação até mesmo entre populações da mesma espécie.

REFERÊNCIAS¹

- Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferriolli Filho F, Luquetti AO. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Nov-Dec;86(6):624-6.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402.
- Azoles E1224 & Biomarker (Chagas), 2011. Available from: <http://www.dndi.org/portfolio/azoles-e1224-and-biomarker.html> [2011 Sep 5].
- Baptista CS, Vencio RZ, Abdala S, Valadares MP, Martins C, de Braganca Pereira CA, et al. DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Dec;138(2):183-94.
- Barrett MP, Fairlamb AH. The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes. *Parasitol Today.* 1999 Apr;15(4):136-40.
- 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 Dec;46(12):3731-8.
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, et al. The Pfam protein families database, 2004. Available from: <http://pfam.sanger.ac.uk/> [2011 Sep 5].
- Benaïm G, Sanders JM, Garcia-Marchan Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem.* 2006 Feb 9;49(3):892-9.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank, 2000. Available from: <http://www.pdb.org> [2011 Sep 5].
- Bonafonte MT, Romagnoli PA, McNair N, Shaw AP, Scanlon M, Leitch GJ, et al. *Cryptosporidium parvum*: effect of multi-drug reversing agents on the expression and function of ATP-binding cassette transporters. *Exp Parasitol.* 2004 Mar-Apr;106(3-4):126-34.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:347-82.
- Cancado JR. Etiological treatment of chronic Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001 May-Jun;43(3):173-81.

¹ International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- 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*. 2007 Jun;64(5):1141-53.
- Castanys-Munoz E, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Oct;52(10):3573-9.
- Castellani O, Ribeiro LV, Fernandes JF. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J Protozool*. 1967 Aug;14(3):447-51.
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006 Aug;25(8):471-9.
- CDC's Division of Parasitic Disiases and Malaria (DPDM), 2010. Available from: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm> [2011 Sep 5].
- Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and *Leishmanias*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Dec;156(2):93-101.
- Chen F, Mackey AJ, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS. OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D363-8.
- 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 Aug;60(2):195-208.
- 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 Aug 31;130(2):83-90.
- Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Aug;51(8):3030-2.
- Coelho AC, Gentil LG, da Silveira JF, Cotrim PC. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Exp Parasitol*. 2008 Sep;120(1):98-102.
- Conway DJ. Molecular epidemiology of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):188-204.
- Corrales M, Cardozo R, Segura MA, Urbina JA, Basombrio MA. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr;49(4):1556-60.
- Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jan;97(1):3-24.

- Dallagiovanna B, Castanys S, Gamarro F. *Trypanosoma cruzi*: sequence of the ATP-binding site of a P-glycoprotein gene. *Exp Parasitol*. 1994 Aug;79(1):63-7.
- Dallagiovanna B, Gamarro F, Castanys S. Molecular characterization of a P-glycoprotein-related tcpgp2 gene in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Jan;75(2):145-57.
- DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res*. 2004 Jan;92(2):113-20.
- De Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996 Nov 23;348(9039):1407-13.
- De Diego JA, Palau MT, Gamallo C, Penin P. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health*. 1998 Mar;3(3):222-33.
- De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, Teixeira SM, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006 Mar;2(3):e24.
- De Souza EM, Araujo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM, et al. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res*. 2003 Nov;314(2):223-35.
- De Souza EM, da Silva PB, Nefertiti AS, Ismail MA, Arafa RK, Tao B, et al. Trypanocidal activity and selectivity in vitro of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2011 Feb;127(2):429-35.
- De Toranzo EG, Castro JA. Reaction of 4-hydroxynonenal with some thiol-containing radioprotective agents or their active metabolites. *Free Radic Biol Med*. 1994 Dec;17(6):605-7.
- Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:123-42.
- Dias JC. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saude Publica*. 2000;16 (Suppl 2):43-59.
- Dias JC. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Jul-Aug;39(4):370-5.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15665-70.
- Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7340-58.

Ejendal KF, Hrycyna CA. Differential sensitivities of the human ATP-binding cassette transporters ABCG2 and P-glycoprotein to cyclosporin A. *Mol Pharmacol*. 2005 Mar;67(3):902-11.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):409-15.

Elias MC, Vargas N, Tomazi L, Pedroso A, Zingales B, Schenkman S, et al. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Apr;140(2):221-7.

Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000 Oct;6(4):861-71.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):755-9.

Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(Database issue):D211-22.

Floeter-Winter LM, Souto RP, Stolf BS, Zingales B, Buck GA. *Trypanosoma cruzi*: can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker for speciation? *Exp Parasitol*. 1997 Jul;86(3):232-4.

Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell*. 1989 Jun 16;57(6):921-30.

Gavigan CS, Shen M, Machado SG, Bell A. Influence of the *Plasmodium falciparum* P-glycoprotein homologue 1 (pfmdr1 gene product) on the antimalarial action of cyclosporin. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Feb;59(2):197-203.

Germann UA. P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer*. 1996 Jun;32A(6):927-44.

Gorla N, Diaz Gomez MI, Castro JA. Interaction of benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1986 Mar;280(1):22-31.

Gueiros-Filho FJ, Viola JP, Gomes FC, Farina M, Lins U, Bertho AL, et al. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* mdrl gene. *Exp Parasitol*. 1995 Dec;81(4):480-90.

Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; 41:95-98.

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 Jun;12(6):2855-65.

Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Oct;11(10):918-26.

Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):749-57.

HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) [homepage on internet]. Department of Biology, University College London, Wolfson House, 4 Stephenson Way, London NW1 2HE, UK. Available from: <http://www.genenames.org/genefamilies/ABC>. [2011 Sep 4].

Ienne S, Pedroso A, Carmona EFR, Briones MR, Zingales B. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infect Genet Evol*. 2010 Jul;10(5):601-6.

ImageJ - Image Processing and Analysis in Java from National Institutes of Health., 2004. Available from: <http://imagej.nih.gov/ij> [2011 Sep 5].

Imai Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. Estrone and 17beta-estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Jpn J Cancer Res*. 2002 Mar;93(3):231-5.

Ishikawa T, Allikmets R, Dean M, Higgins C, Ling V and Wain HM. New nomenclature of human ABC transporter genes Xenobiotics, Metabolism and Disposition. 2000. Available from: <http://www.genenames.org/genefamilies/ABC> [2011 Sep 5].

Kusuhara H, Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch*. 2007 Feb;453(5):735-44.

Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, et al. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*. 1987 Nov 27;238(4831):1283-5.

Lage H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Sep;22(3):188-99.

Lee JH, Uhl JR, Cockerill FR, 3rd, Weaver AL, Orvidas LJ. Real-time PCR vs standard culture detection of group A beta-hemolytic streptococci at various anatomic sites in tonsillectomy patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008 Nov;134(11):1177-81.

Leprohon P, Legare D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell*. 2006 Oct;5(10):1713-25.

Leprohon P, Legare D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, et al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res*. 2009 Apr;37(5):1387-99.

Li L, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 2003 Sep;13(9):2178-89.

Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, & Madden T.L. NCBI BLAST: a better web interface, 2008. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [2011 Sep 5].

Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Oct;55(1-2):147-53.

Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther.* 2006 Sep;17(9):898-908.

Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science.* 1987 Feb 20;235(4791):899-901.

Masana M, de Toranzo EG, Rubio M, Castro JA. Effect of benznidazole on the mixed function oxygenase system from rat liver microsomes. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1985 Jul;276(1):4-11.

Matovu E, Seebeck T, Enyaru JC, Kaminsky R. Drug resistance in *Trypanosoma brucei* spp., the causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle. *Microbes Infect.* 2001 Jul;3(9):763-70.

Mejia AM, Triana O. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. *Biomedica.* 2005 Mar;25(1):76-86.

Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 1978 Apr 27;272(5656):819-21.

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology.* 2009 Oct;136(12):1509-28.

Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003 Sep;131(1):55-64.

Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Jul;98(5):577-91.

Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Nov;77(11):6810-4.

Moreno Vigo M. Microarranjos de DNA para análise da expressão gênica em cepas de *Trypanosoma cruzi* suscetíveis e resistentes a benznidazol. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008. Disponível em:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-31032009-104038/pt-br.php> [2011 set 2].

Moreno M, D'Avila D A, Silva MN, Galvao LM, Macedo AM, Chiari E, et al. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010 Nov;105(7):918-24.

Morisaki K, Robey RW, Ozvegy-Laczka C, Honjo Y, Polgar O, Steadman K, et al. Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. Cancer Chemother Pharmacol. 2005 Aug;56(2):161-72.

Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. Mol Biochem Parasitol. 1998 Jun 1;93(2):203-14.

Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2006 Apr;146(2):151-62.

Nogueira FB, Krieger MA, Nirde P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. Acta Trop. 2006 Nov;100(1-2):119-32.

Nogueira Silva JJ, Pavanelli WR, Gutierrez FR, Alves Lima FC, Ferreira da Silva AB, Santana Silva J, et al. Complexation of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole improves solubility and efficacy. J Med Chem. 2008 Jul 24;51(14):4104-14.

Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci. 1996 Aug;12(4):357-8.

Pinazo MJ, Canas E, Elizalde JI, Garcia M, Gascon J, Gimeno F, et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. Gastroenterol Hepatol. 2010 Mar;33(3):191-200.

Preziosi P. Science, pharmacoeconomics and ethics in drug R&D: a sustainable future scenario? Nat Rev Drug Discov. 2004 Jun;3(6):521-6.

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 Apr;9(4):1027-33.

Ouellette M, Legare D, Haimeur A, Grondin K, Roy G, Brochu C, et al. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. Drug Resist Updat. 1998 Mar;1(1):43-8.

- Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. EMBO J. 1992 Oct;11(10):3601-8.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.
- Pronker ES, Weenen TC, Commandeur HR, Osterhaus AD, Claassen HJ. The gold industry standard for risk and cost of drug and vaccine development revisited. Vaccine. 2011. 29(35):5846-9.
- Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM, Williamson NA, Greco WR, Minderman H, et al. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. Clin Cancer Res. 2005 Mar 15;11(6):2320-6.
- Raaflaub J. The bioavailability of orally administered drugs with special regard to the liver as a filter for foreign matter. Schweiz Med Wochenschr. 1980 Mar 8;110(10):354-62.
- Rassi Jr. A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402.
- Robey RW, Shukla S, Finley EM, Oldham RK, Barnett D, Ambudkar SV, et al. Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1((R)). Biochem Pharmacol. 2008 Mar 15;75(6):1302-12.
- Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, et al. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. EMBO J. 2001 Oct 15;20(20):5615-25.
- Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. J Natl Cancer Inst. 1999 Mar 3;91(5):429-33.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987 Jul;4(4):406-25.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Sauvage V, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM, Millot JM. P-glycoprotein inhibitors modulate accumulation and efflux of xenobiotics in extra and intracellular *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. 2004 Mar;134(1):89-95.
- Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. Mol Biochem Parasitol. 2009 Oct;167(2):81-94.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102(Suppl 1):75-85.

- Shigeta J, Katayama K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. BCRP/ABCG2 confers anticancer drug resistance without covalent dimerization. *Cancer Sci.* 2010 Aug;101(8):1813-21.
- Silber AM, Tonelli RR, Lopes CG, Cunha-e-Silva N, Torrecilhas AC, Schumacher RI, et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2009 Nov;168(1):102-8.
- Sosa-Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Oct;59(4):526-9.
- Sosa-Estani S, Dri L, Touris C, Abalde S, Dell'arciprete A, Braunstein J. Vectorial and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Las Lomitas, Formosa. *Medicina (B Aires).* 2009;69(4):424-30.
- Scheffer GL, Maliepaard M, Pijnenborg AC, van Gastelen MA, de Jong MC, Schroeijers AB, et al. Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res.* 2000 May 15;60(10):2589-93.
- Shahi SK, Krauth-Siegel RL, Clayton CE. Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* 2002 Mar;43(5):1129-38.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Dec 20;83(2):141-52.
- Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug;115(1-2):35-43.
- Susanto J, Lin YH, Chen YN, Shen CR, Yan YT, Tsai ST, et al. Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. *PLoS One.* 2008;3(12):e4023.
- Swofford DL, Waddell PJ, Huelsenbeck JP, Foster PG, Lewis PO, Rogers JS. Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Syst Biol.* 2001 Aug;50(4):525-39.
- Temperton NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Oct 30;96(1-2):167-76.
- Tibayrenc M, Breniere SF. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988 Nov;83(Suppl 1):249-55.
- Tibayrenc M. Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III.* 1995 Jan;318(1):135-9.

Toledo MJ, de Lana M, Carneiro CM, Bahia MT, Machado-Coelho GL, Veloso VM, et al. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp Parasitol*. 2002 Mar;100(3):161-72.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.

Tiwari AK, Souza RP, Muller DJ. Pharmacogenetics of anxiolytic drugs. *J Neural Transm*. 2009 Jun;116(6):667-77.

Torres C, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol*. 2004 Nov;54(3):632-46.

Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, et al. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Jan;21(1):39-48.

TriTrypDB, Kinetoplastid Genomics Resource from EuPathDB Genomes and Data Types, 2011. Available from: <http://tritrypdb.org/tritrypdb/> [2011 Sep 5].

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 2003 Nov;19(11):495-501.

Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(Suppl 1):311-8.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*. 2010 Jul-Aug;115(1-2):55-68.

Viotti R, Vigliano C, Armenti A. A risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2489.

