## **Rogerio Milton De Marco**

## Identificação de um gene de *Leishmania major* relacionado à resistência a ciclosporina A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental Orientador: Paulo Cesar Cotrim

São Paulo 2004 Eu dedico esta tese à minha querida esposa, Debora, pelo amor, compreensão e por tanto colaborar na elaboração deste trabalho, e ao meu filho, André, que chegou para iluminar ainda mais minha família Este trabalho foi realizado no Laboratório de Soroepidemiologia, Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, financiado pelo LIM-48/FMUSP e Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (95/9305-9).

Aos meus pais e irmãos, pela educação, formação amor e união. Agradecimentos

#### Aos Amigos,

Especialmente, ao Paulo C. Cotrim, pela compreensão, incentivo e amizade.

Ao Antônio Walter Ferreira por permitir meu ingresso à pesquisa, pelo carinho e atenção.

À Sandra do Lago Moraes, que também me abriu as portas da pesquisa científica, pela amizade e carinho.

À Tânia Regina Tozetto-Mendoza, por me acompanhar desde os primeiros passos na pesquisa até os dias de hoje.

À Viviana Galimbert ArruK, pelos segundos passos no laboratório de malária e pela amizade, que cresce a cada dia.

Ao Heitor Franco de Andrade Júnior, a quem muito admiro por contribuir com seu expressivo conhecimento científico.

Ao Paulo de Oliveira e Ione Sales pelos trabalhos desenvolvidos nos setores de lavagem e esterilização de materiais.

Ao Pedro e Margarida pelo apoio e amizade.

E a todos que contribuíram para que eu desse mais este passo importante em minha vida: À Edite H. Y. Kanashiro, Sueli F. de Bastos, Adriano C. Coelho, Guita R. Elefant, Maria C. A. Sanches, Eunice B. Pinto, Edna B. Souza, Erika H. E. Hoffmann, Flavia C. S. Freitas, José A. L. Lindoso, Juliana I. Aoki, Maria G. Prianti, Selma L. Suzuki ,Vera L. C. Vieira e Silvana Ferreira.

Muito Obrigado!

### Às Instituições

Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo Laboratório de Departamento de Soroepidemiologia Celular e Molecular e Laboratório de Virologia

> Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-97/00541-7)

Fundação Faculdade de Medicina (LIM 38)

## Lista de Abreviaturas

ABC	Cassete de ligação ao ATP
APB	Amersham Pharmacia Biotech
ATP	Trifosfato de Adenosina
Cels.	Células
CsA	Ciclosporina A
D.B.O.	Distribuição biológica de oxigênio
D.O.	Densidade óptica
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Ácido desoxirribonucéico
DP	Desvio padrão médio
EtOH	Etanol
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic
	acid)
HYG	Higromicina
IC <sub>25</sub>	Concentração necessária para inibir 25% do
	crescimento celular
IC <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibir 50% do
	crescimento celular
IR	Índice de resistência
LB	Lúria-Bertani
MTT	3-(4,5 dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium
	bromide
NBD	Domínio de ligação de nucleotídeos
ORF	Região de fase aberta de leitura ("Open reading
	frame'')
PBS	Tampão salina fosfato
UV	Ultra violeta

## Lista de símbolos

g	Gravidade
kb	Quilo Base
pb	Par de base
min	Minutos
ng	Nanograma
mg	Miligrama
kg	Quilograma
μg	Micrograma
μl	Microlitro
mL	Mililitro
V	Volt
KV	Quilo Volt
Cm	Centímetro
μF	Micro Força
nn	Nanômetro
ñMol	Pico Mol
Mj	Mili Joule
μCi	Micro curie
°C	Grau Celsius

#### Resumo

A Ciclosporina A (CsA) faz parte de um grupo de oligopeptidios cíclicos e hidrofóbicos, produzida naturalmente por fungos. Este composto além de ser um potente imunossupressor pode também apresentar uma série de outros efeitos fisiológicos como atividade antiinflamatória e antialérgica, ou mesmo efeitos anti fúngicos e antiparasitários. Partimos de uma genoteca genômica de L. (L.) major cepa Friedlin A1 (LmFA1) construída no cosmídio cLHYG, que teve o seu DNA transfectado em promastigotas para em seguida as células serem submetidas aos experimentos de superexpressão gênica em presença de concentrações crescentes de CsA. Foram selecionados dois *loci* capazes de conferir resistência a CsA. Um desses *loci* (contendo cerca de 30 – 40 kb) foi mapeado e caracterizado após análises do perfil de digestão com diferentes enzimas de restrição, e da transfecção de algumas deleções em células LmFA1, que após amplificação gênica, foram submetidas a testes funcionais em presença de CsA. Apesar de valores baixos dos índices de resistência obtidos com os testes funcionais, foi possível identificar nesse *locus* um gene que após seqüenciamento parcial de nucleotídeos e análises comparativas no banco genômico de leishmânia, revelou a presença de uma fase aberta de leitura contendo 1 844 aminoácidos que codifica para uma proteína de membrana pertencente a família das transportadoras ABC e que parece estar relacionada com a resistência a CsA. Essa proteína, denominada LmABC-CR1, possui alta identidade com uma transportadora ABC de L. (L.) tropica (95,5%), e baixa identidade (27,2%) com uma outra transportadora ABC de LmFA1 isolada por nosso grupo e relacionada com a resistência a Pentamidiana (PRP1). A análise molecular dos DNAs das espécies, L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis, L. (L.), chagasi e L. (L.) major demonstrou um relativo polimorfismo do gene LmABC-CR1 nestas espécies. O papel dessa nova proteína na resistência a CsA frente a diferentes espécies de leishmânia deverá ser melhor estudado.

#### Summary

Cyclosporin A (CsA) is a cyclic hydrophobic oligopeptide naturally produced by fungus. Besides this drug is usually known as a potent immunosupressor, it also presents a couple of other physiologic activities as anti-inflammatory, anti-allergic, or even acting as fungicidal and anti-parasitic. Starting from an L. (L.) major Friedlin A1 (LmFA1) genomic library constructed into the cLHYG shuttle vector, DNA was transfected on promastigotes, and cells submitted to over expression in the presence of increasing concentrations of CsA. Two *loci* were selected capable to render cells CsA resistance after transfection.One of those *loci* (containing about 30 - 40 kb) was mapped after analyses of the restriction enzymes pattern, and characterized by transfection of its deletions in LmFA1 cells, which after gene amplification, were submitted to functional tests in the presence of CsA. In spite of low of resistance indexes values after functional tests, it was possible to identify a gene that after partial nucleotides sequencing and comparison with leishmania genomic bank data indicated the presence of an open reading containing 1 844 amino acids codifying a membrane protein from the ABC transporter family that seems to be related with CsA resistance (LmABC-CR1). LmABC-CR1 presents high identity (95,5%) with a L. (L.) tropica ABC transporter protein, and low identity (27,2%) with another LmFA1 ABC transporter (PRP1) isolated by us, and related with Pentamidine resistance. Southern blot analysis with L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis, L. (L.), chagasi and L. (L.) major genomic DNA shown a relative polymorphism of *LmABC-CR1* gene in this species. The role of this new protein on the CsA resistance in leishmania species should be further studied.

## Sumário

Lis	sta de símbolos	
Lis	sta de abreviaturas	
Res	sumo	
Su	mmary	
Ι	. Introdução	1
1.	Histórico	1
2.	Aspéctos gerais	2
3.	Ciclo biológico	3
4.	Tratamento	4
5.	Ciclosporina A	5
6.	Mecanismos de resistência a compostos anti-leishmânia	6
II	. Objetivos	7
III	. Materiais e Métodos	8
1.	Organismos	8
2.	Soluções, tampões, compostos utilizados e meios de cultura	8
3.	Vetores	10
4.	Cultivo de Leishmania spp	11
5.	Isolamento do cosmídio que confere resistência a CsA em células	11
	promastigotas de LmFA1 transfectadas	
6.	Transfecção em células LmFA1 e amplificação do número de cópias	13
	do DNA	
7.	Extração de DNA cosmidial a partir das células transfectadas	13
8.	Transformação de DNA em E. coli	15
9.	Extração do DNA do cosmídio a partir das células transformadas	15
10.	. Digestão de DNA com enzimas de restrição	16
11.	. Digestão e ligação parcial de DNA	17

12. Eletroforese em gel de agarose		
13. Análise funcional	18	
14. Subclonagem de fragmento de DNA	22	
15. Seqüenciamento de nucleotídeos	24	
16. Análise dos produtos seqüenciados em banco de dados	26	
17. Extração de DNA genômico de leishmânia	26	
18. Análise molecular da região relacionada com a resistência a CsA em	27	
leishmânia por "Southern Blot"		
19. Marcação de nucleotídeos com <sup>32</sup> P	28	
IV. Resultados	30	
1. Seleção do locus de Leishmania (L.) major relacionado com a	30	
resistência a CsA		
2. Mapeamento do locus de Leishmania (L.) major relacionado com a	33	
resistência a CsA		
3. Análise funcional das células LmFA1 transfectadas com os DNAs	38	
das deleções em presença de CsA		
4. Seqüenciamento de nucleotídeos do locus relacionado à resistência a	45	
CsA		
5. Análise comparativa dos resultados obtidos com o seqüenciamento	49	
de nucleotídeos		
6. Análise do efeito da Pentamidina em células resistentes a CsA	56	
7. Análise do efeito da CsA em diferentes espécies de leishmânia	57	
8. Análise molecular da região relacionada com a resistência a CsA em	60	
leishmânia por "Southern Blot"		
V. Discussão	65	
VI. Referências	79	

#### I. Introdução

#### 1. Histórico

Estudos demonstram que a leishmaniose possui uma história evolutiva muito antiga. A análise fóssil de flebótomos (vetor da Leishmaniose) revelou que um ancestral comum desses insetos já era encontrado na época em que os continentes ainda formavam uma massa única, cerca de 250 milhões de anos atrás (http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/esp paleo/leishmaniose fer.htm). Α leishmaniose tegumentar americana já havia sido retratada pelos ceramistas Incas do Peru no período pré-hispânico, e em 1885, Cerqueira a identificou clinicamente como botão de Biskra. Em 1898, na Rússia, Borovsky, descreveu pela primeira vez o parasito isolado de um paciente com a forma cutânea da doença (Rey, 1991). Em 1903, o parasito foi demonstrado pela coloração de Giemsa por William Leishman. Em 1908, Charles Nicolle demonstrou o papel do cão como hospedeiro intermediário da Leishmania Leishmania donovani (Seixas-Duarte e Badaró, 1997). Em 1911, no Brasil, Gaspar Vianna diferenciou morfologicamente o protozoário relatado por Lindenberg em 1909, com o nome de Leishmania Viannia braziliensis (Rey, 1991). Em 1912, Vianna iniciou a terapêutica para esta patologia com o Tártaro Emético (composto à base de antimônio). Em 1915, Chistina e Caronia, na Itália, e Rogers, na Índia, introduziram os antimônios trivalentes no tratamento do calazar. Na década de quarenta, foram introduzidos os antimoniais pentavalentes, como o Estibogluconato de Sódio (Pentostan) e o Meglumine (Glucantime), sendo até hoje os principais compostos, utilizados no tratamento das leishmanioses.

#### 2. Aspectos gerais

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* que, na maioria dos casos de acordo com a espécie e o estado imunológico do hospedeiro, pode provocar lesões cutâneas, muco-cutâneas ou viscerais, podendo, nesta última, levar o paciente a óbito.

A distribuição geográfica da leishmaniose está restrita a regiões de clima tropical e temperado, em áreas onde vivem os mosquitos da Família *Phlebotominae*, e gêneros *Lutzomyia e Phlebotomus*.

Os agentes etiológicos da leishmaniose humana pertencem à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. As leishmânias de importância médica estão agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania e Viannia*.

Nos últimos anos, com o progresso e a melhoria dos meios de transporte, o contato com as áreas endêmicas tem sido facilitado, propiciando um aumento do número de casos de leishmaniose importados para regiões não endêmicas. Outro quadro importante descrito nos últimos anos para a leishmaniose é a sua associação com pacientes imunodeficientes infectados por HIV (Gangneux, 1999; Alvar e cols., 1997), o que pode acarretar, na maioria das vezes, tratamentos prolongados, e que muitas vezes necessitam ser repetidos para obter-se os efeitos terapêuticos esperados.

Atualmente, 350 milhões de pessoas no mundo estão expostas ao risco de infecção por diferentes espécies de leishmânia. Estima-se em 1,5 a 2 milhões o número de novos casos de leishmaniose a cada ano no mundo [1 a 1,5 milhões de leishmaniose cutânea (LC) e 500.000 de leishmaniose visceral (LV)], com uma prevalência de cerca de 12 milhões. ("Surveillance and control of leishmaniasis" -

#### www.who.int/emc-

#### documents/surveillance/docs/whocdscsrisr2001.pdf/leishmaniaseis.pdfl)

#### 3. Ciclo biológico

O protozoário é heteroxeno, sendo necessário um hospedeiro invertebrado (vetor), do gênero *Phlebotomus* (velho mundo), ou *Lutzomya* (novo mundo), e um hospedeiro vertebrado dentre os quais, estão incluídos o homem, animais silvestres (marsupiais, roedores, primatas e etc.) e animais domésticos (cães).

O hospedeiro invertebrado ao picar o hospedeiro vertebrado (infectado) ingere, juntamente com o sangue ou com a linfa, as formas amastigotas da leishmânia, que no interior do tubo digestivo do inseto, tornam-se flageladas, constituindo assim as formas promastigotas, que irão se reproduzir por divisão binária. Após um período de 4–7 dias, ocorre obstrução mecânica. Este inseto infectado necessita picar várias vezes o hospedeiro vertebrado, devido à dificuldade de ingestão de sangue causada pela obstrução mecânica pelo excesso de promastigotas, e após o esforço por ingerir o sangue, os músculos responsáveis pela sucção relaxam, causando a regurgitação das formas promastigotas metacíclicas, que (no homem, p. ex.) serão fagocitadas pelos macrófagos, diferenciando-se em formas amastigotas intracelulares.

As formas amastigotas, irão se reproduzir por divisão binária, até que pelo excesso de parasitos o macrófago se rompe e libera as amastigotas no meio extracelular, que serão fagocitadas por outros macrófagos.

#### 4. Tratamento

A base do tratamento da leishmaniose é o Antimônio, proposto para este fim a mais de 92 anos por Gaspar Vianna. Embora estruturalmente modificados (na tentativa de diminuir seus efeitos colaterais), os Antimoniais Pentavalentes usados na quimioterapia das leishmanioses ainda apresentam sérios inconvenientes, como alta cardiotoxicidade, regimes de tratamento prolongados e pouca efetividade em alguns casos (Berman,1996; Thakur, 1991). Todos esses fatos, associados ainda ao seu uso indiscriminado durante surtos epidêmicos em certos países, vêm apresentando como conseqüência um importante quadro de resistência ao tratamento desta patologia em várias regiões (Olliaro e Bryceson, 1993).

Uma série de outros compostos vem sendo usada como alternativa e/ou segunda escolha, como Pentamidina, Miltefosine, Alopurinol e mesmo alguns antifúngicos como o Itraconazol (Rath e cols., 2003; Péres-Victoria e cols, 2003). Entretanto, muitos dos efeitos colaterais apresentados para o Antimônio não foram sanados com esses novos compostos. Dessa forma, o estudo de novos compostos alternativos, assim como de seus mecanismos de ação em alvos específicos do parasito, tem sido, cada vez mais estudados (Cotrim e cols., 1999; Kayser e Kiderlen, 2001).

#### 5. Ciclosporina A

A Ciclosporina A (CsA) é um undecapeptidio cíclico e hidrofóbico, de alto peso molecular, produzida naturalmente pelo fungo *Tolypocladium inflatum* com um espectro notável de atividades biológicas, das quais a imunossupressão é a mais conhecida (Fliri e cols., 1993). Sua ação imunossupressora depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina. A ciclofilina é uma peptidil-propil cis-trans isomerase que por possuir alta afinidade, se liga a CsA e inibe a atividade fosfatase da calcineurina, resultando na inibição da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e formação de linfócitos T citotóxicos. Um destes substratos é o fator nuclear de ativação de células T (NFAT), um dos responsáveis pela ativação do gene da interleucina 2, cujo bloqueio é considerado o principal efeito da Ciclosporina A (Kahan, 1989; Fruman et al., 1992).

Entretanto, uma série de autores têm descrito nos últimos anos a presença da ação antiparasitária da CsA em vários agentes infecciosos, como: *Schistosoma mansoni* (Pons e cols., 1988; Munro & McLaren, 1989), *Toxoplasma gondii* (High e cols., 1994), no Vírus da Herpes Simples (Vahlne e cols., 1992), além de leishmânias (High e Handschumacher, 1992; Chappel e Wastling, 1992; Hoerauf e cols., 1997; Rascher e cols., 1998). Várias hipóteses da ação da CsA nestes organismos têm sido propostas, porém nada ainda foi totalmente esclarecido sobre seu mecanismo de ação antiparasitário.

#### 6. Mecanismos de resistência a compostos anti-leishmânia

Uma das formas de entendermos o mecanismo de ação de um composto antiparasitário é o estudo dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos parasitos contra este composto. Sabemos que as leishmânias desenvolvem resistência a uma série de compostos por meio de amplificação gênica. Assim, podemos obter dados importantes no sentido de se entender os mecanismos de ação de um composto em leishmânia, identificando os genes relacionados com a resistência desenvolvida por este parasito por meio de amplificação gênica. Nesta abordagem identificam-se genes relacionados à resistência utilizando técnicas de transfecção gênica com vetores que permitem o crescimento como prófagos e também em células do parasito ("shuttle vectors"). O vetor utilizado (o cosmídio cLHYG) aceita fragmentos clonados de cerca de 40 kb, tem a capacidade de replicar extra-cromosomalmente após a transfecção, além de poder ser induzido artificialmente a amplificar o seu número de cópias (LeBowitz e cols., 1990; Ryan e cols., 1993; Descoteaux e cols., 1994). Assim, se um inserto de um destes cosmídios recombinantes apresentar uma região genômica capaz de codificar para uma proteína cuja superprodução confere resistência a um composto alvo qualquer após transfecção, podemos isolar este cosmídio plaqueando células de leishmânia transfectadas com uma genoteca construída neste vetor em presença de altas concentrações deste mesmo composto alvo. Tal estratégia já foi utilizada em fungos e procariotos (Rine e cols., 1983) e foi descrita em parasitos usando como modelo experimental a leishmânia (Cotrim e cols., 1999).

Dessa forma, foi realizado nesse trabalho a seleção de cosmídios recombinantes, com a posterior caracterização desses insertos que conferiam resistência a CsA em leishmânia após transfecção. Após análises funcionais e seqüênciamento de nucleotídeos, foi identificado um gene presente nesse inserto (*locus*).

### II. Objetivos

Utilizar a estratégia de superexpressão gênica para a obtenção de subsídios que possam levar a um melhor entendimento do mecanismo de resistência a CsA utilizado pela *L. (L.) major*.

#### III. Materiais e Métodos

#### 1. Organismos

- Leishmania (Leishmania) amazonensis cepa MHOM/BR/73/M2269;
- Leishmania (Viannia) braziliensis cepa MHO/BR/75/M2903;
- *Leishmania (Leishmania) chagasi* cepa (MHOM/BR/72/strain46);

• Leishmania (Leishmania) major (MHOM/IL/1980/Friedlin), denominada L. (L.) major cepa Friedlin V1 (LmFV1);

• *Leishmania (Leishmania) major*. Esta é uma cepa avirulenta obtida originariamente após sucessivas passagens da cepa original virulenta (MHOM/IL/1980/Friedlin) em cultura, e que passamos a denominar *L. (L.) major* cepa Friedlin A1 (LmFA1);

• Escherichia coli [DH10-**b**].

#### 2. Soluções, tampões, compostos utilizados e meios de cultura

#### 2.1. Soluções e tampões

Tampão Fosfato para Eletroporação (**EPB**): HEPES 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7 mM, Glicose 6 mM.

Tampão Salina Fosfato (pH 7,2) (**PBS**): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M; NaCl 0,9%.

PBS modificado: PBS (pH 7,2) contendo 1  $\mu$ L/mL de biotina.

Tris Acetato EDTA (TAE): Tris acetato 40mM, EDTA 2 mM.

Tris-base-Borato-EDTA (**TBE**): Tris-base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2 mM

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

Tris-EDTA-Glicose (TEG): TE contendo 50 mM de Glicose.

Tris-EDTA-RNAse (**TE-RNAse**): Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0), RNAse10 µg/ml.

Tris-EDTA-Lítio-Triton (**TELT**): Tris HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 5 mM (pH 9,0), LiCl 2,5 M e Triton X-100 (4 %).

Cloreto de Sódio - Citrato de Sódio 20 x (**SSC 20 x**): Citrato de sódio 0,3 M, NaCl 3 M

Solução de Denhardt's (50x): 1% de Ficol, 1% de polivinilpirrolidone, 1% BSA

#### 2.2. Compostos utilizados

Ciclosporina A: CsA -  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$  - Calbiochem<sup>r</sup> (PM: 1202,64)

Higromicina B: HYG –  $C_{20}H_{37}N_3O_{13}$  - Gibco (PM: 527,5)

Ampicilina G (Sal de Sódio): AMP - C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S - Kodak (PM: 371,39)

Pentamidina:  $PEN - C_{23}H_{36}N_4O_{10}S_2$  - Sigma (PM: 592,7)

#### 2.3. Meios de cultura

Lúria-Bertani (**LB**): bacto triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L (pH 7,2).

Tampão de Transformação e estocagem (**TSB**): Bacto triptona 10 g/l extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l; PEG (PM 8000) 10%; DMSO 5%; MgCh 10 mM e MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

TSB glicose: TSB contendo glicose 20 mM.

Meio M199 (**M199**): M199 (Gibco-BRL): suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (inativado a 56 °C/1 h); HEPES 40 mM( PH 7,4); Adenina 100  $\mu$ M; Hemina 10  $\mu$ g/ml; Biotina 4  $\mu$ M; penicilina 50 U/ml e estreptomicina 50  $\mu$ g/ml (Kapler e cols., 1990).

M199 semi-sólido: M199 suplementado com biopterina 0,25 mg/mL e agar bacteriológico 1%.

#### 3. Vetores

Os vetores utilizados foram o "shuttle vector" cLHYG (Ryan e cols., 1993) e o plasmídio pUC $\pi$ , derivado do vetor pUC8 (Vieira e Messing, 1982).



O cLHYG possui como característica a capacidade de se replicar extracromossomalmente após transfecção em leishmânia, podendo ser induzido artificialmente a amplificar o seu número de cópias após passagens sucessivas em meio seletivo contendo concentrações crescentes de 25 a 500  $\mu$ g/mL de HYG, além de aceitar fragmentos clonados de cerca de 40 Kb; e contém ainda uma origem de replicação e um gene marcador de resistência a Ampicilina para propagação em *E. coli.*  O pUC $\pi$  é um plasmídio de clonagem, onde facilmente identifica-se as colônias que contém inserto de DNA. Isso é possível, pois o sítio de clonagem está no interior do gene da â-galactosidase.

#### 4. Cultivo de *Leishmania spp*

As formas promastigotas de *L*. (*L*.) *amazonensis*, *L*. (*V*.) *braziliensis*, *L*. (*L*.) *chagasi* e *L*. (*L*.) *major*, foram mantidas *in vitro* em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Corning-USA) contendo de 5 a 10 mL de M199, ou em placas de 24 poços, fundo plano (Nunc-Denmark) contendo 1 mL de M199 e incubadas em estufa com Distribuição Biológica de Oxigênio (D.B.O.) a 26°C por aproximadamente 3 a 4 dias, ou até atingirem o início da fase estacionária. Após este período, as células foram diluídas na concentração de 1:1000 e novamente incubadas a 26 °C ou então submetidas aos testes fisiológicos com o composto em estudo.

# 5. Isolamento do cosmídio que confere resistência a CsA em células promastigotas de LmFA1 transfectadas

Inicialmente, foi realizado um pool de 3 genotecas de DNA genômico construída no vetor cLHYG contendo 17 900 cosmídios com insertos de aproximadamente 40 Kb (Cotrim e cols., 1999). Esta genoteca foi transfectada em LmFA1, amplificado seu o número de cópias e plaqueada (1 x  $10^6$  parasitos/placa) em meio M199 semi-sólido contendo CsA em concentrações que variaram de 5 a 50  $\mu$ g/mL. Após 21 dias de incubação, as colônias foram isoladas e transferidas para meio M199 líquido contendo 500  $\mu$ g/mL de Higromicina (HYG) e incubadas até

atingirem uma concentração de aproximadamente 2,0 x  $10^8$  cels/mL. Nesta fase, o DNA cosmidial foi extraído e transformado em *E. coli* para posterior análise do padrão de restrição com algumas enzimas.

A confirmação definitiva da resistência foi obtida após transfecção individual dos cosmídios isolados em células selvagens do parasito. Após esta nova transfecção o número de cópias do DNA foi amplificado por meio de sucessivas passagens em concentrações crescentes de HYG. Em seguida, as células com os cosmídios amplificados foram incubadas em presença de concentrações crescentes de CsA e a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>) determinada (Ilustração 01).



*Ilustração 1.* Esquema ilustrativo do processo de seleção do gene relacionado a resistência a CsA.

A manutenção das células em altas concentrações de HYG é de extrema importância, pois, na medida em que se amplifica a região que confere resistência a HYG, o inserto de DNA em estudo também é amplificado. Além disso, esta manutenção funciona como um fator de segurança laboratorial, uma vez que, ao retirar a pressão seletiva por HYG, as células perdem não só as resistências ao antibiótico, como também, passam a não mais amplificar a região estudada. Dessa forma, as células fora das condições laboratoriais, não apresentam o novo fenótipo (resistência), não gerando riscos ambientais no caso de algum acidente.

# 6. Transfecção em células LmFA1 e amplificação do número de cópias do DNA

O vetor cLHYG, os DNAs cosmidiais e os DNAs obtidos das construções e das deleções foram transfectadas em células selvagens LmFA1 conforme os protocolos descritos por Beverley e Clayton (1993) e Descoteaux e cols. (1994). As células LmFA1, forma promastigota, em fase logarítmica de crescimento, foram lavadas e o sedimento ressuspenso em EPB na concentração de 5,0 x 10<sup>7</sup> cels/mL. Para cada transfecção, cerca de 4 x 107 células foram transferidas para cubetas de transfecção de 0,8 mL (Bio-Rad) contendo de 1 a 5 µg de DNA. Para a eletroporação, cada amostra foi submetida a uma voltagem de 500 kV/cm e uma capacitância de 500 µF com tempo constante [Gene Pulser<sup>R</sup> II e Capacitância Extender Plus-(Bio-Rad)]. Após o pulso, os parasitos foram incubados por 10 minutos no gelo e em seguida, cultivados em estufa D.B.O. a 26 °C em 10 mL de M199. Após 18 horas de incubação, a cultura foi centrifugada e os parasitos ressuspensos em 10 mL de M199 com 25 µg/mL de HYG e novamente incubado por 10-15 dias. Após este período, os clones resistentes a HYG foram cultivados sucessivamente em presença de concentrações crescentes do antibiótico (25, 50, 100, 250 e 500 µg/ml) com o intuito de amplificarmos o número de cópias do inserto.

#### 7. Extração de DNA cosmidial a partir das células transfectadas

A extração de DNA das células transfectadas, foi realizada conforme método descrito por Beverley e Clayton (1993), Descoteaux e cols., 1994. Cerca de  $2 \times 10^8$ células eram centrifugadas por 10 minutos a 1680 x g. Após descartar o sobrenadante, o sedimento era ressuspendido no sobrenadante residual e em seguida transferido para um tubo de microcentrífuga. As células eram novamente sedimentadas e após total remoção do sobrenadante estas eram ressuspendidas em 100 µl da solução contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM (pH 8,0) e glicose 50 mM. Após isto, era adicionado 200 µl da solução de NaOH 0,2 M; SDS 1% agitando-se lentamente por inversão e incubando no gelo por 30 minutos. Em seguida, 150 µl da solução de acetato de sódio 3 M (pH 4,8) era adicionado, incubado-se no gelo por mais 5 minutos. A solução era então centrifugada a 18 000 x g a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA do cosmídio foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga contendo 400 µl de fenolclorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e após centrifugação centrifugado a 18 000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa era transferida para um outro tubo contendo etanol 100% e a solução era incubada a -20 °C por 30 minutos. A seguir, esta solução era centrifugada por 10 minutos a 18 000 x g a 4 °C. O sobrenadante era descartado e o tubo contendo o DNA precipitado submetido a secagem a 37 °C durante 30 minutos. Após a secagem, o DNA obtido era ressuspenso em 50 µl de TE RNase e incubado por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, era adicionado 50 µl da solução de NaCl 0,8 M; PEG (PM 8 000) 13 % e então o tubo era incubado no gelo durante 2 horas. Após a incubação o tubo era centrifugado a 18 000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante era descartado e adicionava-se

então 500 µl de etanol 70 % sendo centrifugado a 18 000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante era novamente descartado e o tubo contendo o DNA precipitado submetido a secagem a 42 °C por 30 minutos. O DNA obtido era ressuspenso em 20 µl TE e armazenado a - 20 °C.

Apesar de eficiente, esse processo não permite a obtenção de massa de DNA cosmidial suficiente para várias análises. Para obtenção de massa, os DNAs isolados foram transformados em *E. coli*.

#### 8. Transformação de DNA em E. coli.

O processo utilizado para transformação foi realizado com base no protocolo clássico descrito por Chung e Miller (1988) com algumas modificações relacionadas sobre tudo com o processo que torna as bactérias receptoras competentes. Inicialmente preparou-se um pré inoculo em 3 mL de meio LB líquido contendo uma colônia de *E. coli*, e após incubação de 12 horas/37 °C, a cultura foi diluída na proporção de 1/100. Após mais 2 horas de incubação sob as condições anteriores, esta nova cultura foi centrifugada a 1 000 x *g*/10 min/4 °C e o sedimento ressuspenso em TSB gelado (1/10 do volume total). A transformação foi possível nesta etapa adicionando-se cerca de 5 µg de DNA a 100 µL desta suspensão, mantendo-a no gelo por 30 minutos. Após a incorporação do DNA, foi adicionado 900 µL de TSB glicose e incubou-se por 2 horas/37 °C sob agitação e em seguida, a cultura foi centrifugada a 2 650 x *g*/1 min, e as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo Ampicilina (100 mg/mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 12 a 18 horas para o crescimento das colônias transformadas.

#### 9. Extração do DNA do cosmídio a partir das células transformadas

Para a extração de DNA cosmidial a partir das células transformadas, utilizamos a metodologia baseada no protocolo de Birboin e Doly, 1979, com algumas modificações.

Após a transformação, algumas colônias obtidas foram isoladas e repicadas em 3 mL de meio LB líquido contendo Ampicilina (100 mg/mL) e incubadas por 12 horas/37 °C. Após incubação, a suspensão foi centrifugada a 1 300 x g/10 min e o sobrenadante descartado – quando necessário, separava-se uma alíquota para congelamento das bactérias -. Ao sedimento foram adicionados 100  $\mu$ L de TEG [Tris-HCL 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0) e glicose 50 mM] e transferido para um tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados 200  $\mu$ L de NaOH 0,2 M-SDS 1 %. A amostra foi homogeneizada por inversão e incubada por 3 a 5 minutos. A seguir adicionou-se 200  $\mu$ L de ácido acético glacial 6 M-acetato de potássio 3 M e incubou-se no gelo por 25 minutos. A solução foi centrifugada a 16 100 x g/13 °C/8 min e 400  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de microcentrífuga contendo 300  $\mu$ L de Isopropanol gelado. Após nova centrifugação o DNA precipitado foi lavado com 500  $\mu$ L de Etanol 70% e ressuspenso em 30  $\mu$ L de TE-RNAse.

#### 10. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Os DNAs isolados a partir da etapa anterior, foram submetidos a digestões totais com enzimas de restrição. Para cada digestão, foram utilizados cerca de 2 a 5  $\mu$ g de DNA, 1 U da enzima de restrição e tampão de reação apropriado para a enzima. As digestões foram processadas em um período de 4 a 12 horas a

temperatura recomendada pelo fabricante. O padrão de digestão do DNA foi analisado após a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8 %.

#### 11. Digestão e ligação parcial de DNA

Para o processo de mapeamento dos insertos, foram realizadas digestões parciais dos cosmídio isolados da genoteca com a enzima *Apa*I e *BgI*II. Para a digestão parcial foram utilizados 10 µg de DNA, enzima (0,02 U/µg de DNA), tampão de reação apropriado e água milliq para um volume final de 100 µl. A reação foi realizada em um único pool, sendo retirado 10 µL a cada período previamente estabelecido e transferido para um tubo contendo 1 µL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) para a inativação da enzima. Os períodos utilizados foram 0; 1; 2,5; 5; 7; 10; 15 e 30 minutos. Uma alíquota de cada digestão foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose, juntamente com o DNA do cosmídio original digerido com a mesma enzima utilizada para a obtenção das deleções. O restante das amostras foi armazenado a -20 °C.

A análise do padrão de digestão obtido permitiu determinar a melhor amostra para a ligação parcial. Para isto, o padrão escolhido deveria apresentar poucas bandas (pequeno arraste), indicando o início de uma digestão parcial. Ao produto selecionado da digestão parcial, foi adicionado 1 U/µL de enzima T4 DNA ligase (Gibco-BRL), e tampão de reação T4 DNA ligase (Gibco-BRL), utilizado como indicado pelo fabricante. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 12 horas, para favorecer apenas a recircularização da construção de DNA. Após a ligação, este produto foi transformado em *E. coli* e o DNA de várias colônias foi isolado e submetido à digestão total com a enzima de restrição utilizada no processo de digestão parcial

A análise das deleções obtidas por meio de uma eletroforese em gel de agarose permitiu o mapeamento do cosmídio isolado da genoteca.

#### 12. Eletroforese em gel de agarose

O gel a 0,8% foi preparado com agarose (Gibco-BRL), dissolvida sob aquecimento em tampão TAE. Como tampão de amostra foram utilizados azul de bromofenol 0,25 %, xileno cianol 0,25 % e glicerol 20 % e como padrão, foi utilizado o DNA do bacteriófago Lambda ( $\gamma$ ), digerido com *Hind*III, fornecendo os seguintes fragmentos de DNA em Quilobase (Kb): 23,1; 9,4; 6,5; 4,4; 2,3; 2,0; 0,6. A voltagem aplicada foi de 20 V/540 min ou 80 V/90 min no gel de 1 cm de altura por 10 cm de comprimento. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 15 minutos ao abrigo da luz. O padrão de bandas obtido foi analisado com auxilio de um mini-transiluminador (Bio Rad), e fotografado pelo sistema Polaroid DS34 com filme 667. Cabe ressaltar que o descarte do gel e da solução contendo brometo de etídio foi realizado de acordo com as normas de biossegurança seguindo a metodologia descrita por SambrooK e cols., 2001.

#### **13.** Análise funcional

### 13.1. Análise do efeito da ciclosporina A em culturas de LmFA1 transfectadas

Para os testes funcionais, as células transfectadas foram submetidas à amplificação gênica (M199 em presença de concentrações crescentes de Higromicina), e então cerca de 1 x  $10^6$  cels/mL foram incubadas separadamente em presença de concentrações crescentes de CsA (1,87 a 30 µg/mL). Após 48, 72 ou 96 horas de incubação com o composto, retiramos 0,1ml de cada cultura para contagem celular com o auxilio de um contador de células Coulter Counter (modelo: T-890) adaptado para a contagem das formas promastigotas de *L. (L.) major*.

A CsA foi diluída em etanol absoluto (EtOH), como indicado pelo fabricante, devido a sua lipossolubilidade. Preparamos uma solução estoque a uma concentração de 100 mg/mL de CsA e armazenamos a -20 °C. A solução de uso foi preparada de maneira a obtermos uma concentração de 50 µg/mL de CsA em M199 contendo 0,69% de EtOH. Por exemplo: para o preparo de 10 mL de M199 contendo 50 µg/mL de CsA (0,69 % de EtOH), foi adicionado 5 µL de CsA estoque (100mg/mL-100% de EtOH), e 64 µL de EtOH (100%) à 9931 µL de M199.

# 13.2. Análise do efeito da ciclosporina A em culturas de diferentes espécies de leishmânia

Devido às diferenças de tamanho entre as espécies, não foi possível fazer uso do contador de células para determinação do número de células das espécies de *L*. (*L*.) *amazonensis*, *L*. (*V*.) *braziliensis*, *L*. (*L*.) *chagasi*. Deste modo, foi padronizada em nosso laboratório uma segunda técnica para a análise do efeito antiparasitário nas culturas de promastigota de leishmânia. Revendo a literatura especializada (Gebre-Hiwot e Frommel, 1993; Gebre-Hiwot e cols., 1992; Kinderlen e Kaye, 1990; Alfiere e cols., 1998; Rabinovitch e cols., 1987), passamos a utilizar a análise de viabilidade celular dos parasitos. Este método consiste na leitura espectrofotométrica baseada na produção de metabólitos cromógenos provenientes do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide].

O MTT é um cromógeno que age como substrato no processo respiratório oxidativo das mitocôndrias. Devido as desidrogenases mitocondriais da célula, este produto é reduzido a seu subproduto formazan. Assim, com a leitura da densidade óptica (D.O.) em 570 nm foi possível quantificar as células viáveis presentes em cada cultura realizada.

Para a padronização foram realizadas várias curvas de inibição de crescimento utilizando formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis, L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major* em diferentes concentrações de parasitos e diferentes tempos de incubação. A contagem padrão das células promastigotas foi realizada em câmara de Neubauer. Inicialmente o MTT foi dissolvido em solução PBS, na concentração de 5 mg/mL, e posteriormente esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu$ m. Os parasitos foram incubados em placas de 96 poços [fundo plano (Corning-USA)] em várias concentrações, para que pudéssemos avaliar a melhor concentração de células para iniciarmos as culturas em presença de CsA, de modo que a D.O. não atingisse um valor superior a 1.0 ao final do período de incubação. A concentração de células para iniciarmos os teste funcionais que se mostrou mais adequada foi de 1 x 10<sup>8</sup> cels/poço.

Após a determinação do número ideal de parasitos por poço, estes foram cultivados em presença de concentrações crescentes de CsA (0,39  $\mu$ g/mL a 100  $\mu$ g/mL), perfazendo-se um volume total no poço de 100  $\mu$ l. A cultura foi incubada por 24 horas em estufa D.B.O. a 26 °C. A seguir, a placa foi centrifugada a 2 500 x g/10 min, aspirou-se todo o sobrenadante e adicionaram-se 20  $\mu$ l/poço de PBS modificado. Em seguida, adicionaram-se 20  $\mu$ l/poço de MTT e a placa foi incubada a 26 °C ao abrigo da luz. Após 4 horas a placa foi novamente centrifugada e o formazan extraído das mitocôndrias pela adição de 100  $\mu$ l/poço de uma solução de Isopropanol 50 % em SDS-HCl (10 % - 0,01 M). As microplacas foram então incubadas por 18 horas a 26 °C e a leitura da D.O. realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan ms).

Após a realização de algumas culturas em concentrações crescentes de CsA com as diferentes espécies, observamos que a concentração de CsA necessária para para inibir o crescimento de 50 % das células (IC<sub>50</sub>) da. *L.* (*L.*) amazonensis, *L.* (*V.*) braziliensis e *L.* (*L.*) chagasi foi muito maior que as concentrações utilizadas para a *L.* (*L.*) major. Para que determinássemos o IC<sub>50</sub> destas espécies, foi necessário dobrar a concentração de CsA utilizada, e conseqüentemente a concentração de EtOH (diluente) também foi maior.

Como o EtOH em determinadas concentrações pode ser tóxico, cada espécie estudada foi submetida a culturas contendo concentrações crescentes de EtOH, que variaram de 0 a 14 %.

A partir das curvas de inibição de crescimento com EtOH, foi possível determinar a concentração necessária para inibir 25 % do crescimento celular ( $IC_{25}$ ), de modo que o diluente não interferisse nos resultados relacionados com a CsA.

#### **13.3** Análise dos resultados obtidos a partir dos testes funcionais

Para analisarmos os resultados obtidos com as curvas de inibição de crescimento, as contagens celulares foram transformadas em 100 % de parasitos vivos correspondendo à contagem das células incubadas com meio sem o composto, ou seja, X=100\*cc/S, onde X corresponde a porcentagem de células vivas, cc ao número de células (ou D.O.) a ser transformada e S corresponde a concentração de células determinada sem o composto. Os valores obtidos foram usados para a confecção dos gráficos das curvas de inibição de crescimento com o auxilio do programa Prisma.

A partir dos gráficos, foram realizados os cálculos individuais dos valores de  $IC_{50}$ . O cálculo foi realizado diretamente na curva obtida, relacionando o ponto correspondente a 50 % do total de células (eixo 'y') com a concentração do composto em estudo correspondente na curva obtida (eixo 'x').

Em cada experimento, obtinha-se o índice de resistência (IR) {[IC<sub>50</sub> experimentais / IC<sub>50</sub> LmFA1-cLHYG *L. (L.) major* cepa *Friedlin* A1 [LmFA1] transfectada com o vetor cLHYG}, usados como parâmetro para nossos resultados funcionais.