Wagner-Souza K, Echevarria-Lima J, Rodrigues LA, Reis M, Rumjanek VM. Resistance to thapsigargin-induced intracellular calcium mobilization in a multidrug resistant tumour cell line. *Mol Cell Biochem*. 2003 Oct;252(1-2):109-16.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. 1982;1(8):945-51.

Wang Y, Address KJ, Chen J, Geer LY, He J, He S, Lu S, Madej T, Marchler-Bauer A, Thiessen PA, Zhang N, Bryant SH. MMDB: annotating protein sequences with Entrez's 3D-structure database, 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/> [2011 Sep 5].

Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*. 2009;10:255.

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5022-7.

Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1989 Jun 9;244(4909):1184-6.

Workman EM, Alun Jones V, Wilson AJ, Hunter JO. Diet in the management of Crohn's disease. *Hum Nutr Appl Nutr*. 1984 Dec;38(6):469-73.

Yanase K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein-therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Lett*. 2006 Mar 8;234(1):73-80.

Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Medecins Sans Frontieres. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(7):e488.

Xie Y, Xu K, Linn DE, Yang X, Guo Z, Shimelis H, et al. The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2008 Feb 8;283(6):3349-56.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(Suppl 1):159-64.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104(7):1051-4.

Figura A.1 – Estrutura secundária da proteína TcABCG1 do haplótipo Não-Esmo de CL Brener. A proteína tem 665 aminoácidos e apresenta 41 variantes em relação à proteína TcABCG1 do haplótipo Esmo de CL Brener. Dentre as 41 variações de aminoácidos: 28 originam o mesmo aminoácido (mutações sinônimas); 6 promovem alteração do aminoácido, mas manutenção de sua polaridade; 7 promovem alteração do aminoácido e de sua polaridade (neste caso, em 6 variantes há mudanças de apolar para polar neutro e vice-versa).

Figura A.2 – Southern Blotting de DNA genômico de seis cepas de *T. cruzi* digerido com *Hind*III e hibridizado com a sonda *TcABCG1* de 616 pb marcada com P^{32} . O primeiro painel mostra o padrão de coloração do DNA com brometo de etídio, e o segundo mostra o sinal de hibridização da membrana após exposição de 24 horas em Phosphor Image. À esquerda do primeiro painel indica-se o tamanho molecular em kb.

Tabela A.1 – Genes de transportadores ABC de *T. cruzi* alelos e ortólogos a espécies de *Leishmania* e tripanossomas africanos.

(continua)

Código do gene	Subfamília	Alelo <i>T. cruzi</i>	Ortólogo <i>L. braziliense</i>	Ortólogo <i>L. infantum</i>	Ortólogo <i>L. major</i>	Ortólogo <i>L. mexicana</i>	Ortólogo <i>T. brucei</i>	Ortólogo <i>T. gambiense</i>	Ortólogo <i>T. congolense</i>	Ortólogo <i>T. vivax</i>
Tc00.104705351 0149.80	A	Tc00.104705350 6989.30	LbrM29_V2.06 30	LinJ29_V3.06 40	LmjF29.062 0	LmxM08_29.0 620	Tb927.3.373 0	Tbg972.3.4040	TcIL3000.3.24 20	não tem
Tc00.104705350 6989.30	A	Tc00.104705351 0149.80	LbrM29_V2.06 30	LinJ29_V3.06 40	LmjF29.062 0	LmxM08_29.0 620	Tb927.3.373 0	Tbg972.3.4040	TcIL3000.3.24 20	não tem
Tc00.104705350 4881.50	A	Tc00.104705351 0045.20	LbrM15_V2.08 20	LinJ15_V3.08 00	LmjF15.076 0	LmxM15.0760	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.104705351 0045.20	A	Tc00.104705350 4881.50	LbrM15_V2.08 20	LinJ15_V3.08 00	LmjF15.076 0	LmxM15.0760	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.104705350 3573.9	A	Tc00.104705350 4149.20	LbrM11_V2.10 00	LinJ11_V3.12 10	LmjF11.122 0	LmxM11.1240	Tb11.02.395 0	Tbg972.11.688 0	TcIL3000.11.6 660	não tem
Tc00.104705350 4149.20	A	Tc00.104705350 3573.9	LbrM11_V2.10 00	LinJ11_V3.12 10	LmjF11.122 0	LmxM11.1240	Tb11.02.395 0	Tbg972.11.688 0	TcIL3000.11.6 660	não tem
Tc00.104705350 7099.80	A	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.104705351 1725.80	A	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.104705350 3749.60	B	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.104705351 1021.70	B	não tem	LbrM32_V2.33 80	LinJ32_V3.32 80	LmjF32.308 0	LmxM31.3080	Tb11.01.870 0	Tbg972.11.191 10	TcIL3000.11.1 6840	TvY486_1 117940
Tc00.104705351 1537.8	B	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.104705350 7093.260	B	não tem	LbrM25_V2.04 80	LinJ25_V3.05 40	LmjF25.053 0	LmxM25.0530	Tb11.03.054 0	Tbg972.11.510	TcIL3000.11.5 00	TvY486_1 100360
Tc00.104705351 0885.70	B	Tc00.104705350 6529.160	LbrM12_V2.08 70	LinJ12_V3.07 90	LmjF12.119 0	LmxM12.1190	Tb927.1.442 0	Tbg972.1.2960	TcIL3000.0.30 940	TvY486_0 101960
Tc00.104705350 6529.160	B	Tc00.104705351 0885.70	LbrM12_V2.08 70	LinJ12_V3.07 90	LmjF12.119 0	LmxM12.1190	Tb927.1.442 0	Tbg972.1.2960	TcIL3000.0.30 940	TvY486_0 101960
Tc00.104705351 0785.10	B	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.104705350 6619.90	B	Tc00.104705350 8809.30	LbrM33_V2.33 20	LinJ33_V3.32 00	LmjF33.304 0	LmxM32.3040	Tb927.2.541 0	Tbg.972.2.382 0	TcIL3000.2.14 40	TvY486_0 201750