Para a avaliação da significância dos resultados foi utilizado o test-t de Student (normalmente utilizado para dados paramétricos) presumindo variâncias diferentes de no mínimo três experimentos independentes. Os valores são significantemente diferentes para p<0,05 e não significante (NS) para p>0,05.

Avaliamos estes mesmos resultados com o auxilio do teste de Mann Whitney (normalmente utilizado para amostras não paramétricas) para a confirmação dos resultados apresentados pelo teste-t citado anteriormente. Os valores são significantemente diferentes para p<0,05 e não significante (NS) para p>0,05.

#### 14. Subclonagem de fragmento de DNA

#### 14.1 Purificação de DNA (Gene Clean)

A purificação de fragmentos específicos de DNA a partir de um gel de agarose foi processada segundo protocolo descrito no Kit Gene Clean II (Bio 101, Inc). Inicialmente, com uma lâmina estéril, retirou-se do gel de agarose a banda correspondente ao fragmento de DNA a ser purificado. Este fragmento foi colocado em um tubo de micro centrífuga e pesado, onde para cada grama de gel obtido, foi adicionado 3 vezes (em mL) o mesmo valor em gramas de uma solução de Iodeto de Sódio (NaI) 6 M. Para a completa dissolução do gel, a solução foi aquecida a 55 °C por cerca de 5 minutos com agitação constante. Ao material já dissolvido, adicionaram-se 10 µL de resina "Glassmilk" (suspensão de sílica), que agrega as moléculas de DNA. Após homogeneização, a amostra foi incubada em banho de gelo por 10 min/sob agitação a cada 1 minuto e posteriormente centrifugada a 4 °C para a total retirada do NaI. Em seguida, lavou-se o precipitado por 3 vezes com 300 µL de New Wash (solução de Etanol 50 %) gelada, centrifugando a 16 100 x g /5 seg. O DNA contido no precipitado foi eluído adicionando-se 15 µL de TE e incubando-se por 3 min/55 °C/sob agitação a cada 1 min. Repetiu-se a centrifugação e o sobrenadante contendo o DNA foi recolhido. Para a segunda eluição do precipitado, foi adicionado 10  $\mu$ L de TE e incubado novamente a 55 °C/3 min. Finalmente recolheu-se o sobrenadante que continha a amostra de DNA purificada.

#### 14.2 Defosforilação do vetor e subclonagem do fragmento de DNA

Para esta etapa do trabalho o vetor PUC $\pi$  foi inicialmente digerido com a enzima adequada para cada subclonagem, e suas extremidades foram defosforiladas com a enzima CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase-Amersham/Pharmacia), que tem a capacidade de defosforilar as extremidades livres 5'P da molécula de DNA, impedindo sua re-ligação.

Para a defosforilação, cerca de 1-2  $\mu$ g do DNA do vetor digerido com a enzima apropriada foi incubado a 37 °C com 1  $\mu$ L de CIAP (26 U/ $\mu$ L) por 30 minutos. Repetiu-se essa etapa por mais duas vezes. A reação foi interrompida incubando-se a solução a 68 °C/10 min. Em seguida, adicionou-se 200  $\mu$ L de Fenol- clorofórmio: CHCL<sub>3</sub> (1:1) e a solução foi centrifugada a 9 300 g/10 min/4 °C, a fase aquosa foi incubada para precipitação do DNA durante 30 min/20 °C com 400  $\mu$ L de Etanol 100 % e 20  $\mu$ L de Acetato de sódio 3 M (pH 4,8); após a incubação, a amostra foi então centrifugada a 9 300 x g por 30 min/4 °C, lavada com Etanol 70 %, submetida a secagem e finalmente ressuspensa em 10  $\mu$ L de TE. Nesta fase, o vetor estava preparado para a ligação com o fragmento de DNA do cosmídio a ser subclonado.

Para a subclonagem, adicionou-se uma parte de vetor defosforilado para 5 partes de DNA purificado, 1  $\mu$ L de ATP, 1 U/ $\mu$ L de enzima T4 DNA ligase (Gibco-BRL), e tampão de reação T4 DNA ligase (Gibco-BRL) utilizado como indicado pelo fabricante. A reação foi incubada à 14 °C/24 horas. Após a ligação, este produto foi transformado em *E. coli* e o DNA de várias colônias foi isolado e submetido à digestão total com a enzima apropriada para o isolamento do vetor subclonado.
#### 15. Seqüenciamento de nucleotídeos

Os fragmentos de DNA subclonados em pUC $\pi$ , como descrito no item anterior, foram següenciados com o auxílio do següenciador automático modelo ALF express<sup>TM</sup>II (Amersham Pharmacia Biotech - APB), em conjunto com o kit para reação Cy<sup>TM</sup> 5 Termo Sequenase<sup>TM</sup> Dye Terminator (APB), que utiliza o processo de química fluorescente para a leitura dos resultados. As condições de reação são as fornecidas pelo fabricante e o método de seqüênciamento segue o processo clássico dos dideoxinucleotídeos (ddNTP-CY<sup>TM</sup>5) descrito originalmente por Sanger e cols.,1977. Para cada reação, preparou-se uma mistura com 3-5 pmol do Primer M13 correspondente para cada direção {-40 [5'-cyanine-d (CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC)-3'] Reverse [5'-cyanine-d e (TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC)-3']} fornecido juntamente com o kit "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing com 7-deazadGTP (APB)", 2 µg de amostra de DNA, completando com água bi-destilada para um volume final de 26 µL. Desta solução, distribuiu-se 6 µL em quatro tubos de micro centrífuga, cada um contendo 2,5 µL da solução com um dos dideoxinucleotídeos marcados com Cy<sup>TM</sup>5 Thermo Sequenase<sup>TM</sup> Dye Terminator juntamente com os quatro desoxirribonucleotídeos não marcados, além de 1 U de Thermo Sequenase DNA Polimerase e o tampão de reação apropriado. Os quatro tubos de reação de cada amostra foram incubados em termociclador nas seguintes temperaturas: 2 min a 94 °C para a desnaturação do DNA, seguido de 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 60 °C para o anelamento do iniciador e 30 s a 72 °C para a fase de extensão (síntese da fita complementar). A seguir, as amostras foram desnaturadas com uma solução contendo formamida, fucsina e EDTA (APB).

O gel utilizado foi o "Repro Gel Long Read" (APB), que é constituído por duas soluções: acrilamida/bis-acrilamida e tampão TBE, agente desnaturante e o catalisador da polimerização (ativado pela UV). Para a polimerização do gel, a placa foi exposta a radiação UV por 10 min em aparato próprio para o procedimento (Repro Set -APB). Após a polimerização, a placa foi acoplada ao seqüenciador, os produtos da reação de cada amostra, previamente desnaturadas, foram colocados em quatro poços adjacentes do gel (cada um correspondendo a um dos 4 dideoxirribonucleotídeos) e submetidos a eletroforese (1500 V durante 750 min). As respectivas seqüências de nucleotídeos obtidas foram armazenadas no computador acoplado ao seqüenciador.

#### 16. Análise dos produtos seqüenciados em banco de dados

Para a análise das seqüências de nucleotídeos obtidas do seqüênciamento, utilizou-se o programa Lasergene (DNASTAR, Inc.) e Clone Manager 5.02. A pesquisa de homologia das respectivas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram feitas em banco de dados, como GenBank, com o auxilio do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997), disponível na página da *internet* do Nacional Center for Biotechnology Information (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>), e também nas páginas da *internet* referentes ao Projeto Genoma de *Leishmania major*, que se encontra em constante atualização (<u>http://www.sanger.ac/uk/Projects/L\_major</u> e www.genedb.org).

Para a análise estrutural e bioquímica das proteínas obtidas, utilizou-se o programa ScanProsite (http://www.expasy.org/tools/scanprosite/).

#### 17. Extração de DNA genômico de leishmânia

Para a extração do DNA genômico de Leishmania foram utilizadas as formas promastigota de *L.* (*L.*) *amazonensis*, *L.*(*V.*) *braziliensis*, *L.* (*L.*) *chagasi* e *L.* (*L.*) *major* (LmFA1) cultivadas em meio M199 que, após duas lavagens com TE, foram contadas e cerca de  $10^8$  parasitos foram ressuspensos em 200 µl de tampão de lise TELT (50 mM Tris HCl pH 8,0; 5 mM EDTA pH 9,0; 2,5 M LiCl e 4 % Triton X-100). Após homogeneização cuidadosa e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, adicionou-se 200 µl de fenol/clorofórmio (1:1) seguido de centrifugação a 13 000 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente para a recuperação da fase aquosa. Depois de 2 extrações fenólicas, adicionou-se 300 µl de etanol 100 %, incubou-se por 5 minutos a -20 °C e o precipitado formado foi lavado com 1 mL de etanol 70 %. Após nova centrifugação (13 000 *g* por 10 minutos), o precipitado foi seco a vácuo e ressuspenso em 100 µl de TE, pH 8,0, acrescido de ribonuclease A 20 mg/mL e incubado a 37 °C durante 20 minutos para a completa digestão dos ácidos ribonucléicos.

# 18. Análise molecular da região relacionada com a resistência a CsA em leishmânia por "Southern Blot"

O DNA genômico obtido das 4 espécies em estudo foi digerido com diferentes enzimas de restrição. Para cada enzima, 5  $\mu$ g de DNA genômico foi diluído em tampão específico para cada enzima e incubado a 37 °C (*PaeI*), 30°C (*SmaI*) e 37 °C (*ApaI*). Após 4 horas de incubação, foi adicionado 1 ul de tampão de amostra (0,25 % de azul de bromofenol, 0,25 % de xileno cianol e 20 % de glicerol) e posteriormente aplicados ao gel de agarose 0,8 %. O fracionamento foi realizado em cuba de eletroforese Bio Rad (fonte - Power Pac 3 000) com tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) e submetido a uma voltagem de 20 V por 360 minutos.

A análise do padrão de digestão foi realizada usando como referência o padrão de peso molecular do DNA do fago lambda digerido com a enzima de restrição *Hind*III (que origina os fragmentos em quilobase (kb): 23,1 kb, 9,4 kb, 6,56 kb, 4,3 kb, 2,3 kb, 2,0 kb e 0,56 kb). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL), analisado em luz ultravioleta e fotografado com filme polaroide. O gel foi então descorado em água e em seguida o DNA foi depurinado com 0,25 M HCl durante 30 minutos, denaturado com 1,5 M NaCl/NaOH 0,5 M durante 15 minutos, neutralizado com SSC 20 x (NaCl 3M; citrato de sódio 0,3 M) durante 60 minutos.

O DNA foi transferido para membranas de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N) por capilaridade. Em uma cuba de transferência foi colocado um suporte absorvente (aproximadamente 1,2 x o tamanho do gel), o gel e a membrana de nylon. A esta cuba foi adicionado tampão SSC 20 x suficiente para cobrir apenas o suporte. Sobre a membrana foi colocado de 3 a 5 folhas de papel filtro Whatman 3 mm (de mesmo tamanho do gel) e várias folhas de papel absorvente (0,9 x o tamanho do gel). Este sistema foi mantido por aproximadamente 12 horas.

Em seguida foi feito o "cross-linking" do DNA transferido, submetendo a membrana molhada a 150 mJ com luz ultravioleta em um aparelho GS Gene Linker (BioRad). As membranas foram bloqueadas durante 2 horas (2 trocas de solução) a 42 °C com a sonda de hibridização (SSC5 x, Denhardt's 10 %, tRNA de levedura

0,05 mg/mL 0,5%, DNA de esperma de salmão (Sigma) 0,1 mg/mL, formamida 50 %) e hibridadas durante 18 horas a 42 °C com a sonda radioativa de interesse. Foi realizada uma lavagem com SSC 2 x por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de uma segunda lavagem com SSC 0,1 x, SDS 0,1 %, a 65 °C por 30 minutos. Ao final, as membranas foram expostas a filmes de auto radiografia XK-1 (KodaK) por 20 dias a – 70°C.

#### 19. Marcação de nucleotídeos com <sup>32</sup>P

A preparação de sondas com o isótopo <sup>32</sup>P foi feita utilizando 25 ng do DNA previamente determinado fervido por 5-10 minutos. Após a denaturação foi adicionado 10 µL de tampão OLB, 2 µL BSA 10 %, 50 µCi de <sup>32</sup>P-dCTP, 1 U enzima Klenow. A solução foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente protegido por acrílico. Ao fim deste tempo, a reação foi interrompida com 5 µL de "stop buffer" (EDTA 0,5 M pH 8,0) e o inserto precipitado com DNA de esperma de salmão (1,2 ng/ml), acetato de sódio 0,5 M (pH 5,5) e 3 x o volume de etanol 100 %. A mistura foi incubada por 15 minutos a –70 °C e em seguida centrifugada a 10 000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a 42 °C e depois o DNA marcado foi ressuspenso em 50 µL de TE.

# 1. Seleção do *locus* de *Leishmania* (*L.*) *major* relacionado com a resistência a CsA

As células transfectadas com a genoteca genômica de *L. (L.) major*, foram cultivadas em meio M199 e plaqueadas em concentrações crescentes de CsA como descrito no item 5 de materiais e métodos. Foram isoladas 20 colônias, sendo 6 obtidas a partir de 50  $\mu$ g/mL, 9 a partir de 40  $\mu$ g/mL e 5 a partir de 30  $\mu$ g/mL de CsA (tabela 1). Nas concentrações menores que 30  $\mu$ g/mL houve crescimento de colônias no grupo controle. Cabe ressaltar que a concentração de CsA usada no processo de seleção é mais alta em relação aos testes de inibição de crescimento, devido ao meio de cultura utilizado ser semi-sólido neste processo.

Concentração de CsA (mg/mL)	Células selvagens	Células Transfectadas
50	0	6
40	0	9
30	0	5
20	33	32
10	500	>1000
5	>1000	>1000
Sem CsA	>1000	>1000

*Tabela 1*. Número de colônias isoladas após plaqueamento em presença das concentrações de CsA indicadas.

O DNA das 20 colônias de leishmânia isoladas a partir de altas concentrações de CsA em relação ao grupo controle, foi extraído e transformado em *E. coli* (conforme itens 7 e 8 respectivamente de materiais e métodos) para a análise

do padrão de restrição com as enzimas *Apa*I, *Hind*III e *Bam*HI (figura 1). Após análise dos perfis obtidos, encontramos três padrões de restrição (A, B e C) relacionados entre si (figura 1), provavelmente pertencentes ao mesmo *locus* (*locus* I, figura 1), e uma segunda população com padrões de restrição diferentes da população do *locus* I, provavelmente pertencente a outro *locus* (*locus* II, figura 1). Podemos verificar a distribuição das populações destes cosmídios na tabela 2, onde entre os 19 cosmídios pertencentes ao *locus* I, 6 apresentaram o mesmo padrão de restrição e foram designados cosCip IA, 12 apresentaram um segundo padrão de restrição e foi designado cosCip IC (figura 1).



Figura 1. Padrão de restrição das populações de cosmídios isolados a partir de altas concentrações de CsA. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio contendo os DNAs dos cosmídios cosCip IA (IA); cosCip IB (IB), cosCip IC (IC) e cosCip II (II) digeridos com as enzimas indicadas. Padrão de Peso Molecular (PM) em quilobases representado pelo DNA do fago λ digerido com *Hind*III.

Com o intuito de facilitar o entendimento da nomenclatura empregada definimos o cosmídio como cos; Ciclosporina como Cip; os algarismos romanos como indicativo do *locus*; as letras arábicas como as regiões de um único *locus;* e finalmente os números cardinais como indicativo das deleções de cada cosmídio.

Verificamos também que a concentração de CsA utilizada no processo de seleção parece não influir na quantidade de colônias selecionadas. Isto porque das 6 colônias isoladas pertencentes às populações do cosmídio cosCip IA, 1 foi isolada a partir da cultura contendo 50  $\mu$ g/mL de CsA, 3 colônias foram isoladas da cultura contendo 40  $\mu$ g/mL e 2 colônias a partir de 30  $\mu$ g/mL de CsA (tabela 2). Da mesma forma, das 12 colônias pertencentes ao cosmídio cosCip IB metade foi isolada das culturas com 50 e 30  $\mu$ g/mL de CsA enquanto que as restantes 6 colônias foram isoladas a partir da cultura com 40  $\mu$ g/mL. Por outro lado, na seleção dos cosmídios cosCip IC e cosCip II (do *locus* II) obtivemos apenas 1 colônia de cada representante que apresentou resistência exatamente nas culturas com a maior concentração de CsA testada (50  $\mu$ g/mL).

Concentração de CsA		Cosmídios			
(nº de colônias)	Ι		Π		
	Α	В	С		
$50 \mu g/mL - (6)$	1	3	1	1	
$40 \ \mu g/mL - (9)$	3	6			
$30 \ \mu g/mL - (5)$	2	3			
número de cosmídios	6	12	1	1	
número de cosmídios/locus	19		1		

Tabela 2. Número de cosmídios selecionados em relação a<br/>concentração de CsA utilizada. As populações de<br/>cosmídios definidas na figura 1 estão indicadas. Os<br/>números entre parênteses representam a quantidade total<br/>de colônias isoladas em cada concentração de CsA.

# 2. Mapeamento do *locus* de *Leishmania major* relacionado com a resistência a CsA

Para o processo de mapeamento, optamos por identificar o gene contido no *locus* I (cosCip IA cosCip IB e cosCip IC), devido a maior representatividade encontrada no processo de seleção (tabela 2), e também visando facilitar o processo de identificação do *locus* de interesse.

Inicialmente, optamos por utilizar a enzima *Apa*I, que além de não digerir o DNA do vetor, reconhece um grande número de sítios de restrição no inserto, o que favorece a obtenção de um maior número de deleções (figura 1). A primeira população de representantes do *locus* I a ser mapeada foi o inserto cosCip IC, por apresentar uma maior quantidade de bandas após digestão com a enzima *Apa*I (figura 1, linha - *Apa*I-IC).

O inserto do cosmídio cosCip IC foi submetido a digestão parcial seguida de ligação também em condições parciais de acordo com o protocolo descrito no item 11 de materiais e métodos. Analisando a figura 2, que mostra o perfil de digestão parcial antes do processo de ligação, a amostra 3 (obtida após 2,5 min de digestão) apresentou o perfil mais adequado, que segundo nossa experiência, não deve apresentar nenhuma banda específica da digestão final (apenas um pequeno arraste); e tampouco o padrão característico de não digestão observado nos canais 1 e 2 da figura 2. Dessa forma, o produto de digestão parcial com 2,5 min foi utilizado nos experimentos de ligação parcial.



Figura 2. Padrão de digestão parcial com a enzima ApaI do DNA do cosmídio cosCip IC. 1) 0min; 2) 1min; 3) 2,5min; 4) 5min; 5) 7min; 6) 10min; 7) 15min; 8) 30min e 9). Padrão de Peso Molecular (PM) em quilobases representado pelo DNA fago λ digerido com HindIII.

Após a ligação e transformação do produto ligado em *E.coli*, obtivemos cerca de 150 colônias, sendo que cerca de 40 colônias foram aleatoriamente isoladas, incubadas em LB líquido e submetidas à extração do DNA do cosmídio inserido. Em seguida o DNA de cada extração foi submetido a digestão total com a enzima *Apa*I visando obter deleções do inserto original.

A análise do padrão de digestão total, após eletroforese em gel de agarose (figura 3-A), permitiu a identificação de 8 deleções diferentes do inserto do cosCip IC [com tamanho estimado de aproximadamente 34 kb], e que foram denominadas: cosCip IC1 (inserto de cerca de 2 kb); cosCip IC2 (32 kb); cosCip IC3 (7 kb); cosCip IC4 (21 kb); cosCip IC5 (19 kb); cosCip IC6 (8 kb); cosCip IC7 (12 kb) e cosCip IC8 (17 kb). Com base neste padrão de digestão total dos insertos das deleções

obtidas a partir do inserto cosCip IC, conseguimos desenhar um provável mapa genômico que esta representado no esquema da figura 3-B.



Figura 3. Mapeamento do cosmídio cosCip IC. A) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio contendo o padrão de restrição das deleções do inserto cosCip IC com a enzima ApaI. cosCip IC (IC), cosCip IC1 (IC1); cosCip IC2 (IC2), cosCip IC3 (IC3); cosCip IC4 (IC4); cosCip IC5 (IC5); cosCip IC6 (IC6); cosCip IC7 (IC7) e cosCip IC8 (IC8). Padrão de Peso Molecular (PM) em quilobases representado pelo DNA do fago λ digerido com HindIII. B) Representação esquemática do mapa genômico do cosmídio e deleções do cosCip IC deduzido a partir do padrão de digestão com ApaI. A linha inferior indica as distâncias estimadas entre os sítios de restrição ApaI (indicados pela letra "A", acima). O tamanho estimado de cada inserto esta indicado a esquerda. À direita estão representados os nomes de cada deleção. Os retângulos verdes representam o DNA do vetor cLHYG.

Com o objetivo de representar as três populações relacionadas com o *locus* I, foi realizado um novo 'set' de digestão parcial seguida de ligação parcial com a enzima *Bgl*II (item 11 de materiais e métodos) com o DNA dos cosmídios cosCip IA e cosCip IB. Obtivemos duas deleções a partir do cosmídios cosCip IA e duas a partir cosCip IB (figura 4-A). Obviamente o DNA do cosmídio cosCip IC também foi digerido com a enzima *Bgl*II para que pudéssemos construir o mapa genômico detalhado do *locus* I (figura 4-A e B).



*Figura 4.* Mapeamento do *locus* I. A) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio contendo o DNA dos insertos cosCip IA (IA) e cosCip IB (IB), e suas respectivas deleções cosCip IA1 (IA1), cosCip IA2 (IA2), cosCip IB1 (IB1), cosCip IB2 (IB2) e cosCip IC (IC), todos digeridos com a enzima *Bgl*II. PM- DNA do fago  $\lambda$  digerido com *Hind*III. B) Representação esquemática do mapa genômico dos cosmídios cosCip IA, cosCip IB e cosCip IC e suas respectivas deleções. A linha inferior indica as distâncias estimadas entre os sítios de restrição para a enzima *ApaI* (preto) e *Bgl*II (vermelho). À direita estão representados os nomes de cada deleção. Os retângulos verdes representam o DNA do vetor cLHYG.

### 3. Análise funcional das células LmFA1 transfectadas com os DNAs das deleções em presença de CsA

Para as análises funcionais as células promastigotas transfectadas com o DNA de cada uma das deleções a serem avaliadas foram primeiramente submetidas à amplificação gênica após passagens sucessivas em higromicina (item 6 de materiais e métodos). Em seguida, foram incubadas em presença de concentrações crescentes de CsA, e os dados obtidos nessas culturas permitiram a construção de uma curva de inibição de crescimento independente para cada um dos experimentos individuais realizados (item 13.1 de materiais e métodos). A partir de cada gráfico, foi determinada a concentração necessária para inibir 50 % do crescimento celular (IC<sub>50</sub>), como descrito no item 13.3 de materiais e métodos. Estes dados serviram ainda como base para as análises estatísticas realizadas (item 13.3 de materiais e métodos), e os gráficos representados nas figuras abaixo, mostram os resultados finais de cada uma dessas análises, representando, portanto, os resultados médios obtidos para cada linhagem analisada.

## 3.1 Análise funcional das células utilizadas como controle nas curvas de inibição de crescimento

Inicialmente, definimos o controle utilizado para as análises funcionais, avaliando o comportamento entre as células LmFA1 transfectadas com o DNA do vetor cLHYG (denominado LmFA1-cLHYG) e as células LmFA1 selvagens (não submetidas a transfecção). Pudemos observar como esperado que as curvas médias de ambas as linhagens apresentaram praticamente o mesmo padrão de deslocamento (figura 5-A), evidenciando que as células LmFA1 transfectadas com o DNA do vetor e submetidas ao processo de amplificação gênica (passagens em higromicina) apresentavam comportamento semelhante às células LmFA1 selvagens não transfectadas quando incubadas em presença de CsA. As análises estatísticas realizadas com os dados dessa análise confirmaram que não há diferença significativa entre os valores de IC<sub>50</sub> encontrados entre as duas linhagens celulares testadas (7,23±1.99 µg/mL de CsA para LmFA1 e 6,67±2,00 µg/mL de CsA para LmFA1-cLHYG). Deste modo, prosseguimos nossos estudos utilizando as células LmFA1-cLHYG como controle de todas as demais curvas de inibição de crescimento.

### 3.2 Análise funcional das células LmFA1 transfectadas com os DNAs das deleções do inserto cosCip IC

Para a avaliação do fenótipo, os DNAs das deleções obtidas a partir do inserto cosCip IC, foram tranfectados em células LmFA1, submetidos a amplificação do número de copias (item 6 de materiais e métodos ), e em seguida submetidas às culturas em concentrações crescentes de CsA (item 13.1 de materiais e métodos) para a obtenção das curvas de inibição de crescimento (item 13.3 de materiais e métodos). Os dados obtidos com os resultados de algumas dessas curvas de inibição de crescimento estão representados na figura 5-B e tabela 3.

Analisando a figura 5-B, podemos observar que as curvas de inibição de crescimento (CIC) das células transfectadas com o cosmídio cosCip IC, e com as deleções cosCip IC5 e cosCip IC7 (representadas em tons vermelho), apresentam um deslocamento à direita em relação ao controle LmFA1-cLHYG (em preto). Esse deslocamento indica um certo grau de resistência em relação ao grupo de células

transfectadas com as deleções cosCip IC3 e cosCip IC8 (representadas em tons de verde), e que por estarem próximas dos valores obtidos com LmFA1-cLHYG, foram consideradas como não capazes de conferir resistência a CsA após transfecção e amplificação gênica.



Figura 5. Comparação das curvas de inibição de crescimento em presença de concentrações crescentes de CsA. A) Representação das CIC das células controle LmFA1 selvagem (não transfectada) e LmFA1-cLHYG. B) Representação das CIC das células LmFA1 transfectadas com os DNAs indicados. As curvas em tons de vermelho representam as linhagens celulares capazes de conferir resistência a CsA, e as representadas em verde as não resistentes. Em preto a CIC referente às células LmFA1-cLHYG.

Conforme já salientado, os resultados obtidos a partir das CICs foram analisados estatisticamente como descrito no item 13.3 de materiais e métodos. Para facilitar a análise dos resultados, os dados obtidos com essas análises estão representados na tabela 3 que mostra os valores dos índices de resistência (IR) obtidos para cada linhagem testada, calculado pela razão entre os IC<sub>50</sub> das células transfectadas com os DNAs dos insertos/deleções pelo IC<sub>50</sub> das células controle LmFA1-CLHYG. Podemos verificar que o índice de resistência (IR) das células transfectadas com os DNAs das deleções cosCip IC2, cosCip IC5 e cosCip IC7 apresentaram valores significativamente diferentes (valores de p<0,05; em negrito) em referência às células controle LmFA1-cLHYG, indicando que os insertos eram capazes de conferir às células selvagens resistência a CsA após transfecção (fenótipo positivo; tabela 3 em vermelho). Por outro lado quando essa mesma comparação foi realizada com os dados referentes às células transfectadas com os insertos das deleções cosCip IC3, cosCip IC4 e cosCip IC8, as análises estatísticas não apresentam valores significantes em relação às células controle (p>0.05), indicando a não capacidade de conferir resistência a CsA, o que consideramos como um fenótipo negativo (tabela 3 em azul).

Linhagem celular LmFA1- cLHYG	IR 1	test-t Student p	Mann- Whitney P	n	Fenótipo
cosCip <b>IC</b>	1,40	0,020		4	Pos
cosCip <b>IC2</b>	1,40	0,002	0,007	5	Pos
cosCip <b>IC3</b>	0,88	0,773	0,700	3	Neg
cosCip <b>IC4</b>	0,84	0,0935	0,343	4	Neg
cosCip <b>IC5</b>	1,63	0,0001	0,0006	7	Pos
cosCip <b>IC7</b>	1,57	0,0004	0,002	6	Pos
cosCip <b>IC8</b>	1,04	0,742	1,000	4	Neg

Tabela 3. Comparação dos valores dos cálculos estatísticos entre as linhagens<br/>testadas. O índice de resistência (IR) de (n) experimentos independentes foi<br/>calculado e analisado por métodos paramétrico e não paramétrico (item 13.3<br/>de materiais e métodos). Valores significantemente diferentes (p<0,05) do<br/>tipo LmFA1-cLHYG (1 vez resistente) foram calculados com base no teste t<br/>de Student ou Mann-Whitney, e estão representados em negrito. Pos-<br/>fenótipo positivo; Neg- fenótipo negativo (ver texto).

#### 3.3 Análise funcional das células LmFA1 transfectadas com os DNAs das

#### deleções dos insertos cosCip IA e cosCip IB

Da mesma forma que descrito para as deleções do inserto cosCip IC (item anterior), os DNAs das deleções/insertos cosCip IA, cosCip IA2, cosCip IB e cosCip IB2 também foram isoladamente transfectados em células selvagens LmFA1 (item 6 de materiais e métodos) e avaliados em presença de concentrações crescentes de CsA após amplificação gênica. Os resultados obtidos foram utilizados na construção de curvas de inibição de crescimento para estas linhagens (dados não mostrados), assim como para as análises estatísticas, cujos resultados estão representados na tabela 4. Podemos verificar que das 4 linhagens testadas apenas uma (transfectada com a deleção cosCip IA2) não foi capaz de conferir resistência a CsA após transfecção. Todas as outras três linhagens (transfectadas com os DNAs das deleções cosCip IA, cosCip IB e cosCip IB2) apresentaram valores de índice de resistência (IR) significativamente diferentes (p<0,05; em negrito) quando comparados às células controle LmFA1-cLHYG, indicando que os insertos eram capazes de conferir às células selvagens resistência a CsA após transfecção (fenótipo positivo; tabela 4 em vermelho).

Linhagem celular	IR	Test-t Student P	Mann- Whitney P	n	Fenótipo
cosCip IA	1,78	0,023	0,028	4	Pos
cosCip IA2	1	0,55	0,700	3	Neg
cosCip <b>IB</b>	1,81	0,0004	0,007	5	Pos
cosCip IB2	1.46	0.03	0.029	3	Pos

Tabela 4. Comparação dos valores dos cálculos estatísticos entre as linhagens<br/>testadas. O índice de resistência (IR) de (n) experimentos independentes<br/>foi calculado e analisado por métodos paramétrico e não paramétrico (item<br/>13.3 de materiais e métodos). Valores significantemente diferentes (p<0,05)<br/>do tipo LmFA1-cLHYG (1 vez resistente) foram calculados com base no<br/>teste t de Student ou Mann-Whitney, e estão representados em negrito. Pos-<br/>fenótipo positivo; Neg- fenótipo negativo (ver texto).

A partir da análise do mapa genômico (figuras 4-B e 6) associado aos resultados funcionais obtidos a partir das curvas de inibição de crescimento (tabela 3 e 4), verificamos que a deleção cosCip IC7 contém o menor fragmento do inserto (com cerca de 12 kb) capaz de conferir resistência a CsA após transfecção e amplificação gênica. Isto porque as células transfectadas com a deleção cosCip IC4 (contendo as deleções cosCip IC1, cosCip IC3, cosCip IC6 e cosCip IC8), assim como a deleção cosCip IA2 não foram capazes de conferir resistência a CsA (figuras 4-B e 6).



Figura 6. Mapa genômico relacionado à resistência a CsA. Representação esquemática do mapa genômico do cosmídio dos cosmídios cosCip IA, cosCip IB e cosCip IC. Em preto estão representados os sítios de restrição para a enzima ApaI em vermelho para BglII. Os nomes e o respectivo fenótipo de cada deleção [resistência a CsA (pos) e não resistência (neg)] estão representados ao lado. Os retângulos (verde) nas extremidades representam o vetor cLHYG.

## 3.4 Análise funcional das células LmFA1 transfectadas com fragmentos do inserto cosCip IC7

Buscando caracterizar melhor o inserto da deleção cosCip IC7 digerimos este DNA com uma segunda enzima de restrição. Para isto, o DNA da deleção cosCip IC7 foi submetido a digestão dupla com as enzimas *Apa*I e *Bgl*II. A partir da análise do padrão de restrição (eletroforese em gel de agarose) podemos observar a presença de pelo menos 4 fragmentos de aproximadamente 3,7; 2,0; 2,1 e 1,0 kb (figura 7). Notamos que o fragmento de cerca de 2,0 kb originário da digestão com a enzima *Bgl*II (figura 7, linha 2) esta presente no interior do fragmento *Apa*I de 5kb (figura 7), uma vez que a banda referente a esse fragmento não esta presente no padrão da digestão dupla (figura 7, linha 3). Além de caracterizar o inserto do cosmídio cosCip IC7, esta análise contribuiu para confirmar o mapa genômico sugerido das três populações de cosmídios pertencentes ao *locus* I. (figura 4-B e 6).



Figura 7. Padrão de restrição do inserto da deleção cosCip IC7. 1) ApaI, 2) Bg II, 3) Apa I + Bg/II, 4) Padrão de Peso Molecular (PM) em quilobases representado pelo DNA fago λ digerido com HindIII.

Para a confirmação final da localização do gene relacionado com a resistência a CsA, a deleção cosCip IC7 contendo um inserto de aproximadamente 12 kb (figura 8-A) foi digerida com a enzima BglII (figura 7), na tentativa de se extrair o fragmento de cerca de 2 kb. Isto para que avaliássemos se este fragmento estava relacionado com o gene em estudo. O produto originado com cerca de 10 kb (cosCip IC7 $\Delta BglII$ , figura 8-A) foi transfectado em LmFA1 e submetido a análise funcional após amplificação

gênica, evidenciando a perda da capacidade de conferir resistência a CsA (figura 8-B e C), que comprova que o gene deve conter parte, ou a totalidade deste fragmento *BgI*II.



Figura 8. Estratégia de interrupção do gene relacionado a resistência a CsA. (A). Representação esquemática dos insertos cosCip IC7 e cosCip IC7Δ2kbBg/II. A região apontada pela seta indica o fragmento Bg/II de 2 kb deletado. (B). Curva de inibição de crescimento de células transfectadas com os DNAs dos insertos indicados em presença de CsA. (C). Valores do índice de resistência (IR) de 6 experimentos independentes, definidos e calculados conforme legenda da tabela 3 e item 13.3 de materiais e métodos. Pos- fenótipo positivo; Neg- fenótipo negativo.

#### 4. Seqüenciamento de nucleotídeos do *locus* relacionado à resistência a

CsA

Com o objetivo de identificar o gene de interesse no genoma de *L. (L.) major* cepa Friedlin A1 (LmFA1), purificamos e subclonamos (item14 de materiais e métodos), a partir do cosmídio cosCip IC7, o fragmento de DNA de

aproximadamente 2 Kb (construção pUC $\pi/2$ kb *Bg*/II) obtido após digestão total com a enzima *Bg*/II (figura 9-A).

O DNA do inserto da construção pUC $\pi/2$ kb *Bgl*II foi submetido ao seqüenciamento (item 15 de materiais e métodos) e os produtos obtidos de 2 seqüências na direção 5' $\rightarrow$  3' (sense – iniciador M13-40) e seqüências 3' $\rightarrow$  5'(antisense – iniciador M13 reverse) foram analisados com o auxilio do programa Lasergene (SeqMan-DNASTAR). Esta análise permitiu obtenção de seqüências consensuais de 575 pb na extremidade 5' e 764 pb na extremidade 3' (consensos B3' e B5', Fig.9-D).

A partir destas seqüências consensuais, foram realizadas análises comparativas com o auxilio do programa BLAST (Altschul e cols., 1997) que apresentaram alta identidade com o clone LB0564 do cromossomo 27 de *L. (L.) major* e com uma proteína transportadora ABC "ABC-transporter" (cassete de ligação de ATP) de *L. (L.) tropica* (número de acesso AF200948- Parodi-Talice e cols., 2003). Foram realizadas análises comparativas também com os dados disponíveis no projeto genoma de *L. (L.) major* (Friedlin A1), coordenado pelo Sanger Institute - geneDB, que demonstraram alta similaridade com o cromossomo 27 de *L. (L.) major* (análise realizada em 20 de abril de 2004 16:49hs identificado como: LmjF27\_01\_20040201\_V3.0).

Porém, para comprovar estas análises, realizamos também o seqüenciamento de um fragmento maior que continha o fragmento *Bgl*II de 2 kb analisado anteriormente. Para isto, purificamos e subclonamos, a partir do cosCip IC5 (item14 de materiais e métodos), o fragmento de DNA de aproximadamente 6 Kb (construção pUC $\pi$ /6kb *Hind*III) obtido após digestão total com a enzima *Hindl*III (figura 9-B).

O DNA do inserto da construção pUC $\pi$ /6kb *Hindl*III foi seqüenciado e os produtos obtidos de 2 seqüências (sense e anti-sense), foram analisados com o auxilio do programa Lasergene (SeqMan-DNASTAR). Após a obtenção das seqüências consensuais (576 pb na extremidade 5' e 554 pb na extremidade 3'; consensos H3' e H5', figura 9-D), foram realizadas análises comparativas com os dados disponíveis no projeto genoma (Sanger Institute - genedb) de *L. (L.) major* (Friedlin A1) e também com o auxilio do programa BLAST, que confirmaram as análises anteriores.

Foi seqüenciado ainda um terceiro fragmento de DNA que representa o inserto do cosCip IC1, para que pudéssemos identificar com precisão o início e o final do inserto original (cosCip IC) no cromossomo da *L. (L.) major*. Para isto, purificamos e subclonamos (item 14 de materiais e métodos), a partir do cosCip IC1 o fragmento de aproximadamente 1,7 kb após digestão dupla com as enzimas *Hind*III e *Pst*I seguida de ligação no vetor pUC $\pi$  (construção pUC $\pi$ /1,7kb *Hind*III/*Pst*I, figura 9-C).

O DNA do inserto da construção pUC $\pi/1,7$ kb *Hind*III/*Pst*I foi seqüenciado e os produtos obtidos de 2 seqüências (sense e anti-sense) forneceram as seqüências consensuais (301 pb na extremidade 5' e 585 pb na extremidade 3' - consensos HP3' e HP5', figura 9-D.



Figura 9. Estratégia de seqüenciamento. (A) Mapa de restrição do cosCip IC7. Os sítios de restrição BglII em verde indicam o fragmento de aproximadamente 2 kb, subclonados no vetor pUCπ. (B) Mapa parcial de restrição do cosCip IC5. Os sítios de restrição HindIII em vermelho indicam o fragmento de aproximadamente 6 kb, subclonado no vetor pUCπ. C) Mapa de restrição do cosCip IC1. Os sítios de restrição HindIII/PstI em azul indicam o fragmento de aproximadamente 1,7 kb, subclonados no vetor pUCπ. Os quadrados em verde representam o vetor cLHYG e em azul representam o vetor pUCπ. (D) Mapa de restrição contendo as regiões seqüenciadas. B5' e B3' indicam as seqüências consensuais de nucleotídeos obtidas a partir do fragmento pUC/2kb BglII. H5' e H3' indicam as seqüências consensuais de nucleotídeos obtidas a partir do fragmento pUC/6kb HindIII. HP5' e HP3' indicam as seqüências consensuais de nucleotídeos obtidas a partir do fragmento pUC/1,7kb PstI/HindIII.

# 5. Análise comparativa dos resultados obtidos com o seqüenciamento de nucleotídeos

Após a confirmação da localização do *locus* I no cromossomo 27 de L. (L.) *major*, foi realizado o alinhamento entre este cromossomo e todas as següências consensuais obtidas, com o auxilio do programa Lasergene (SeqMan DNASTAR). O perfil apresentado neste alinhamento confirmou a estratégia de seqüenciamento utilizada, pois como podemos observar nas figuras 9-D e 10, a distância entre os sítios de clonagem BglII estimado em 2000 pb (inserto da construção pUC $\pi/2$ kbBg/II), é muito semelhante à distância de 2041 pb (posições 413 816 pb e 415 856 pb) encontrada entre os consensos B5' e B3' no cromossomo 27 de L. (L.) *major*. Da mesma maneira, a distância entre os sítios de clonagem *Hind*III estimado em 6000 pb (inserto da construção pUC $\pi/6$ kb *Hind*III) é muito semelhante à distância de 5833 pb (posições 413 237 pb e 419 070 pb) encontrada entre os consensos H5' e H3' no cromossomo 27 de L. (L.) major. Podemos observar também que as seqüências obtidas a partir da construção pUC $\pi/2$ kb Bg/II estão contidas nas seqüências obtidas a partir da construção pUC $\pi$ /6kb *Hind*III (figura 9-B e D).

Além do tamanho estimado da região seqüenciada (inserto da construção pUC $\pi$ /6kb *Hind*III) ser semelhante ao da região identificada no cromossomo 27 de *L. (L.) major* (figuras 9-B e 10), o padrão de restrição obtido durante o mapeamento dos cosmídios cosCip IA, cosCip IB e cosCip IC também foram praticamente idênticos confirmando novamente que os três insertos contidos nestes cosmídios pertencem ao mesmo *locus* (previamente denominado como *locus* I).



Figura 10. Alinhamento entre as seqüências consensuais e o cromossomo 27 de L. (L.) major (projeto genoma – Sanger - genedb). As setas indicam as regiões das seqüências consensuais alinhadas com o cromossomo e as barras indicam a distância entre elas. HP indica as seqüências do fragmento HindIII/PstI; B indica as seqüências do fragmento BglII/BglII de 2 kb e H indica as seqüências do fragmento HindIII/HindIII de 6 kb.