Tabela A.1 – Genes de transportadores ABC de *T. cruzi* alelos e ortólogos a espécies de *Leishmania* e tripanossomas africanos.

(continuação)

Código do gene	Subfamília	Alelo <i>T. cruzi</i>	Ortólogo <i>L. braziliense</i>	Ortólogo <i>L. infantum</i>	Ortólogo <i>L. major</i>	Ortólogo <i>L. mexicana</i>	Ortólogo <i>T. brucei</i>	Ortólogo <i>T. gambiense</i>	Ortólogo <i>T. congolense</i>	Ortólogo <i>T. vivax</i>
Tc00.1047053508809.30	B	Tc00.1047053506619.90	LbrM33_V2.3320	LinJ33_V3.3200	LmjF33.3040	LmxM32.3040	Tb927.2.5410	Tbg.972.2.3820	TcIL3000.2.1440	TvY486_0201750
Tc00.1047053506817.20	B	Tc00.1047053507105.70	LbrM33_V2.3540	LinJ33_V3.3410	LmjF33.3260	LmxM32.3260	Tb927.2.6130	Tbg.972.2.4280	não tem	não tem
Tc00.1047053507105.70	B	Tc00.1047053506817.20	LbrM33_V2.3540	LinJ33_V3.3410	LmjF33.3260	LmxM32.3260	Tb927.2.6130	Tbg.972.2.4280	não tem	não tem
Tc00.1047053509007.99	B	Tc00.1047053511385.120	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.1047053511385.120	B	Tc00.1047053509007.99	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.1047053510231.29	C	Tc00.1047053506559.100	não tem	não tem	não tem	não tem	Tb927.4.2510	Tbg972.4.2470	TcIL3000.0.08390	TvY486_0402420
Tc00.1047053506559.100	C	Tc00.1047053510231.29	não tem	não tem	não tem	não tem	Tb927.4.2510	Tbg972.4.2470	TcIL3000.0.08390	TvY486_0402420
Tc00.1047053447255.29	C	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.1047053508965.14	C	não tem	LbrM31_V2.1500	LinJ31_V3.1300	LmjF31.1280	LmxM30.1270	Tb927.4.4490	Tbg972.4.4600	não tem	TvY486_0403980
Tc00.1047053507079.30	C	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.1047053457101.30	C	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.1047053506417.83	C	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.1047053506417.10	C	não tem	LbrM23_V2.0230	LinJ23_V3.0230	LmjF23.0210	LmxM23.0210	Tb927.8.2160	não tem	não tem	não tem
Tc00.1047053510431.150	D	não tem	LbrM33_V2.2130	LinJ33_V3.1960	LmjF33.1860	LmxM32.1860	Tb11.02.0630	Tbg972.11.3460	TcIL3000.11.2910	TvY486_1103170
Tc00.1047053506925.530	D	não tem	LbrM27_V2.0580	LinJ27_V3.0480	LmjF27.0470	LmxM27.0470	Tb11.03.0030	Tbg972.11.1150	TcIL3000.11.1020	TvY486_1100960
Tc00.1047053508927.20	D	Tc00.1047053509237.30	LbrM31_V2.0700	LinJ31_V3.0560	LmjF31.0540	LmxM30.0540	Tb927.4.4050	Tbg972.4.4160	TcIL3000.10.13930	não tem

Tabela A.1 – Genes de transportadores ABC de *T. cruzi* alelos e ortólogos a espécies de *Leishmania* e tripanossomas africanos.