As seqüências de nucleotídeos obtidas a partir da construção pUC $\pi/1,7$ kb *PstI/Hind*III contribuíram para que identificássemos com precisão a localização exata do inserto original de 36,5 kb do cosCip IC. Foi possível encontrar nesses produtos seqüenciados tanto os sítios de restrição para as enzimas utilizadas no processo de subclonagem (*Pst*I e *Hind*III), como os sítios de restrição para as enzimas *Sau*3A e/ou *Bam*H1 (utilizadas na construção da genoteca; Ryan e cols., 1993). Assim, constatamos que o inserto cosCip IC (com 36 544 pb) inicia-se na posição 408 159 pb do cromossomo 27 de *L. (L.) major* e termina em 444 703 pb (correspondente aos sítios *Sau*3A, em verde na figura 11).

Como as extremidades dos outros dois insertos relacionados com esse *locus* I (cosCip IA e cosCip IB) não foram seqüenciadas, não foi possível localizar com exatidão qual o sítio *Sau*3A e/ou *Bam*H1, uma vez que mais de um desses sítios estavam presentes nas regiões que delimitam os respectivos insertos. Entretanto,

baseados nos dados da seqüência do cromossomo 27 de *L. (L.) major* em associação com padrões de digestão obtidos nesse trabalho (figuras 1, 3-A, 4-A e 7), determinamos que esses insertos estão localizados aproximadamente entre as posições 397 000 e 434 000 pb (cosCip IA) e 399 000 pb e 432 000 pb (cosCip IB) (figura 11).



Figura 11. Localização do locus I relacionado com a resistência a CsA no cromossomo 27 de L.

(*L.*) *major*. Os tamanhos dos fragmentos e as posições dos sítios de restrição para as enzimas ApaI e BgIII estão respectivamente representadas em preto e vermelho. Os sítios para a enzima Sau3A que delimitam o inserto cosCip IC estão representados em verde. Os números em pb (pares de base) no alto da figura representam as posições dos respectivos nucleotídeos na seqüência da região do cromossomo 27 de *L.* (*L.*) *major* correspondente ao *locus* I. A região delimitada pela seta corresponde contém o gene relacionado com a resistência a CsA.

Baseado nestes resultados passamos a utilizar nas próximas análises a seqüência de nucleotídeos que compreendia a região localizada entre as posições 408 159 pb a 418 519 pb do cromossomo 27 (figura 11), com tamanho de 10 360 pb. Esta região contém grande parte do inserto cosCip IC7 além da região que contém o gene relacionado com a resistência a CsA.

A análise da seqüenciamento de nucleotídeos dessa região com o auxilio do programa Clone Manager, demonstrou a presença de uma região de fase aberta de leitura (ORF-"Open Reading Frame") compatível com os resultados da interrupção da expressão gênica demonstrados na figura 8, e que possui 5 534 pb, que codifica uma proteína de 1 844 aa (aminoácidos), com massa molecular estimada em 202 374 Da (figura 12).

Uma vez que os resultados comparativos da seqüência de nucleotídeos com auxílio do programa BLAST revelaram alta similaridade com uma proteína transportadora da família das "ABC transporters" ("ATP **B**inding **C**assete transporters", ou transportadoras contendo um cassete de ligação ao ATP), nomeamos esta ORF, que segundo nossos dados esta relacionada com a resistência a CsA em *L. (L.) major*, de LmABC-CR1 [transportadora ABC de *L. (L.) major* relacionada com a Resistência a Ciclosporina A ].



*Figura 12.* Localização da LmABC-CR1 no inserto cosCip IC7. A fase de leitura aberta referente a LmABC-CR1 está representada em vermelho. A seta em azul indica o fragmento *Bgl*II de 2 041 pb, utilizado no seqüenciamento e retirado nos experimentos de interrupção da expressão gênica (figura 8). A- *Apa*I; B- *Bgl*II.

Verificamos ainda que a comparação da seqüência de aminoácidos da LmABC-CR1 com outras transportadoras ABC descritas na literatura e realizada com o auxilio do programa Lasergene (DNASTAR, Inc; ClustalW), variavam quanto a identidade encontrada. Assim a maior identidade (95,5 %), foi verificada com a LtABCA1 uma transportadora ABC de *L. (L.) tropica* (número de acesso AAG35594). Em seguida verificamos identidade de 56,1 % com a TcABCA1 de *Tripanosoma cruzi* (AAK14943); e uma identidade de aminoácidos de 41,5 % e 31,1% com HsABCA3 e HsABCA1, duas transportadoras ABC humanas (respectivamente, AAC50967 e AAF98175). Interessantemente, verificamos ainda uma baixa identidade (apenas 27,2 %) foi encontrada com a seqüência de aminoácidos da LmPRP1, uma glicoproteína transportadora ABC de *L. (L.) major* (AY 251609) identificada recentemente pelo nosso grupo (Coelho e cols., 2003) e que esta relacionada com a resistência a Pentamidina. Essas observações podem sugerir que algumas dessas transportadoras ABC possam pertencer grupos evolutivos diferentes.

Visando aprofundar um pouco mais a caracterização estrutural da LmABC-CR1, utilizamos também o programa ScanProsite (item 16 de materiais e métodos), que permite a identificação das regiões de assinatura características das proteínas pertencentes às família das transportadoras ABC. Assim, identificamos claramente <sup>854</sup>LSGGQKR KLSVAIAF<sup>868</sup> duas regiões de assinaturas: 1) e 2) <sup>1638</sup>LSGGNRRKLSVAVSL<sup>1652</sup>, que caracterizam a LmABC-CR1 como pertencente a família das transportadoras ABC (figura 13). Identificamos também duas regiões hidrofílicas correspondentes aos domínios de ligação de nucleotídeos ("Nucleotide-Binding Domains"-NBDs): NBD1: <sup>719</sup>VRIRGLRK...GFVLTMS<sup>952</sup> e NBD2: <sup>1506</sup>VRVLNRLE....TGFEVAVR<sup>1736</sup>; e que contém as seqüências consensuais envolvidas na ligação com ATP-Mg, conhecidas como motivos Walker A:  $^{755}$ GHNGAGKS $^{762}$  e  $^{1539}$ GTNGAGKT $^{1546}$ , e Walker B:  $^{874}$ LVILD $^{878}$  e <sup>1558</sup>VVFFD<sup>1662</sup> (figura 13).

Os 10 sítios de N-glicosilação estão localizados nas posições: <sup>12</sup>NSTA<sup>15</sup>; <sup>225</sup>NASL<sup>228</sup>; <sup>382</sup>NSSA<sup>385</sup>; <sup>449</sup>NTSS<sup>452</sup>; <sup>1167</sup>NRTY<sup>1170</sup>; <sup>1198</sup>NTSA<sup>1201</sup>; <sup>1225</sup>NVSV<sup>1228</sup>; <sup>1285</sup>NVSG<sup>1288</sup>; <sup>1358</sup>NHST<sup>1361</sup>; <sup>1686</sup>NCSV<sup>1689</sup>.

Foram também identificados 14 regiões correspondente aos prováveis domínios transmembrana: <sup>171</sup>MLCEF...WAIFG<sup>193</sup>, <sup>460</sup>LAPLI...ITVLL<sup>482</sup>,

<sup>503</sup>YLAWL...ITVLL<sup>525</sup>,
<sup>538</sup>FFMFL...IAAVF<sup>560</sup>,
<sup>565</sup>LAAII...PLFAM<sup>584</sup>,
<sup>594</sup>GIMIL...FSLLF<sup>611</sup>,
<sup>632</sup>KLIVV...LMMYF<sup>654</sup>,
<sup>1089</sup>FFQIV...LVRLF<sup>1111</sup>,
<sup>1247</sup>SLYAM...PSTFV<sup>1269</sup>,
<sup>1299</sup>FLFDL...FLVFG<sup>1321</sup>,
<sup>1328</sup>LNNIG...ILMAY<sup>1350</sup>,
<sup>1365</sup>VVMLV...ALMLK<sup>1387</sup>,
<sup>1399</sup>IFRIV...AMLKA<sup>1421</sup> e
<sup>1436</sup>VVGWV...ITLFI<sup>1458</sup>.

-	-	
	-	
	-	
	-	

891   DMK VAVDGLALNFYEGQLTSFLJHNGAGKT TMSILTGLFPPTSGTAYILGKDI BSEMSTI RQNLGVCPQHNVL S42   HsABCA1     542   GNKDRAAVRDLNLNYEGQLTVLLGHNGAGKT TTLSMLTGLFPPTSGRAYISGYEISQDMVQI RKSLGLCPQHDIL SGKAFVAVDNLCVGLSEGEISVLLGHNGAGKS TMNLMTGMLEADGGDCYVYGHSVRRELSAVRQEIGLCPQHNIL GGKAFAAVDDLCWSLNEGEISVLLGHNGAGKS TMNLMTGMLEADGGDCYVYGHSVRRELSAVRQEIGLCPQHNIL GGKAFAAVDDLCWSLNEGEISVLLGHNGAGKS TMNLMTGMLEADGGDCYVYGHSVRRELSAVRQEIGLCPQHNIL GGKAFAAVDDLCWSLNEGEISVLLGHNGAGKS TMNLMTGMVRPDGGDCYVYGLSVRHQLSRVRREIGCPQHNIL GGKRFTAVQNLYWNLREGEISVLLGHNGAGKS TLNMMTGMVRPDGGDCYVYGLSVRHQLSRVRREIGCPQHNIL GGKRFTAVQNLYWNLREGEISVLLGRNGAGKS TLNMMTGMVRPDGGDCYYGLSVRHQLSRVRREIGFCPHNIL GABCA1   HsABCA1     965   FDMLTVEEHIWFYARLKGLSEKHVKAEMEQMALDVGLPSSKLKSKTSQLSGGMQRKLSVALAFVGGSK WILDEPT   HsABCA1     966   FDNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEVKQMLHIIGLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSIGIALIAGSKVILDEPT   HsABCA1     966   FDNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEVKQMLHIIGLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSIGIALIAGSKVILDEPT   HsABCA1     966   FDNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEVKQMLHIIGLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSIGIALIAGSKVILDEPT   HsABCA1     966   FDNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEVKQMLHIIGLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSIGIALIAGSKVILDEPT   HsABCA1     967   WPQLTVREHLDYAAIKGLRGSEKEDAIRRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVALAFVGGSRVILDEPT   HsABCA1     968   WPQLTVREHLDYAAIKGLRGSEKEDAIRRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVAAFVGGSRVILDEPT   HsABCA1     969   GNDAISRRAIWGLQRGSEKEDAIRRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVAAFVGGSRVILDEPT   HsABCA1     960   GVDYSRRGIWEL	824 472 656 656 605	AVFPGQYGIPR-PWYFPCTKSYWFGEESDEKSHPGSNQKRISEICMEEEPTHLKLGVSLQNLVKVYRD AVFPGQFGVPQ-PWYFFIMPSYWCGKPRAVAGKEEEDSDPEKALRNEYFEAEPEDLVAGIKIKHLSKVFRV RVVPKEWGTTKNPLFFIMDPVRWCFCRRR-AGDDDDDGGDGAGDGRAGDGVFEAVDPAVEEAAAVRIRGLRKTFRR RVVPKEWGTTKNPLFFVIDPVRWCFCRRR-AGDADNDG-DVPGDGRAEDGVFEAVDPAVEEAAAVRIRGLRKTFRR AVIPKDWGTNKHPFFFIIDFIRWYFSKGDVYEGGGPDGRAPDGVFEHDG-EEEGIVVRICGLRKVYRR A	HSABCA1 HSABCA3 LmABCCR1 LtABCA1 ToABCA1
542   GNK DRAAVRDLNLNLYEGQITVLLGHNGAGKT TILSMLTGLFPPTSGRAVISGYEISQDMVQIRKSLGLCPQHDIL   HsABCA3     731   GGKAFVAVDNLCWGLSEGEISVLLGHNGAGKSTTMNLMTGMLEADGGDCYVTGHSVRRELSAVRQEIGLCPQHNIL   LmABCCR1     730   GGKAFAAVDDLCWGLNEGEISVLLGHNGAGKSTTMNLMTGMLEADGGDCYVTGHSVRRELSAVRQEIGLCPQHNIL   LmABCCR1     673   GGKRFTAVQNLYWNLREGEISVLLGHNGAGKSTTMNLMTGMLEADGGDCYVTGLSVRHQLSRVRREIGFCPQHNIL   LABCA1     673   GGKRFTAVQNLYWNLREGEISVLLGRNGAGKSTTLNMMTGMVRPDGGDCYVTGLSVRHQLSRVRREIGFCPQHNIL   LABCA1     674   FDMLTVEEHIWFYARLKGLSEKHVKAEMEQMALDVGLPSSKLKSKTSQLSGGMQRKLSVALAFVGGSKVVILLEPT   HsABCA1     675   FDMLTVEEHIWFYARLKGLSEKHVKAEMEQMALDVGLPSSKLKSKTSQLSGGMQRKLSVALAFVGGSKVVILLEPT   HsABCA1     618   FDNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEEVKQMLHIIGLED-KWNSRSRFLSGGMQRKLSVALAFVGGSKVVILLEPT   HsABCA3     807   WPQLTVREHLDYYAAIKGLRGSEKEDAIRRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVALAFVGGSRLVILDEPT   LmABCCR1     806   WPQLTVREHLDYYAAIKGLRGSEKEDAIRRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVAVAFVGGSRLVILDEPT   LMABCCR1     806   WPQLTVREHLEFFAKIKGLKGAELEKAVQRMLHETDMLE-KIDFPAMRLSGGQKRKLSLGLAFVGQSRLVILDEPT   LMABCCR1     807   WFELTCREHLEFFAKIKGLKGAELEKAVQRMLHETDMLE-KIDFPAMRLSGGQKRKLSVAVAFVGGSRLVILDEPT   LMABCCR1     808   SGMDAISSRART   LTREMSSFLEKAVQRMLHETDMLE-KIDFPAMRLSGGQKRKLSVAAFVGGSRLVILDEPT   LMABCCR1     804 <td>891</td> <td>OMK VAVOGLALNFYEGOLTSFLEHNGAGKTITMSILTGLFPPTSGTAVILGKDIRSEMSTIRONLGVCPOHNVL</td> <td>HsABCA1</td>	891	OMK VAVOGLALNFYEGOLTSFLEHNGAGKTITMSILTGLFPPTSGTAVILGKDIRSEMSTIRONLGVCPOHNVL	HsABCA1
731   OGKAF VAVDNL CWSLSEGEI SVLL DHNGAGKS TIMNLMT GML EADGODCYVTGHSVRREL SAVROEI GLCPOHNI L   LmABCCR1     730   OGKAF AAVDDL CWSLNEGEI SVLL DHNGAGKS TIMNLMT GML EADGODCYVTGHSVRHEL SAVROEI GLCPOHNI L   LtABCA1     673   OGKRFT AVONL YWNLREGEI SVLL DHNGAGKS TIMNLMT GML EADGODCYVTGLSVRHOL SAVROEI GLCPOHNI L   LtABCA1     673   DGKRFT AVONL YWNLREGEI SVLL DRNGAGKS TIL NMMT GMVRP DGGDCYVTGLSVRHOL SRVREI GFCPOHNI L   TCABCA1     965   F DMLTVEEHI WFYARLKGLSEKHVKAEMEOMAL DVGLPSSKLKSKTSOLSGOMORKLSVALAFVGGSK VVI L DEPT   HsABCA1     818   F DNLTVAEHL YFYAQLKGLSROKCPEEVKOM, HI I GLED- KWNSRSRFLSGOMORKLSVALAFVGGSK VI L DEPT   HsABCA3     807   WP GLTVREHLDYYAAI KGLMSEKEDAI RRLLAAVDLED- KEHYMSKALSGOGKRKLSVALAFVGGSR VI L DEPT   LmABCCR1     806   WP GLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVDLED- KEHYMSKALSGOGKRKLSVAVAFVGGSR VI L DEPT   LmABCCR1     806   WP GLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVDLED- KEHYMSKALSGOGKRKLSVAVAFVGGSR VI L DEPT   LMABCA1     806   WP GLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVDLED- KEHYMSKALSGOGKRKLSVAVAFVGGSR VI L DEPT   LMABCA1     808   WF ELT CREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVORML HET DMLE- KI DF PAMRLSGOGKRKLSVAAFVGGSR VI L DEPT   LMABCA1     809   SGMDAI SRRAI WOLLOROKSDRTI VLTTHFMDEADULGDRI AI MAKGEL OCCGSSLFLKNUGGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA1     809   SGMDAI SRRAI WOLLOROKSDRTI VLTTHFMDEADULGDRI AI MAKGEL OCCGSSLFL	542	ONKORAAVROLINUNUYEGOI TVLLOHNGAGKT TTUSMUTGUFPPTSGRAYI SOYEI SODMVOI RKSUGUCPOHDILU	HsABCA3
730   GCKAFAAVDDLCWSLNEGEI SVLLOHNGAGKS   TMNLMT GMLEADGGDC YVYGHSVRHELSAVRQEI GLCPQHNILL   LABCA1     673   GCKRFT AVQNLYWNLREGEI SVLLORNGAGKS   TTLNMMT GMVRP DGGDC YVYGLSVRHQLSRVRREI GFCPQHNILL   TCABCA1     965   F DMLTVEEHI WFYARLKGLSEKHVKAEMEQMALDVGLPSSKLKSKTSQLSGGMQRKLSVALAFVGGSK   WYLLDEPT   HSABCA1     818   F DNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEEVKQMLHI I GLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSI GI ALI AGSKVLI LDEPT   HSABCA3     807   WPQLTVREHLDYYAAI KGLMSSEKEDAI RRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVALAFVGGSR LVI LDEPT   LMABCCR1     806   WPQLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVAVAFVGGSR LVI LDEPT   LMABCCR1     806   WPQLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVAVAFVGGSR LVI LDEPT   LMABCCR1     807   WPELT CREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVQRMLHET DMLE-KI DFPAMRLSGGQKRKLSVAVAFVGGSR LVI LDEPT   LMABCCR1     808   WPQLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSLGLAFVGQSR LVFLDEPT   TCABCA1     808   SGMDAI SRRAI WOLLQRGKSDRTI I LSTHHMDEADVLGDRI AI I SHGKLCCVGSSLFLKQLGAGYHMTLVKKDVE   HSABCA3     809   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDRVAI MSKGRLQCGGSSLFLKQKGAGYHMTLVKEF-   HSABCA1     809   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDRVAI MSKGRLQCGGSSLFLKQKGAGYHMTLVKEF-   HSABCA3     820   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDRVAI MSKGRLQCAGSNM	731	GGKAFVAVDNLCWSLSEGEISVLLGHNGAGKSTTMNLMTGMLEADGGDCYVYGHSVRRELSAVRQEIGLCPOHNIL	LmABCCR1
673   GCKRFT AVONLYWNLREGEI SVLLERNGAGKS   TLINMMT GMVRP DGGDCYVYGLSVRHQLSRVRREI GFCPOHNIL   ToABCA1     965   F DMLTVEEHI WFYARLKGLSEKHVKAEMEOMALDVGLPSSKLKSKTSQLSGOMQRKLSVALAFVGGSKVVILDEPT   HsABCA1     618   F DNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEEVKOMLHI I GLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSI GI ALI AQSKVLILDEPT   HsABCA3     807   WP QLTVREHLDYYAAI KGLMGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVALAFVGGSR LVILDEPT   LmABCCR1     806   WP QLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVAVAFVGGSR LVILDEPT   LmABCCR1     806   WP QLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSVAVAFVGGSR LVILDEPT   LMBCCA1     807   WP ELT CREHLEFF AKI KGLKGAELEKAVQRMLHET DMLE-KI DF PAMRLSGGQKRKLSVAVAFVGGSR LVILDEPT   LMBCCR1     808   WP QLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGQKRKLSLGLAFVGQSR LVFLDEPT   ToABCA1     808   WP ELT CREHLEFF AKI KGLKGAELEKAVQRMLHET DMLE-KI DF PAMRLSGGQKRKLSLGLAFVGQSR LVFLDEPT   ToABCA1     1041   AGVDP YS RRGI WELLLKYRQGRTI I LSTHHMDEADVLGDRI AI I SHGKLCCVGSSLFLKNQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA3     823   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCGGSSLFLKQKYGAGYHMTLVKEF-HSABCA3   HaBCCR1     824   AGMDVGARRHTWELLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVF-LIMBCCR1   HABCCA1     824   AGMDVGARRHTWELLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNSLFLKSRLGLG	730	GGKAFAAVDDL CWSL NEGEL SVLLGHNGAGKSFTMNLMT GMLEADGGDCYVYGHSVRHEL SAVRQEL GLCPQHNLL	L±ABCA1
B     965   F DMLTVEEHI WFYARLKGLSEKHVKAEMEQMALDVGLPSSKLKSKTSQLSGOMORKLSVALAFVGGSKVVILLEPT   HsABCA1     618   F DNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEEVKOMLHI I GLED-KWNSRSRFLSGOMRRKLSI GLALI AGSKVLILLEPT   HsABCA3     807   WP QLTVREHLDYYAAI KGLMGSEKEDAI RELLAAVOLED-KEHYMSKALSGOMRRKLSVALAFVGGSFLVILLEPT   LmABCCR1     806   WP QLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RELLAAVOLED-KEHYMSKALSGOKRKLSVAVAFVGGSFLVILLEPT   LmABCCR1     806   WP ELT CREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVQRMLHET DMLE-KI DFPAMRLSGGOKRKLSVAVAFVGGSFLVILLEPT   LABCA1     749   WP ELT CREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVQRMLHET DMLE-KI DFPAMRLSGGOKRKLSLGLAFVGQSRLVFLDEPT   ToABCA1     1041   AGVD PYS REGI WELLLKYRQGRTI I LSTHHMDEADVLGDRI ALI SHGKLCCVGSSLFLKNQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA3     893   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDRI ALI MAKGEL QCCGSSLFLKQK YGAGYHMTLVKEF-HSABCA3   HsABCA1     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRLQCAGS NMFLKSKLGVGFVLTMSVVF-LIMABCCR1   MABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRLQCAGS NMFLKSKLGVGFVLTMSVVS-LIABCA1   IABCA1     824   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRLQCAGS NMFLKSKLGVGFVLTMSVVS-LIABCA1   IABCA1     824   AGMDVGARRHTWELLKRMSSFHTILLTTHYMDEADLLGHRI GI MKNGSLQCS SSLFLKSRLGLGYSLTI AMVP-TOABCA1   TOABCA1	673	GGKRFT AVONLYWNLREGEI SVLLISRNGAGKSTTLINMMT GMVRP DGGDCYVYGLSVBHOLSRVRREI GFCPOHNIL	To ABCA1
965   F DMLTVEEHI WEYARLKGLSEKHVKAEMEQMAL DVGLPSSKLKSKTSQLSGGMQRKLSVALAFVGGSKVVILLEPT   HsaBCA1     618   F DNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEEVKQMLHI I GLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSI GLALI AGSKVLLLEPT   HsABCA3     807   WPQLTVREHLDYYAAI KGLMGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGOKRKLSVALAFVGGSRLVLDEPT   LmABCCR1     806   WPQLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGOKRKLSVAVAFVGGSRLVILDEPT   LmABCCR1     806   WPELTCREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVQRMLHETDMLE-KI DFPAMRLSGGOKRKLSLGLAFVGQSRLVILDEPT   LABCA1     749   WPELTCREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVQRMLHETDMLE-KI DFPAMRLSGGOKRKLSLGLAFVGQSRLVFLEPT   ToABCA1     1041   AGVDPYSRGI WELLLKYRQGRTI LSTHHMDEADVLGDRI ALI SHGKLCCVGSSLFLKNQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA3     803   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHEMDEADVLGDRI ALI SHGKLCCVGSSLFLKQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA3     804   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCGGSSLFLKQKYGAGYHMTLVKEF-   HsABCA3     802   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVF-   LmABCCR1     811   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVF-   LMABCCR1     824   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNSLFLKSRLGLGYSLTI AMVF-   ToABCA1		В	
618   FDNLTVAEHLYFYAQLKGLSRQKCPEEVKOMLHIIGLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSIGIALIAGSKVLILDEPT   HsaBCA3     807   WFQLTVREHLDYYAAI KGLMGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGOKRKLSVAI AFVGGSRLVILDEPT   LmABCCR1     806   WFQLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVOLED-KEHYMSKALSGGOKRKLSVAI AFVGGSRLVILDEPT   LmABCCR1     806   WFELTCREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVQRMLHETDMLE-KIDFPAMRLSGGOKRKLSLGLAFVGQSRLVFLDEPT   LABCCA1     749   WFELTCREHLEFFAKI KGLKGAELEKAVQRMLHETDMLE-KIDFPAMRLSGGOKRKLSLGLAFVGQSRLVFLDEPT   ToABCA1     1041   AGVDPYSRRGI WELLLKYRQGRTIILSTHHMDEADVLGDRI AFI SHGKLCOVGSSLFLKNQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA3     803   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADVLGDRI AFI SHGKLCOVGSSLFLKNQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA3     804   SGMDAI SRRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLOCGSSLFLKQKYGAGYHMTLVKEF-   HsABCA3     805   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLOCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVF-   LmABCCR1     811   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLOCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVF-   LABCA1     824   AGMDVGARRHTWELLRMSSFHTILLTTHYMDEADLLGDTVAI MSKGRLOCAGSNSLFLKSRLGLGYSLTI AMVF-   ToABCA1	965	FDMLTVEEHIWFYARLKGUSEKHVKAEMEQMALDVGUPSSKLKSKTSQLSGGMQRKUSVALAFVGGSKVVILUEPT	HsABCA1
807   WP QLT VREHLDY YAALKGLMOSEKEDAL RRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGOKRKLSVALAFVGGSRLVILDEPT   LmABCCR1     806   WP QLT VREHLDY YAALKGLROSEKEDAL RRLLAAVDLED-KEHYMSKALSGOKRKLSVAVAFVGGSRLVILDEPT   LtABCA1     749   WP ELT CREHLEFFAKI KGLKOAELEKAVORMLHET DMLE-KI DFPAMRLSGOKRKLSLGLAFVGOSRLVILDEPT   ToABCA1     1041   AGVDP YS RRGI WELLLKYROGRTI ILSTHHMDEADVLGDRI AFI SHOKLCOVGSSLFLKNOLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA1     693   SOMDALS RRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDRI AFI SHOKLCOVGSSLFLKQKYGAGYHMTLVKEP-HSABCA3   HsABCA3     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKORLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP-LmABCCR1   LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKORLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP-LMABCCR1   LABCA1     824   AGMDVGARRHTWSLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKORLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVSLIABCA1   LABCA1     824   AGMDVGARRHTWELLRRMSSFHTILLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKORLQCAGSNFLKSKLGVGFVLTMSVVSLIABCA1   LABCA1	618	FDNLTVAEHLYFYAOLKGLSROKCPEEVKOMLHIIGLED-KWNSRSRFLSGGMRRKLSIGFALIAGSKVLILDEPT	HsABCA3
806   WP OLT VREHLDYYAAI KGLROSEKEDAI RRLLAAVDLED- KEHYMSKALSGGOKRKLSVAVAFVGGSRLVI LDEPT   LABCA1     749   WP ELT CREHLEFFAKI KGLKOAELEKAVORMLHET DMLE- KI DFPAMRLSGGOKRKLSLGLAFVGOSRLVFLDEPT   ToABCA1     1041   AGVDP YS RRGI WELLLKYROGRTI I LSTHHMDEADVLGDRI AFI SHOKLCOVGSSLFLKNQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA1     693   SOMDAI SRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDRI AFMAKGELOCCGSSLFLKQLGT GYYLTLVKKDVE   HsABCA3     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRL QCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP-   LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRL QCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP-   LmABCCR1     824   AGMDVGARRHTWSLKEMASSFHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRL QCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP-   LABCA1     824   AGMDVGARRHTWELLRRMSSFHTI LLTTHFYMDEADLLGDT VAI MSKGRL QCAGS SLFLKSRLGLGYSLTI AMVP-   ToABCA1	807	WPOLTVREHLDYYAAI KOLMOSEKEDAI RRLLAAVOLED KEHYMSKALSGOOKRKLSVAI AFVOOSRLVI LDEPT	LmABCCR1
749   WP ELT CREHL EFF AKI KGLKGAEL EKAVORMUHET DMLE- KI DF PAMRL SGGGKRKLSLGL AFVGQSRLVFLDEPT   To ABCA1     1041   AGVD PYS RRGI WELLLKYRQGRTI I LSTHHMDEADVLGDRI AFI SHGKLCDVGSSLFLKNQLGT GYYLTLVKKDVE HSABCA1     693   SOMDAI SRAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDRI AFMAKGELQCCGSSLFLKQLGT GYYLTLVKKDVE HSABCA3     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP - LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP - LmABCCR1     824   AGMDVGARRHTWSLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVS - LtABCA1     824   AGMDVGARRHTWELLRRMSSFHTI LLTTHFMDEADLLGDT VAI MSKGRLQCGSGSSLFLKSRLGUSSLTI AMVP - TO ABCA1	806	WPOLTVREHLDYYAAI KGLRGSEKEDAI RRLLAAVDLED- KEHYMSKALSGGQKRKLSVAVAFVGGSRLVI LDEPT	L±ABCA1
1041   AGVDPYSREGI WELLLKYRQGRTI I LSTHHMDEADVLGDRI AFI SHOKLCOVGSSLELKNQLGTGYYLTLVKKDVE HsABCA1     693   SOMDAI SREAI WOLLQRQKSDRTI VLTTHEMDEADLLGDRI AFMAKGELQCCGSSLELKQKYGAGYHMTLVKEP HsABCA3     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHEMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     824   AGMDVGARRHTWELLRRMSSFHTILLTTHYMDEADLLGHRI GLMKNGSLQCSGSSLFLKSRLGLGYSLTI AMVP TCABCA1	749	WPELTCREHLEFFAKI KOLKOAELEKAVORMLHETDMLE- KI DFPAMRLSGGOKRKLSLGLAFVGOSRLVFLDEPT	To ABCA1
1041   AGVDPYSREGI MELLLKYRQGRTI I LSTHHMDEADVLGDRI AFI SHGKLCZVGSSLFLKNQLGTGYYLTLVKKDVE HsABCA1     693   SOMDAI SREAI MOLLQRQKSDRTI VLTTHFMDEADLLGDRI AFMAKGELQCCGSSLFLKQKYGAGYHMTLVKEP - HsABCA3     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP - LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP - LmABCCR1     824   AGMDVGARRHTWSLKEMAKWHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVS - LtABCA1     824   AGMDVGARRHTWELLRRMSSFHTI LLTTHFMDEADLLGDTVAI MSKGRLQCSGSSLFLKSRLGUSSLTI AMVP - TCABCA1			
693   SOMDALSRAALWOLLQRQKSDRTIVLTTHEMDEADLLGDRIALMAKGELQCCGSSLELKQKYGAGYHMTLVKEP HSABCA3     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTLLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTLLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTLLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTLLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVS LtABCA1     824   AGMDVGARRHTWSLLKEMASSEHTLLTTHEMDEADLLGHRIGIMKNGSLQCSGSSLELKSRLGLGYSLTIAMVP TCABCA1	1041	AGVOPYSREGI MELLIKYROGRTTI LSTHHMDEADVLGORI AFI SHOKLCOVGSSLFLKNOLGT GYYLTIVKKDVE	HsABCA1
882   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTILLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     881   AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTILLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     824   AGMDVGARRHTWSLLREMASSEHTILLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP LmABCCR1     824   AGMDVGARRHTWSLLREMASSEHTILLTTHEMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMELKSKLGVGEVLTMSVVP TCABCA1	693	SOMDAL SRRAL WOLLOROKSDRTI VLTTHFMDEADLLOORI ALMAKGELOCCOSSLFLKOKYSAGYHMTLVKEF	HsABCA3
881 AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTILLTTHFMDEADLLGDTVAIMSKORLOCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVSLLABCA1 824 AGMDVGARRHIWELLRRMSSFHTILLTTHYMDEADLLGHRIGIMKNGSLOCSGSSLFLKSRLGLGYSLTIAMVPTCABCA1	882	AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTILLTTHFMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVP-	LmABCCR1
824 AGMDVGARRHIMELLRRMSSFHTILLTTHYMDEADLLGHRIGIMKNOSLOCSGSSLFLKSRLGLGYSLTIAMVP TCABCA1	881	AGMDVGARRHTWSLLKEMAKWHTILLTTHFMDEADLLGDTVALMSKGRLQCAGSNMFLKSKLGVGFVLTMSVVS-	LtABCA1
	824	AGMDVGARRHI WELLRRMSSFHTILLTTHYMDEADLLGHRI GIMKNGSLQCSGSSLFLKSRLGLGYSLTIAMVP-	TcABCA1

Π

1865	LSPLNDEDEDVRRERORILDGGGQNDILEIKELTKIYRRKR-KPAVDRICVGIPPGECFGL	HsABCA1
1339	LRRRRTLTELYTRMPVLPEOQDVADERTRILAPSPDSLLHTPLIIKELSKVYEORVPLLAVDRLSLAVQKGECFGL	HsABCA3
1473	NPDGAAEVIEDEDGDVAAERAVLEGGER-EGOLVRVLNLRKEYPNGK-VAVRNIALGVRPGEVFGF	LmABCCR1
1472	NPDGAAEVIEDEDEDVAAERAVLEGGER-EGOLVRVLNLRKEYPNGK-VAVRNIALGVRPGEVFGF	LtABCA1
1402	SVQRSTNQEIPDQDTDVEEERNAVYMAKQMGIVNSV/TVCGLHKKYSNGK-VAVRNLTFGVLPGEIFGF	TcABCA1
1925 1415 1538 1537 1470	A LOVNGAGKSSTFKMLTGDTTVTRODAFLNRNSILSNIHEVHONMGYCPOFDAITELLTGREHVEFFALLROVPEKE LGFNGAGKTTTFKMLTGEESLTSCDAFVGGHRISSDVGKVRORIGYCPOFDALLDHMTGREMLVMYARLRGIPERH LGTNGAGKTTTISILCGEFYPTSGRAYVCGNDIVTESSEALRCIGYCPOFDACLDLLTVEEHLYLYAGVRGISSRA LGTNGAGKTTTISILCGEFYPTSGRAYVCGNDIVTESSEALRCIGYCPOFDACLDLLTVEEHLYLYAGVRGISSRA LGTNGAGKTTTIAMLCQQLLPTSGSAAICGHDILEESSEALRCIGYCPOFDACLELLTVEEQLQLYAGVRGIVRQ	HsABCA1 HsABCA3 LmABCCR1 LtABCA1 TcABCA1
2001	VGKVGEWAIRKLGLVKYGEKYAGNYSGGNKRKLSTAMALIGOP VVFLDEPTTGMDPKARRFLWNCALSVVKEGRS	HsABCA1
1491	IGACVENTLRGLLEPHANKLVRTYSGGNKRKLSTGIALIGEPAVIFLDEPSTGMDPVARRLWOTVARARESGKA	HsABCA3
1614	CDRVVRGLMKLCGLTEYRRTKSHELSGGNRRKLSVAVSLIGGPFVVFLDEPSAGMDPVARRGLWNAIETVADN-CS	LmABCCR1
1613	CDRVVRGLMKLCGLTEYRRTKSHELSGGNRRKLSVAVSLIGGPFVVFFDEPSAGMDPVARRGLWNAIETVADN-CS	LtABCA1
1546	CDNIVSGLLQLCELVEYRDTLAHELSGGNRRKLSVAIALVGGPPVLFLDEPSAGMDPIARRGLWNAIEAVSDN-CS	TeABCA1
2077 1567 1689 1688 1621	VALTSHSMEECEAL CTRMAINM/NORFROLOSVQHLKNRFODOYTIVVRIAG-SNPDLKPVQDFFGLAFPGSVPK IIITSHSMEECEAL CTRLAIM/QOQFKCLOSPQHLKSKFGSGYSLRAKVQSEG-QQEALEEFKAFVDLTFPGSVLE VALTTHHLEEVEALAHRVAIM/DGTLRCIGDKTHLKQKYGTGFEVAVRVAD-ESPEVMAGVELFFEEFPSSKLT VALTTHHLEEVEALAHRVAIM/DGTLRCIGDKTHLKQKYGTGFEVAVRVAD-ESPEVMAGVELFFEEFPSSKLT VALTTHHLEEVEALAHRVAIM/DGTLRCIGDKTHLKQKYGTGFEVAVRVAD-ESPEVMAGVELFFEEFPSSKLT VALTTHHLEEVEVLAHRVAIM/DGTLRCIGDQTHLKNKFGSQYEMSIRIESAELYEPIVNFVTEMFPNATLN	HsABCA1 HsABCA3 LmABCCR1 LtABCA1 TcABCA1

#### *Figura 13.* Alinhamento das seqüências de aminoácidos das NBDs de diferentes organismos. Apenas as regiões correspondentes às seqüências de aminoácidos das duas NBDs (I e II) das transportadoras ABC indicadas estão representadas. HsABCA1 e HsABCA3 são originárias

de *Homo sapiens*; **LmABC-CR1** (descrita nesse trabalho); LtABCA1 foi descrita em *L. (L.) tropica* e TcABCA1 descrita em *Trypanosoma cruzi*. Os retângulos representam as regiões conservadas Walker A (A) e Walker B (B). A identidade dos resíduos de aminoácidos esta em amarelo. As regiões sublinhadas representam a assinatura das transportadoras ABC na LmABC-CR1. Os números à esquerda representam a posição do aminoácido na seqüência da proteína.

#### 6. Análise do efeito da Pentamidina em células resistentes a CsA

Verificamos no ítem anterior, que as análises comparativas das seqüências completas de aminoácidos da LmABC-CR1 com a LmPRP1 (que confere resistência a Pentamidina após transfecção mostraram um baixo grau de identidade (27,2 %), apesar de ambas as proteínas pertencerem a superfamília das transportadoras ABC. Tendo em vista este fato, foram realizados testes funcionais em presença de Pentamidina (PEN) com as células transfectadas com a deleção cosCip IC7 e sua deleção derivada, a construção cosCip IC7 $\Delta$ 2kb *Bgl*II (figura 8) com o objetivo de analisarmos ação da LmABC-CR1 diante de um desafio com Pentamidina.

Para isto, células LmFA1 transfectadas com o DNA da deleção cosCip IC7 e com o DNA da construção cosCip IC7 $\Delta$ 2kb *Bgl*II foram submetidas a culturas em presença de PEN para obtenção de curvas de inibição de crescimento em concentrações crescentes do composto , que variaram de 1 a 6 µg/ml. O controle das curvas foi realizado da mesma maneira como descrito para os testes com CsA. A análise estatística dos resultados foi realizada a partir das curvas de inibição de crescimento como descrito no item 13.3 de materiais e métodos. Analisando a tabela 5, pudemos observar que as células transfectadas com o DNA das deleções cosCip IC7 assim como com o DNA da construção cosCip IC7 $\Delta$ 2kb *Bgl*II apresentam um fenótipo negativo para a resistência a Pentamidina.

Este resultado esta de acordo a baixa identidade (27,2 %) verificada na comparação dos aminoácidos dessas duas transportadoras ABC de *L. (L.) major* reforçando a idéia de que eventualmente essas proteínas possam pertencer a grupos evolutivos deferentes.

Linhagem celular	$IC_{50} \pm DP$	IR	р	F
	[µg/mL]			
LmFA1-cLHYG	2,4±0,4	1,0		
cosCip IC7	2,2±0,5	0,9	NS	Neg
$\cos$ Cip IC7 $\Delta$	1,9±0,3	0,8	NS	Neg

Tabela 5. Representação das concentrações medias necessárias para inibir 50 % do crescimento celular (IC<sub>50</sub>) e do índice de resistência (IR) ± desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. Os cálculos estatísticos do IR estão definidos na legenda da tabela 3 e item 13.3 de materiais e métodos.

#### 7. Análise do efeito da CsA em diferentes espécies de leishmânia

Um dos mecanismos de resistência das leishmânias a compostos antiparasitários é realizado por proteínas transportadoras, que promovem o fluxo destes compostos para fora da célula (Oullette e cols., 1990), baseado nesse fato, nossa hipótese seria que a super expressão dessas proteínas transportadoras poderiam impedir a ação direta da CsA no parasito por aumento do efluxo de CsA. Uma vez que identificamos mais uma proteína transportadora (LmABC-CR1) em *L. (L.) major*, entendemos que seria importante avaliar o efeito antiparasitário da CsA em diferentes espécies de leishmânias.

Para isto, foram realizadas culturas das diferentes espécies para a obtenção de curvas de inibição de crescimento em concentrações crescentes de CsA (item 13.2 de materiais e métodos). Porém os resultados preliminares obtidos a partir das curvas realizadas com as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* apresentaram padrões de resistência a CsA muito maiores do que aqueles encontrados para as formas avirulenta (LmFA1) e virulenta (LmFV1) de *L. (L.) major*. Com base nestes resultados, foram necessárias altas concentrações de CsA para que pudéssemos

determinar o IC<sub>50</sub> de cada espécie. Como o diluente utilizado no preparo da CsA, etanol (EtOH) poderia interferir em nossos resultados, uma vez que o EtOH é tóxico para as células em cultura, foi necessário analisar primeiramente o efeito individual do EtOH no crescimento das formas promastigotas das *L*. (*L*.) major, *L*. (*L*.) amazonensis. *L*. (*V*.) braziliensis e *L*. (*L*.) chagasi.