(continuação)										
Código do gene	Subfamília	Alelo <i>T. cruzi</i>	Ortólogo <i>L. braziliense</i>	Ortólogo <i>L. infantum</i>	Ortólogo <i>L. major</i>	Ortólogo <i>L. mexicana</i>	Ortólogo <i>T. brucei</i>	Ortólogo <i>T. gambiense</i>	Ortólogo <i>T. congolense</i>	Ortólogo <i>T. vivax</i>
Tc00.10470535 09237.30	D	Tc00.1047053 508927.20	LbrM31_V2.07 00	LinJ31_V3.0 560	LmjF31.0540	LmxM30.054 0	Tb927.4.40 50	Tbg972.4.4160	TcIL3000.10.1 3930	não tem
Tc00.10470534 64879.9	E	não tem	LbrM21_V2.07 70	LinJ21_V3.0 770	LmjF21.0710	LmxM21.071 0	Tb927.10.1 630	Tbg972.10.192 0	TcIL3000.10.1 400	TvY486_1 001650
Tc00.10470535 08637.150	E	não tem	LbrM21_V2.07 70	LinJ21_V3.0 770	LmjF21.0710	LmxM21.071 0	Tb927.10.1 630	Tbg972.10.192 0	TcIL3000.10.1 400	TvY486_1 001650
Tc00.10470535 11913.9	E	não tem	LbrM21_V2.07 70	LinJ21_V3.0 770	LmjF21.0710	LmxM21.071 0	Tb927.10.1 630	Tbg972.10.192 0	TcIL3000.10.1 400	TvY486_1 001650
Tc00.10470535 04867.20	F	Tc00.1047053 510943.80	LbrM03_V2.01 70	LinJ03_V3.0 150	LmjF03.0160	LmxM03.016 0	Tb927.10.3 170	Tbg972.10.401 0	TcIL3000.10.2 630	TvY486_1 003160
Tc00.10470535 10943.80	F	Tc00.1047053 504867.20	LbrM03_V2.01 70	LinJ03_V3.0 150	LmjF03.0160	LmxM03.016 0	Tb927.10.3 170	Tbg972.10.401 0	TcIL3000.10.2 630	TvY486_1 003160
Tc00.10470535 08897.30	F	não tem	LbrM19_V2.11 10	LinJ19_V3.0 800	LmjF19.0800	LmxM19.080 0	Tb927.10.1 5530	Tbg972.10.189 70	TcIL3000.10.1 3320	TvY486_1 014910
Tc00.10470535 09105.130	F	não tem	LbrM33_V2.03 20	LinJ33_V3.0 340	LmjF33.0310	LmxM32.031 0	Tb927.10.1 0880	Tbg972.10.132 40	TcIL3000.10.9 180	TvY486_0 043400
Tc00.10470535 06249.70	G	Tc00.1047053 508231.190	não tem	não tem	não tem	não tem	Tb927.10.7 700	Tbg972.10.944 0	TcIL3000.10.6 590	TvY486_1 007540
Tc00.10470535 08231.190	G	Tc00.1047053 506249.70	não tem	não tem	não tem	não tem	Tb927.10.7 700	Tbg972.10.944 0	TcIL3000.10.6 590	TvY486_1 007540
Tc00.10470535 06579.10	G	Tc00.1047053 507241.39	LbrM15_V2.09 30	LinJ15_V3.0 950	LmjF15.0890	LmxM15.089 0	Tb09.160.4 600	Tbg972.9.3310	TcIL3000.9.21 60	TvY486_0 902340
Tc00.10470535 07241.39	G	Tc00.1047053 506579.10	LbrM15_V2.09 30	LinJ15_V3.0 950	LmjF15.0890	LmxM15.089 0	Tb09.160.4 600	Tbg972.9.3310	TcIL3000.9.21 60	TvY486_0 902340
Tc00.10470535 06457.149	G	Tc00.1047053 509693.190	LbrM21_V2.10 80	LinJ21_V3.1 070	LmjF21.0880	LmxM21.088 0	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.10470535 09693.190	G	Tc00.1047053 506457.149	LbrM21_V2.10 80	LinJ21_V3.1 070	LmjF21.0880	LmxM21.088 0	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.10470535 07951.280	G	não tem	LbrM29_V2.10 00	LinJ29_V3.1 010	LmjF29.0930	LmxM08_29. 0930	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.10470535 07681.100	G	não tem	LbrM35_V2.31 10	LinJ36_V3.3 040	LmjF36.2890	LmxM36.289 0	Tb927.10.7 360	Tbg972.10.903 0	TcIL3000.10.6 340	não tem

Tabela A.1 – Genes de transportadores ABC de *T. cruzi* alelos e ortólogos a espécies de *Leishmania* e tripanossomas africanos.

(conclusão)

Código do gene	Subfamília	Alelo <i>T. cruzi</i>	Ortólogo <i>L. braziliense</i>	Ortólogo <i>L. infantum</i>	Ortólogo <i>L. major</i>	Ortólogo <i>L. mexicana</i>	Ortólogo <i>T. brucei</i>	Ortólogo <i>T. gambiense</i>	Ortólogo <i>T. congolense</i>	Ortólogo <i>T. vivax</i>
Tc00.10470535 03593.60	G	Tc00.1047053 506127.120	LbrM27_V2.18 40	LinJ27_V3.1 600	LmjF27.1700	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.10470535 06127.120	G	Tc00.1047053 503593.60	LbrM27_V2.18 40	LinJ27_V3.1 600	LmjF27.1700	não tem	não tem	não tem	não tem	não tem
Tc00.10470535 04425.70	G	Tc00.1047053 509331.200	LbrM23_V2.04 20	LinJ23_V3.0 430	LmjF23.0380	LmxM23.038 0	Tb927.8.23 80	Tbg972.8.1830	não tem	TvY486_0 801810
Tc00.10470535 09331.200	G	Tc00.1047053 504425.70	LbrM23_V2.04 20	LinJ23_V3.0 430	LmjF23.0380	LmxM23.038 0	Tb927.8.23 80	Tbg972.8.1830	não tem	TvY486_0 801810
Tc00.10470535 09617.80	H	Tc00.1047053 509669.30	LbrM29_V2.17 50	LinJ29_V3.1 780	LmjF29.1640	LmxM08_29. 1640	não tem	não tem	não tem	TvY486_0 303490
Tc00.10470535 09669.30	H	Tc00.1047053 509617.80	LbrM29_V2.17 50	LinJ29_V3.1 780	LmjF29.1640	LmxM08_29. 1640	não tem	não tem	não tem	TvY486_0 303490
Tc00.10470535 10381.20	H	Tc00.1047053 506905.40	LbrM19_V2.02 80	LinJ11_V3.0 040	LmjF11.0040	LmxM11.004 0	não tem	não tem	não tem	TvY486_1 107590
Tc00.10470535 06905.40	H	Tc00.1047053 510381.20	LbrM19_V2.02 80	LinJ11_V3.0 040	LmjF11.0040	LmxM11.004 0	não tem	não tem	não tem	TvY486_1 107590
Tc00.10470535 11501.30	H	Tc00.1047053 511753.100	LbrM30_V2.14 50	LinJ30_V3.1 390	LmjF30.1330	LmxM29.133 0	Tb927.6.28 10	Tbg972.6.2580	TcIL3000.6.22 90	TvY486_0 602290
Tc00.10470535 11753.100	H	Tc00.1047053 511501.30	LbrM30_V2.14 50	LinJ30_V3.1 390	LmjF30.1330	LmxM29.133 0	Tb927.6.28 10	Tbg972.6.2580	TcIL3000.6.22 90	TvY486_0 602290

A

SCCRAEVNEPVIPSSASLESDDQIAPKQKGNPQIEDYSIIAPGFSIKGSVAQFDAVE
 QNKSSVSGRFIPVSWHNLSYANGTKILCGLTGTAIPSRCLAVMGSSGAGKTTFLNAIS
 DRLTSRTLKLTGKRQLGDLEYKRHYRRMVGFAQDDILSPRAPEDSLRFSLRVRRTS
 ISETNKFVEELLEELRLVHCREIVGIPGLVGLSGGERKRISIGVELICDPKILLLDEP
 TSGLDSTSVKIVHLLNNIARTGRTVIYTIHQPTAETLTLYFDDLMLLTGGRCAYHGTMAK
 SVEYFESIGFPCPERYPSDFFMKLLQDPEISKVLVKKWKSYLEKHGVRPHTMAVELNPN
 PSEPTAKNIESYLGRFGSTSCIQFQELFRREMDLSRNHVYIFSHFIQAFAFFAVIVGLI
 FLNVKDDLQAGMDREGVFFMVTMNRAMGQTFIMVNSFMQDKALYVREQMVGSYSPFIFFL
 SKTLVEFPMRVFFAFLECCILYWMVGLYRQAGAFFYYFAVIALLTEVASGLGFAIGATFK
 SLVVASGTAPVILLPLAMVGGLLANTDRLHPYWYWLEKPSFIRQAYILLARNEFKHIDHI
 RCDGRGKPPGFCKDKPQNGEDILRQLGFQKQYENWVLWLTALLLYIAFRGWAVISLYSA
 ARTKF