Para esta análise as diferentes espécies do parasito foram submetidas a culturas em meio M199 contendo concentrações crescentes de EtOH (variando de 0 a 14%), e a concentração necessária para inibir 25 % do crescimento celular (IC<sub>25</sub>) foi determinada baseada nas CICs obtidas (item 13.2 de materiais e métodos). Podemos observar analisando o gráfico da figura 14 que o IC<sub>25</sub> para o EtOH nas 4 espécies de leishmania testadas variava entre 1,37 % a 2,54% (legenda da figura 14), o que nos levou a considerar que uma concentração menor que 1,3 % de EtOH poderia ser considera segura para a viabilidade dos parasitos em cultura.



Figura 14. Curvas de inibição de crescimento (CICs) em presença de Etanol. As quatro espécies de leishmânia foram avaliadas quanto a sensibilidade ao etanol. Os valores médios de IC<sub>25</sub> (+/- o desvio padrão) foram: 1,37 ± 0,12 % para L. (L.) major, 1,71 ± 0,29 % para L. (L.) chagasi; 2,35 ± 0,52 % para L. (L.) amazonensis e 2,54 ± 0,50 % para L (V.) braziliensis.

Dessa forma, consultando os valores da concentração e solubilidade da CsA em EtOH utilizados no preparo de nossas soluções estoque, verificamos que para uma concentração de 1,3 % de EtOH a concentração correspondente de CsA estava por volta de 100  $\mu$ g/mL. Portanto, estabelecemos que uma concentração de até 100  $\mu$ g/mL de CsA seria segura para a avaliação da inibição de crescimento nas diferentes espécies de leishmânia em estudo. Acima desse valor a ação sobre o parasito poderia ser devida ao EtOH e não propriamente à CsA.

Após estabelecer parâmetros de segurança relacionados a possíveis interferências do diluente nos experimentos com altas concentrações de CsA, as formas promastigotas de *L.* (*L.*) *amazonensis, L.* (*V.*) *braziliensis. L.* (*L.*) *chagasi* e as duas cepas de *L.* (*L.*) *major* (Virulenta e Avirulenta) foram cultivadas em concentrações crescentes de CsA que variaram de 0,39  $\mu$ g/mL a 100  $\mu$ g/mL (item 13,2 de materiais e métodos).

Analisando os dados da figura 15 que mostra as CICs destas culturas em presença de CsA, foi possível obter um IC<sub>50</sub> médio de 7,75±1,61 µg/mL para *L.* (*L.*) major A1, 7,85 ± 1,07 µg/mL para *L.* (*L.*) major V1 28,1±1,56 µg/mL para *L.* (*L.*) amazonensis, 26,2±2,47 µg/mL para. *L.* (*V.*) braziliensis e 33,7±2,3 µg/mL *L.* (*L.*) chagasi.



*Figura 15*. Curvas de inibição de crescimento (CICs) das diferentes espécies estudadas após incubação em concentrações crescentes de CsA.

Os resultados obtidos a partir dessas CICs (figura 15) mostram que as células promastigotas de *L*. (*L*.) major (de ambas as cepas) são em média cerca de 3 vezes mais susceptíveis a CsA que as demais espécies estudadas. Aparentemente a virulência da cepa de *L*. (*L*.) major, parece não estar relacionada com a susceptibilidade a CsA nestes nossos testes. Por outro lado, a cepa avirulenta de *L*. (*L*.) major , LmFA1 (figura 15, em preto) apresenta uma tolerância maior a partir da concentrações de CsA acima de 15  $\mu$ g/mL quando comparada com LmV1 (figura 15, em vermelho).

### 8. Análise molecular da região relacionada com a resistência a CsA em leishmânia por "Southern Blot"

Com a finalidade de conhecer melhor a distribuição e presença do gene *LmABC-CR1* nas 4 diferentes espécies de Leishmania [*L. (L.) amazonensis; L. (V.) braziliensis, L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major* cepa avirulenta, LmFA1], o DNA genômico de cada uma dessas espécies foi extraído e digerido com as enzimas de
restrição *Apa*I, *Pae*I e *Sma*I, e submetidos à corrida eletroforética, seguida de transferência dos DNAs para uma membrana de Nylon e hibridização com uma sonda marcada radiativamente (fragmento *Snab*I de 0,7 kb derivado do gene *LmABC-CR1*; figura 16), utilizando a técnica de Southern-blot (item 18 de materiais e métodos).

Para obtenção da sonda utilizada na hibridização, o DNA do inserto cosCip IC7 foi digerido com a enzima de restrição *Sna*BI e o fragmento de 0,7 kb originado nessa digestão foi purificado e isolado do gel de agarose utilizando um 'kit' de purificação. Este fragmento de 0,7 kb foi então marcado com <sup>32</sup>P pela técnica do "random primer" (item 19 de materiais e métodos) e utilizado como sonda nos testes de Southern-blot.



Figura 16. Mapa de restrição do cosmídio cosCip IC7. Em vermelho está representada a ORF da LmABC-CR1. O fragmento SnaBI de 0,7 kb (717 pb) utilizado como sonda nas reações de southern-blot esta representado em preto. O tamanho em kb de alguns produtos de digestão estão representados. A- ApaI; P- PaeI; N- SnaBI; M- SmaI.

Além dos DNAs genômicos das 4 espécies de leishmânia, analisamos também como controle positivo da reação o DNA do cosCip IC7 digerido com a enzima *Apa*I, que entre outros, origina um fragmento de 3,7 kb contendo a totalidade do fragmento *Sna*BI de 0,7 kb utilizado como sonda e presente no gene *LmABC-CR1* (figura 16). Finalmente, hibridizamos também o DNA do cosmídio cosPEN1-A  $\Delta$ *Hind*III que contém o gene da PRP1, que está relacionada com resistência a Pentamidina (Coelho e cols., 2003), cuja seqüência de aminoácidos apresentou uma

baixa identidade quando comparada a seqüência de aminoácidos da LmABC-CR1. O DNA desse cosmídio foi previamente digerido com a enzima *Hind*III, com a finalidade de originar os 4 fragmentos característicos dessa digestão e que contém aproximadamente 12, 8, 4 e 1 kb. Sabemos de análises anteriores que o gene *PRP1* esta contido entre os fragmentos de aproximadamente 12 e 4 kb (Coelho e cols., 2003).



Figura 17. Organização genômica do gene LmABC-CR1. Autorradiograma mostrando a hibridização dos DNAs genômicos de L. (L.) amazonensis (a); L. (V.) braziliensis (b) ;L. (L.) chagasi (c) e L. (L.) major (m), digeridos com as enzimas indicadas utilizando como sonda o fragmento de 0,7 kb SnaBI do gene LmABC-CR1 marcado com P<sup>32</sup> (figura 16). Os DNAs dos cosmídios cosCip IC7 digerido com ApaI (IC7) e cosPEN1-A ΔHindIII digerido com HindIII (PRP1) também estão representados (ver texto). As condições de lavagem foram de baixa estringência.

Analisando a figura 17 podemos verificar primeiramente um evidente polimorfismo do genoma de *L. (L.) major* quando comparado com os genomas das outras 3 espécies avaliadas.

A análise do padrão de hibridização encontrado após a digestão com a enzima *Pae*I por exemplo, revelou uma banda única de cerca de 8 kb no genoma de

L. (L.) major (como esperado; figura 16), enquanto que nas outras 3 espécies um fragmento um pouco maior (com de cerca de 9 kb) foi reconhecido pela sonda utilizada.

Já na hibridização com os DNAs genômicos digeridos com *Apa*I, um fragmento 3,7 kb foi reconhecido pela sonda *Sna*BI de 0,7 kb no genoma de *L. (L.) major* o que também corrobora as previsões do mapa representado na figura 16). No entanto, um segundo fragmento com cerca de 6 kb também foi reconhecida no genoma de *L. (L.) major* que pode estar representando o fragmento de cerca de 6kb contíguo ao fragmento anterior, e que também contém parte do gene *LmABC-CR1* (figura 16). Nesta mesma hibridização os DNAs de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* apresentaram um padrão semelhante entre si e bastante distinto do encontrado no genoma de *L. (L.) major*, e infelizmente o DNA de *L. (V.) braziliensis* parece ter degradado durante a digestão *Apa*I, o que dificulta uma melhor análise.

Por outro lado na reação de hibridização do DNA genômico de *L. (L.) major* digerido com *Sma*I verificamos um padrão sugestivo de duas bandas próximas da região de 3 kb, o que esta de acordo com os resultados do mapa da figura 16. Já o padrão de hibridização verificado com os DNAs das outras 3 espécies avaliadas é bastante semelhante (apresentando no mínimo 4 bandas bem definidas entre 2 e 18 kb), e novamente bastante distinto do verificado para o DNA de *L. (L.) major*.

Na hibridização da sonda *Sna*BI com o DNA do cosmídio cosCip IC7 digerido com *Apa*I, verificamos a presença de cinco bandas, sendo uma majoritária com cerca de 4 kb e que corresponde ao fragmento esperado de 3,7 kb (figura 16), entretanto as outras 4 bandas não eram esperadas e podem refletir a hibridização com produtos de digestão parcial do DNA do cosmídio, já que são todas maiores que 4 kb e apresentam tamanhos compatíveis com esse padrão.

Na hibridização da sonda *Sna*BI com o DNA do cosmídio cosPEN1-A  $\Delta$ *Hind*III digerido com *Hind*III, verificamos a presença de duas bandas, uma majoritária com cerca de 12 kb e uma outra menor bem menos intensa que pode ser de origem inespecífica por conta da baixa estringência da reação.

## V. Discussão

A Ciclosporina A (CsA) possui um extraordinário espectro de atividades biológicas, do qual a imunossupressão é a mais conhecida (Fliri e cols., 1993). Possui também um potente efeito antiparasitário em diversos microorganismos entre eles as leishmanias (Pons e cols, 1988, Chappell e Wastling, 1992). Uma série de trabalhos científicos tem sido publicada nos últimos anos discutindo esse tema, sendo que é aceito na literatura que a CsA possui um mecanismo de ação variado em leishmanias (uma revisão do tema se encontra em: Chappell e Wastling, 1992). Alguns autores sugerem, por exemplo, que a ação da CsA em Leishmania (Leishmania) major inibe a ação da calcineurina (uma fosfatase específica para grupos serina/treonina), após a formação de um complexo com a ciclofilina do hospedeiro ou do parasito (Horeauf e cols., 1997, Rascher e cols., 1998; Dutta, e cols, 2001). Uma segunda linha de pesquisa defende um mecanismo de ação direto e comum para vários parasitos, como por exemplo, na ruptura intestinal de Shistosoma mansoni (Pons, e cols., 1988, Munro e cols., 1991). Ainda nessa linha, foi sugerido que o crescimento de P. falciparum in vitro era inibido pela ação da CsA, possivelmente pelo bloqueio das funções celulares cálcio dependente, uma vez que a ligação da CsA com a calmodulina bloqueia os canais de cálcio do parasito (Scheibel e cols., 1987). Por outro lado, Solbach e cols. (1986a, b) vêm atribuindo os efeitos anti L. (L.) tropica e anti L. (L.) major da CsA a fatores imunológicos do hospedeiro, uma vez que não foi observado alterações in vitro na viabilidade das células promastigotas de L. (L.) major, após tratamento com  $3 \mu g/mL$  de CsA.

Α concentração terapêutica humana da CsA utilizada como imunossupressora em transplantes de órgãos é bastante discutida e deve ser sempre utilizada com bastante critério (Pollard e cols., 2003). Dependendo de cada caso, pode-se administrar até 6 mg/kg/dia, o que corresponde a uma concentração sérica de CsA de cerca de 50 a 150 ng/ml. Em camundongos, a concentração tóxica é de cerca de 5 µg/mL (Chappell e Wastling, 1992). A concentração média de CsA utilizada na maior parte dos experimentos desse trabalho de mestrado foi em torno de 1 a 50 $\mu$ g/mL (figura 5), sendo que as células promastigotas de L. (L.) major da cepa FriedlinA1 e V1 (LmFA1 e LmFV1), cultivadas em meio M199 suplementado com Soro Fetal Bovino 10 %, não resistiam a concentrações de CsA superiores a  $7,75\mu$ g/mL e  $7,85\mu$ g/mL (valor médio do IC<sub>50</sub> para LmFA1).

Vale lembrar que os cosmídios estudados foram isolados a partir de altas concentrações de CsA (acima de 30  $\mu$ g/mL - tabelas 1 e 2), porém os valores médios de IC<sub>50</sub> encontrados nas células resistentes a CsA (contendo o gene amplificado - relacionado a resistência a CsA) foi de no máximo duas vezes os valores de IC<sub>50</sub> das LmFA1. Isto se deve ao fato de que o meio de cultura utilizado nos experimentos de seleção dos cosmídios resistentes, foi o meio M199 sólido, que exige em média o dobro das concentrações do composto em relação ao meio liquido (Cotrim e cols., 1999).

Obviamente, verificamos que a concentração de CsA utilizada em nossas culturas em meio líquido foi maior que a concentração sérica de segurança em humanos, e pouco maior que a concentração tóxica aceita para os camundongos. Entretanto, nessa fase do trabalho não estamos estudando ainda a relação da ação antiparasitária da CsA com o hospedeiro, e sim tentando entender o mecanismo de ação da CsA nas leishmânias.

Utilizando as técnicas de transfecção e superexpressão gênica em presença de CsA selecionamos quatro populações de cosmídios capazes de conferir resistência a CsA em LmFA1. O padrão de digestão do DNA de cada uma dessas populações selecionadas mostrou que os insertos representavam dois *loci* independentes (denominados cosCip I e cosCip II), uma vez que três delas apresentaram várias bandas em comum (figura 1). No processo de seleção verificamos também que o cosCip II foi obtido a partir de apenas uma colônia resistente, enquanto que o cosCip I foi isolado a partir de 19 colônias resistentes distribuídas entre as 3 populações (cosCip IA, cosCip IB e cosCip IC; tabela 2), sugerindo que o DNA do inserto do cosmídio cosCip I pudesse expressar uma proteína de maior importância relacionada com a resistência com a CsA. Dessa forma, passamos a trabalhar com esse *locus*.

Os cosmídios cosCip IA, cosCip IB cosCip IC foram selecionados a partir de uma genoteca construída no vetor cLHYG com fragmentos do DNA genômico de LmFA1 cerca de 30-45 kb de extensão (Ryan e cols., 1993, Descoteaux e cols., 1994). Fragmentos dessa extensão podem ser vantajosos durante a seleção dos cosmídios expressores, pois se trabalha com um número menor de clones independentes (Cotrim e cols., 1999). Por outro lado, esses fragmentos são grandes para a identificação de um *locus* funcional (no caso, relacionado com a resistência a CsA), exigindo uma série de procedimentos antes da seqüência de nucleotídeos e identificação do gene responsável pela resistência a CsA. Sabemos de nossa experiência com o mapeamento de outros cosmídios (Cotrim e cols., 1999 e Coelho e cols., 2003 e 2004), que a obtenção de 4 ou mais fragmentos do inserto é importante para se prosseguir com os experimentos de mapeamento e deleção do inserto. Portanto, devido aos padrões de restrição encontrados nos cosmídios cosCip IA e cosCip IB e cosCip IC após digestão total com algumas enzimas disponíveis em nosso laboratório (figuras 1, 3 e 4-A), iniciamos o processo de mapeamento utilizando a enzima *Apa*I para o cosmídio cosCip IC (que apresentou o maior número de sítios reconhecidos por esta enzima entre as três populações de cosmídios desse *locus*).

Paralelamente a esse trabalho, nosso grupo de pesquisa vem realizando uma série de análises com diversos cosmídios relacionados a diferentes compostos com ação anti-leishmânia. Temos observado que durante o processo de mapeamento do inserto de vários desses cosmídios como, por exemplo: cosTbf1, cosTbf2, cosTbf3, cosTbf4, cosTbf6 e cosItz1 (que conferem resistência a Terbinafina e Itraconazol - inibidores da biossíntese do Ergosterol), ou cosTub1 (que confere resistência a Tubercidina, um análogo do Alopurinol), a enzima de restrição que produzia o padrão de restrição mais adequado era sempre a enzima *Apa*I. Como vimos, o mesmo ocorreu para o DNA do inserto cosCip IC (figura 1). Esse fato não é uma coincidência, e pode ser explicado pelo fato do genoma das leishmânias apresentar uma maior freqüência de nucleotídeos citosina e guanina (Wilson e cols., 1991), tendo portanto, maior possibilidade de apresentar sítios para a enzima A*pa*I que reconhece o hexâmero GGGCCC.

Assim, utilizamos a enzima *Apa*I para obter deleções do DNA do inserto cosCip IC por meio de digestão e ligação sob condições parciais, o que favorece a

re-ligação do DNA do cosmídio com o inserto deletado. Essa estratégia permitiu, além da determinação do *locus* relacionado com o fenótipo, a dedução de um provável mapa genômico do fragmento estudado (figuras 3-B e 4-B).

A dedução do mapa foi feita após digestão total com *Apa*I do DNA de todas as deleções obtidas a partir do cosmídio cosCip IC (figura 3-A), e esta baseada no fato de que os fragmentos comuns a todas as preparações devem estar ligados às extremidades do vetor. Em seguida, os fragmentos mais freqüentes observados no padrão de digestão devem ser os próximos a serem adicionados (ao lado dos que se encontram ligados às extremidades do vetor), e assim por diante até que se estime uma possível posição para todos os fragmentos obtidos no perfil. Essa análise culminou com a estimativa de que o inserto do cosCip IC apresentava cerca de 34 kb de extensão (figura 3-B e 4-B).

O DNA das deleções foram então transfectados em células selvagens e as células transfectadas submetidas a amplificação do número de cópias de seu DNA transfectado, após passagens sucessivas em concentrações crescentes de Higromicina (HYG), para em seguida serem submetidas aos testes funcionais em presença de altas doses de CsA. Para o controle desses testes funcionais, utilizamos células LmFA1 transfectadas com o vetor cLHYG vazio (LmFA1-cLHYG), pois além de apresentarem comportamento fenotípico semelhante às células LmFA1 selvagens em presença de CsA (figura 5-A), tais células também eram submetidas às mesmas etapas de amplificação gênica com HYG, configurando-se portanto em um controle mais adequado para os testes funcionais.

Vale ressaltar nesse ponto que a manutenção das células em altas concentrações de HYG é de extrema importância, pois na medida em que se amplifica a região que confere resistência a HYG, a região que confere resistência à droga em estudo também é amplificada. Além disso, esta manutenção funciona como um fator de segurança laboratorial, uma vez que ao retirar a pressão seletiva por HYG, as células perdem não só a resistência ao antibiótico, como também, passam a não mais amplificar a região estudada. Dessa forma, as células fora das condições laboratoriais, não apresentam o novo fenótipo (resistência ao composto em estudo), não gerando riscos ambientais no caso de eventual acidente.

Os resultados dos testes de análise funcional das células transfectadas com os DNAs das deleções obtidas mostraram que além do inserto cosCip IC original, apenas os DNAs das deleções cosCip IC2, cosCip IC5 e cosCip IC7 foram capazes de conferir resistência a CsA após transfecção (figura 5-B e tabela 3). Os índices de resistência encontrados (respectivamente 1,40; 1,63 e 1,57 vezes mais resistentes), apesar de baixos, mostraram-se significativamente diferentes quando comparados aos apresentados pelas células controle.

Temos observado que os índices de resistência de alguns dos outros cosmídios analisados em nosso laboratório (Cotrim e cols., 1999 e Coelho e cols., 2003, Coelho e cols., 2004) também não são muito maiores que os observados nas tabelas 3 e 4. Analisando conjuntamente alguns dados da literatura, constatamos que várias razões podem justificar a relevância desses baixos índices de resistência verificados pelas nossas células de *L. (L.) major* após transfecção: (1) verificamos que a magnitude da resistência conferida após transfecção de genes sabidamente relacionados com a resistência (após amplificação endógena ou em cosmídios), também é freqüentemente baixa. Isso foi verificado, por exemplo, após amplificação do gene *MDR1* selecionado por Vinblastina (Henderson e cols, 1992; Chow e cols, 1993); após amplificação do

gene *PTR1* (região H) selecionado por Primarquina (Ellenberger & Beverley, 1987; Bello e cols., 1994), ou após amplificação dos *loci TOR* e *SQS1* selecionados respectivamente por Tubercidina e ITZ (Cotrim e cols., 1999). Esta, inclusive, pode ser uma limitação da abordagem da seleção baseada em cosmídios, uma vez que verificamos um aumento considerável da resistência quando regiões do inserto não relevantes são removidas. Este fato ocorreu com o gene *SQS1* (Cotrim e cols., 1999), e em menor escala com o gene *PTR1* relacionado com a resistência a Pentamidina em *L*. (*L.*) major (Coelho e cols., 2003) e parcialmente com o cosmídio analisado nesse trabalho; (**2**) Durante a etapa de seleção do cosmídio em presença de CsA, verificamos que os cosmídios cosCip IA, cosCip IB e cosCip IC foram multi selecionados, isto é, um total de 19 colônias, contendo o mesmo *locus* foi obtido durante o mesmo processo de seleção. Ou seja, apesar do modesto índice de resistência observado (1,63 vezes para a deleção cosCip IC5), verificamos uma reprodutibilidade inquestionável do processo de seleção.