B

SCCRAEVNEPVIPSSASLESDDQIAPKQKGNPQIEDYSIIAPGFSIKGSVAQFDAVE
 QNKSSVSGRFIPVSWHNLSYANGTKILCGLTGTAIPSRCLAVMGSSGAGKTTFLNAIS
 DRLTSRTLKLTGKRQLGDLEYKRHYRRMVGFAQDDILSPRAPEDSLRFSLRVRRTS
 ISETNKFVEELLEELRLVHCREIVGIPGLVGLSGGERKRISIGVELICDPKILLLDEP
 TSGLDSTSVKIVHLLNNIARTGRTVIYTIHQPTAETLTLYFDDLMLLTGGRCAYHGTMAK
 SVEYFESIGFPCPERYPSDFFMKLLQDPEISKVLVKKWKSYLEKHGVRPHTMAVELNPN
 PSEPTAKNIESYLGRFGSTSCIQFQELFRREMDLSRNHVYIFSHFIQAFAFFAVIVGLI
 FLNVKDDLQAGMDREGVFFMVTMNRAMGQTFIMVNSFMQDKALYVREQMVGSYSPFIFFL
 SKTLVEFPMRVFFAFLECCILYWMVGLYRQAGAFFYYFAVIALLTEVASGLGFAIGATFK
 SLVVASGTAPVILLPLAMVGGLLANTDRLHPYWYWLEKPSFIRQAYILLARNEFKHIDHI
 RCDGRGKPPGFCKDKPQNGEDILRQLGFQKQYENWVLWLTALLLYIAFRGWAVISLYSA
 ARTKF

C

SCCRAEVNEPVIPSSASLESDDQIASKQKGNPQIEDYSIIAPGFFIRGSVAQFDAVE
 QNKSSVSGRFIPVSWHNLAYSANGTKILCGLTGTAIPSRCLAVMGSSGAGKTTFLNAIS
 DRLTSRTLKLTGKRQLGDLEYKRHYRRMVGFAQDDILSPRAPEDSLRFSLRVRRTS
 ISETNKFVEELLEELRLVHCREIVGIPGLVGLSGGERKRISIGVELICDPKILLLDEP
 TSGLDSTSVKIVHLLNNIARTGRTVIYTIHQPTAETLTLYFDDLMLLTGGRCAYHGTMAK
 SVEYFESIGFPCPERYPSDFFMKLLQDPEISKVLVKKWKSYLEKHGVRPHTMAVELNPN
 PSEPTAKNIESYLSMFCISCIQFQELFRREIDLSRNHVYIFSHFIQAFAFFAVIVGLI
 FLNVKDDLQAGMDREGVFFMVTMNRAMGQTFIMVNSFMQDKALYVREQMVGSYSPFIFFL
 SKTLVEFPMRVFFALLECCILYWMVGLYRQAGAFFYYFAVIALLTEVASGLGFAIGATFK
 SLVVASGTAPVILLPLAMVGGLLANTDRLHPYWYWLEKPSFIRQAYILLARNEFKHINHI
 RCDGRGKPPGFCKDKPQNGEDILRQLGFQKQYESWVLWLTALLLYIAFRGWAVISLYSA
 ARTKF

Figura A.3 – Sequência proteica completa de *TcABCG1* de três grupos de cepas. Painel A: sequência proteica de *TcABCG1* do haplótipo Não-Esméraldo de CL Brener; Painel B: sequência proteica *TcABCG1* de VL10 ou do haplótipo Esmeraldo de CL Brener, que são idênticas; Painel C: sequência proteica *TcABCG1* de Silvio ou de YuYu, que são idênticas. A posição dos sítios de modificações pós-traducionais são identificados em cores. Sítios de fosforilação em Serina, Treonina e Tirosina em verde, marrom e azul, respectivamente; Sítios de glicosilação em amarelo; Sítios de acetilação em cinza; Sítios de metilação em rosa. Os sítios de fosforilação que diferenciam as sequências em relação à cepa referência (haplótipo Não-Esmo de CL Brener) estão destacados em caixa vermelha nos Painéis B e C.