Visando o bloqueio do fenótipo conferido pelas células transfectadas com a deleção cosCip IC7 (a menor deleção capaz de conferir resistência a CsA após transfecção, figura 6) o DNA desta deleção foi submetido a digestão total com as enzimas *Bgl*II e *Apa*I (figura 7) e um fragmento *Bgl*II de cerca de 2 kb contido no inserto foi deletado (figura 8-A). O DNA dessa construção (cosCip IC7 $\Delta Bgl$ II) foi transfectado em células LmFA1 selvagens, que foram submetidas a testes funcionais com CsA, mostrando a perda da capacidade de conferir resistência a CsA indicando que o gene inteiro ou pelo menos um fragmento importante do mesmo deve estar presente no fragmento *Bgl*II de 2 kb (figuras. 8 -B e C).

O seqüenciamento de nucleotídeos das extremidades deste fragmento BglII(presente no gene relacionado com a resistência a CsA; figura. 9-A) foi então processado utilizando um 'kit' de seqüenciamento contendo 7-deaza-dGTP, que promove uma maior eficiência da amplificação de amostras de DNA que contem uma alta concentração de nucleotídeos citosina e guanina, fato observado no genoma de *L.* (*L.*) major. Os produtos obtidos a partir das reações de seqüenciamento foram analisados pelo BLAST e dados do projeto genoma de *L.* (*L.*) major (Friedlin A1), coordenado pelo Sanger Institute e Genedb, mostrando uma alta identidade com o cromossomo 27 de *L.* (*L.*) major da cepa Friedlin A1 (LmjF27\_01\_20040201\_V3.0).

Poderíamos obter a seqüência completa deste fragmento BglII de 2 kb, clonado em pUC $\pi$  (pUC $\pi/2$ kbBglII) com o auxílio das ilhas de iniciadores de seqüênciamento. Esta é uma ferramenta que temos utilizado no seqüênciamento de fragmentos de DNA relativamente grandes, maiores que 2 kb com excelentes resultados (Coelho e cols., 2004). Esta técnica consiste em introduzir um fragmento de DNA (transposon) de maneira randômica com o auxilio da enzima transposase e após análise do padrão de restrição com enzimas adequadas, estes fragmentos de DNA são submetidos ao seqüênciamento (Tosi e Beverley, 2000). Porém, a utilização desta abordagem, seria útil se não tivéssemos encontrado nenhuma

Em vista disso, e para confirmar a região identificada no cromossomo 27 (cr27), subclonamos mais um fragmento *Hind*III de cerca de 6 kb presente no inserto cosCip IC5 em pUC $\pi$  (pUC $\pi$ /6kb *Hind*III; figura 9-B), além de um terceiro fragmento *Hind*III/*Pst*I de 1,7 kb contendo as extremidades do inserto cosCip IC (pUC $\pi$ /1,7kb *Hind*III/*Pst*I; figura 9-C), e ambos os insertos tiveram suas

extremidades seqüenciadas. Como esperávamos, as análises dos produtos das reações de seqüenciamentos destes fragmentos também apresentaram alta identidade com a mesma região do cromossomo 27 (figura 10).

A partir da localização destas seqüências no cr27, foram realizadas análises comparativas com o auxilio do programa SeqMan-DNASTAR, onde verificamos que o cosmídio original cosCip IC (contendo um inserto de 36 544 pb) está localizado entre as posições 408 159 e 444 703 pb do cr27 de *L. (L.) major*, que contém dois sítios de restrição para *Sau*3A, uma das enzimas de restrição (junto com *Bam*H1) utilizadas na construção da genoteca de onde o cosmídio foi isolado (Ryan e cols., 1993, Cotrim e cols., 1999).

Verificamos ainda que o padrão de digestão de várias enzimas de restrição, obtido durante as etapas de isolamento e mapeamento do cosCip IC, foi bastante similar ao encontrado nessa região do cr27. Observamos, por exemplo, que os tamanhos estimados para os fragmentos do inserto cosCip I digerido com *Apa*I (figuras 3-A e B), são muito próximos aos encontrados no cr27. Ou seja, para o primeiro fragmento *Apa*I estimado em 0,6 kb no mapa, encontramos no cr27 um fragmento correspondente de 593 pb; e assim sucessivamente: para o fragmento estimado em 0,5 kb (posicionado em nossa estimativa dois fragmentos à direita) encontramos um correspondente no cr27 de 523 pb, para o estimado em 4,0 kb  $\rightarrow$ um de 3 698 pb; 5,5 kb  $\rightarrow$  5 020 pb; 6,0 kb  $\rightarrow$  5 485 pb; e assim por diante. Apenas um fragmento de 2,95 kb não foi inicialmente identificado no padrão de restrição (figura 3), pois co-migrava com um correspondente de tamanho similar (2,94 kb).

Da mesma forma, os insertos cosCip IA e cosCipIB digeridos com a enzima Bg/II, também foram identificados no cr27 (figura 11). Verificamos que o inserto cosCip IB não só pertence ao mesmo *locus* como também é uma deleção do cosmídio cosCip IA e que todos possuem a região que contém o gene relacionado com a resistência a CsA (assinalada pela seta na figura 11), assegurando mais uma vez a qualidade de nosso sistema de seleção de cosmídios expressores.

Baseado nestes resultados passamos a utilizar nas análises comparativas, a seqüência de nucleotídeos definida para o cr27 de *L. (L.) major* como correspondente ao inserto cosCip IC. Assim, identificamos na região do fragmento *Bgl*II de 2 kb uma fase aberta de leitura ("open reading frame", ORF, figura 12) de 5 534 pb que codifica uma proteína de 1 844 aminoácidos (aa). Esta seqüência de aa foi submetida à análise com o auxilio do programa BLAST, que apresentou alta similaridade com uma proteína transportadora ABC de *L. (L.) tropica* e ABC1 de humanos. Como essa ORF foi definida a partir de um *locus* que esta relacionado com a resistência a CsA, passamos a denominá-la de LmABC-CR1 (*L. major*ABC-Ciclosporin Resistance-1).

Identificada uma proteína transportadora relacionada com a resistência a CsA em *L. (L.) major*, foi realizada a análise estrutural com o auxilio do programa ScanProsite, no sentido de obter mais dados que corroborem essa identificação, como por exemplo: a identificação das regiões de assinatura, dos domínios de ligação de nucleotídeos e/ou das regiões conservadas particulares desta família de proteínas. Estes dados contribuem fortemente para a confirmação da classificação da proteína LmABC-CR1 como uma transportadora ABC (figura 13).

Após a identificação da LmABC-CR1, foram realizadas análises comparativas (com o auxílio do programa Lasergene; ClustalW-DNASTAR, Inc.) que revelaram algumas transportadoras ABC com alta identidade de aa com a LmABC-CR1, como por exemplo: LtABCA1 de *L. (L.) tropica* (95,5 %), TcABCA1 de *T. cruzi* (56,1 %). Uma identidade um pouco menor foi verificada para as HsABCA-1 e 3 de *Homo sapiens*. Interessantemente, a LmABC-CR1, apresentou um baixo grau de identidade com a PRP1 (27,2 %), uma glicoproteína pertencente superfamília das transportadoras ABC, isolada e identificada a partir de *L.(L.) major* (Coelho e cols., 2003) pela mesma metodologia adotada nesse trabalho. Esta PRP1 de *L. (L.) major* está relacionada à resistência a Pentamidina, e não é capaz de conferir resistência a Ciclosporina, como demonstrado anteriormente (Coelho e cols., 2003). Da mesma maneira foram realizados testes funcionais das construções cosCip IC7 e cosCip IC7 $\Delta Bg/II$  em presença de Pentamidina, e evidenciamos que a LmABC-CR1 não foi capaz de conferir resistência a Pentamidina após transfecção (tabela 5). Dessa forma, estamos sugerindo que provavelmente essas duas transportadoras ABC de *L. (L.) major* tenham mecanismos de ação bastante diferentes e que seguramente deverão ser melhores estudadas no futuro.

Baseado no fato de que 1) um dos mecanismos de resistência das leishmânias a compostos antiparasitários é realizado por proteínas transportadoras, que promovem o transporte destes compostos impedindo assim sua ação no parasito, e 2) de que identificamos mais uma proteína transportadora ABC (LmABC-CR1) em *L*. (*L.*) *major*, entendemos que seria importante avaliar o efeito antiparasitário da CsA em algumas espécies de leishmânias que estavam disponíveis em nosso laboratório.

Entretanto, verificamos que os resultados das culturas em presença de CsA para as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagas*i, exigiram concentrações bem maiores do que as utilizadas em *L. (L.) major*. Assim, foi necessária uma avaliação preliminar da toxicidade do Etanol em todas as espécies estudadas, uma vez que a CsA estava diluída com Etanol e altas concentrações de CsA conteriam conseqüentemente maiores concentrações do diluente que poderia ser fatal para os parasitos. Essa avaliação nos garantiu que poderíamos utilizar concentrações de CsA até 100  $\mu$ g/mL em nossas culturas sem a influencia do diluente (figura 14).

Interessantemente os resultados apresentados a partir destas análises mostraram que *L. (L.) amazonensis. L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* apresentam uma resistência natural a CsA cerca de 3 vezes maior que a apresentada pelas células de *L. (L.) major* (figura 15). Quais os mecanismos envolvidos nessa diferença de sensibilidade entre as espécies, ainda não sabemos. Mas poderíamos especular que essas diferenças de sensibilidade entre as espécies poderiam ocorrer por exemplo, por conta de diferenças nas seqüências de aminoácidos de proteínas envolvidas com a resistência à CsA, que por exemplo e nesse nosso caso, poder ser uma transportadora ABC.

Dessa forma a análise molecular dos DNAs dessas espécies de leishmania é um passo bastante importante nessa pesquisa, por conta disso já iniciamos algumas análise preliminares nesse trabalho, realizando um "southern blot" onde o DNA genômico dessas 4 espécies avaliadas nos testes de sensibilidade à CsA foram hibridizados com uma sonda específica do gene *LmABC-CR1*.

O resultado dessa hibridização (figura 17), sugere primeiramente que esta proteína existe nas 4 espécies avaliadas e que portanto também podem estar relacionada com a resistência da CsA nestas espécies do parasito.

Verificamos também que o padrão de hibridização para *L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* foi bastante semelhante nos testes realizados, confirmando os resultados obtidos nos testes de sensibilidade à CsA (figuras 15 e 17). Por outro lado, como estes testes ainda são preliminares, não pudemos descartar (não houve tempo) a hipótese de uma possível contaminação entre as espécies, o que será avaliado após a realização de um teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) específico para as espécies em questão.

Concluindo, foi identificado neste trabalho um gene localizado no cr27 de *L*. (*L.*) major que codifica para uma proteína (denominada LmABC-CR1) pertencente a família das transportadoras ABC, cuja superexpressão esta relacionada com resistência a CsA em células promastigotas de *L. (L.) major*. Essa identificação sugere um possível envolvimento destas proteínas transportadoras na ação direta da CsA nesses parasitos, e que deverá ser melhor estudada no futuro. A contribuição desse trabalho pode vir exatamente no sentido de desenvolver mais ferramentas genéticas para uma melhor caracterização molecular das diferentes espécies do parasito.

A presença dessas eventuais seqüências de nucleotídeos específicas para as diferentes espécies do parasito, poderá ser utilizada em futuras análises genotípicas para o diagnóstico molecular da espécie do parasito (por exemplo, PCR seguido de seqüênciamento do produto obtido). Dessa forma, esse procedimento de 'genotipagem dirigida' poderá ser útil não só na determinação da espécie do parasito, como também na orientação da abordagem terapêutica a ser empregada, de forma semelhante ao acompanhamento atual de várias infecções virais. Diversos grupos de pesquisa vêm trabalhando nesse sentido, envolvendo, sobretudo, abordagens moleculares (como as técnicas de PCR) (de Andrade, Floeter-Winter, 2002; Weigle *et al.*, 2002). No entanto, vemos poucos trabalhos relacionados com a pesquisa e análise das diferenças interespecíficas do ponto de vista fenotípico.

## VI. Referências

ALFIERI, S. C.; RAMAZEILLES, C.; ZILBERFARB, V.; GALPIN, I.; NORMAN, S. E.; RABINOVITCH, M. "Proteinase inhibitors protect *Leismania amazonensis* amastigotes from detruction by amino acid esters". Mol. Biochem. Parasitol. v. 29, p. 191-201, 1998.

ALTSCHUL; S. F.; STEPHEN, F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J, ZHANG, Z.; MILLER, W.;. LIPMAN, D. J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Nucleic Acids Res., v. 25, p. 3389-3402, 1997.

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

Bello, A. R.; Nare, B.; Freedman, D.; Hardy, L.; Beverley, S. M.. "PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and metotrexate resistence in the protozoan parasite *Leishmania major*". Proc Natl Acad Sci USA, v. 91, n. 24, p. 11442-6, 1994.

BERMAN, J.D. "Treatment of new world cutaneous and mucosal leishmaniasis". Clin. Dermatol, v. 14, n. 5, p. 519-22, 1996.

BEVERLEY, S. M.; CLAYTON, C. E. "Transfection of Leishmania nd *Trypanosoma brucei* by electroporation". In Methods in Molecular Biology (J.E. Hyde, ed.) v. 21, p. 333. Human Press, New Jersey, 1993.

BIRBOIM, H. C.; DOLY, J. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". Nucl. Acids Res., v. 7, p. 1513, 1979.

CHAPPELL, L. H.; WASTLING, J. M. "Cyclosporin A: antiparasitic drug, modulator of the host-parasite relation ship and immunosuppressant. Parasitol, v. 105, S25 – S40, 1992.

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

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

COELHO, A. C., BEVERLY, M. S.; COTRIM, P. C. "Functional genetic of PRP1,

an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*". Molecular and Biochemical Parasitology, v.130, p. 83-90, 2003.

COELHO, A.C.; TOSI, L.R.O.; COTRIM, P.C. "Mapping of a *Leishmania major* gene/*locus* that confers pentamidine resistance by deletion and insertion of transposable element". Aceito para publicação na Rev. Inst. Med. Trop de São Paulo, 2004.

COTRIM, C.P.; GARRITY, L. K.; BEVERLEY, S.M. "Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in Leishmania by over-expression/selection". J. Biol. Chem., v. 274, n. 53, p. 37723-30, 1999.

DE ANDRADE, S. V.; FLOETER-WINTER, L. M. "Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in Leishmania". Int J Parasitol, v. 32, n. 4, p. 437-47, 2002.

DESCOTEAUX, A., GARRAWAY, L. A., RYAN, K. A., GARRITY, L. K., TURCO, S. J., BEVERLEY, S. M. "Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite Leishmania". In: Methods in Molecular Genetics (Adolph, K.W., ed.) v. 1, p. 22-48. Academic Press, NY, 1994.

DESJEUX, P. "Human Leishmaniases: epidemiology and public health aspects". Medical Officer, Trypanossomiases and Leishmaniases Control, Division of Control of Tropical Diseases, World Health Organization, Genova, 267-275, 1992.

DUTTA, M.; DELHI, P.; DINHA, K. M.; BANERJE, R.; DATTA, A. K. "Lack of abundance of cytoplasmic ciclosporin A-binding protein renders free-living *Leishmania donovani* resistant to cyclosporin A". The Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 22, p. 19294-300, 2001.

ELLENBERGER, T. E.; BEVERLEY, S. M. "Reductions in metotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *Leishmania major* are independent of R or H region amplification". J Biol Chem, v. 262, p. 13501-06, 1987.

FLIRI, H.; BAUMANN, G.; ENZ, A.; KALLEN, J.; LUYTEN, M.; MIKOL, V.; MOVVA, R.; QUESNIAUX, V.; SCHREIER, M.; WALKINSHAW, M.; WENGER, R.; ZENKE, G.; ZURINI, M. "Cyclosporins Structure - Activity Relationships". Annals the NY Acad. Sciences, v. 696, p. 47-53, 1993.

FRUMAN, D.A.; MATHER, P.E.; BURAKOFF, S.J.; BIERER, B.E. "Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas". Eur J Immunology, v. 22, n. 10, p. 2513-7, 1992.

GANGENEUX, J.P. "Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities". Presse Med., v. 28, n. 37, p. 2057-66, 1999.

GEBRE-HIWOT, A.; FROMMEL, D. "The *in vitro* anti-leishmanial activity of inhibitions of ergosterol biosyntesis. J. Antimicrob. Chem., v. 32 (6), p. 837-42, 1993.

GEBRE-HIWOT, A.; TADESSE, G., CRIFT, S. L., FROMMEL, D "Na in vitro model for screening antileishmanicial drugs: The human leukaemia monocyte cell line, THP-1". Acta Trop., v. 51,(3-4), p. 237-45, 1992.

HENDERSON D. M., SIFRI, C. D., RODGERS, M.. WIRTH D. F, HENDRICKSON, N., ULMAN, B.. "Multidrug resistence in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian mdr1 gene". Mol Cell Biol, v. 12, p. 2855-65, 1992.

HIGH, K.P.; HANDSCHUMACHER, R.E. "Immunuity microbial pathogenesis, and immunophilins: Finding the keys, now where are the locks?" Infectious Agents and Disease.\_v. 1, n. 3, p. 121, 1992.

HIGH, K.P.; JOINER, K.A.; HANDSCHUMACHER, R.E. "Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*". J. Biol. Chemistry, v. 269, n. 12, p. 9105-12, 1994. HOERAUF, A.; RASCHER, C.; BANG, R.; PAHL, A.; SOLBACH, W.; BRUNE, K; ROLLINGHOFF, M.; BANG, H. "Host-cell cyclophilin is important for the intracelluar replication of *Leishmania major*". Mol. Microbiol, v. 24, n. 2, p. 421-9, 1997.

KAHAN, B.D.. "Cyclosporine". N Engl Journal Med., v. 321, n. 25, p.1725-38; 1989.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. "Stable transfection of the human parasites *L. (L.) major* delineates a 30 kilobase region sufficient for extrachomosomal replication and expression". Mol. Cell Biol., v. 10,p. 1084-94, 1990.

KAYSER O; KIDEERLEN A. F.. "In vitro leishmanicidal activity of naturaly occurring chalcones". Phytother res, v.15, n. 2, p. 148-52, 2001.

KINDERLEN, A. P.; KAYE, P. M. "A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracelular cytotoxicity against leishmania parasites". J. Immunol. Methods, v. 127, p. 11-8, 1990.

LE BOWITZ, J. H.; COBURN, C. M.; MCMAHON-PRATT, D.; BEVERLEY, S. M. "Development of a stable leishmania expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 87, p. 9736-40, 1990.

MUNRO, G. H. e MCLAREN, D. J. "Toxicity of Cyclosporin A (CsA) against developmental stages of *Schistosoma mansoni* in mice". Parasitology, v. 100, p. 35-44, 1989.

MUNRO, G. H.; BRANNAN, L. R.; CHAPPELL, L. H.; THOMSON, A. W.; MCLAREN, D. J.. "The larvicidal activity of Cyclosporin A against *Schistosoma mansoni* in mice". Parasitology, v. 102, p. 57-63, 1991.

OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. "Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis". Parasitology Today, v. 9, n.9, p. 323-2, 1993.

PÉREZ-VICTORIA, F. J.; GAMARRO, F.; OULLETTE, M.; CASTANYS, S. "Functional Cloning of the miltefosine transporter:A novel-type phospholipid translocase from *Leishmania* involvedin drug resistence". Journal of Biologycal Chemistry, v. 278, n. 50, p. 49965-71, 2003.

POLLARD, S.; NASHAN, B.; JOHNSTON, A.; HOYER, P.; BELITSKY, P.; KEOWN, P.; HELDERMAN, H.. Consent: consensus on substitution in european transplantat. "A pharmacokinetic and clinical review of the potential clinical impact of using different formulations of cyclosporin A". Clin Ther, v. 25, n. 6, p. 1654-69, 2003.

PONS, H. A.; ADAMS, S.; STADECKER, M. J. "*Schistosoma mansoni*: The basis for the antischistosomal effect of cyclosporine A". Experimental Parasitology, v. 67, p. 190-8, 1988.

PARODI-TALICE, A.; ARAÚJO, J. M.; TRRES, C.; PÉREZ-VICTORIA, J. M.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.. "The overexperssion of a new ABC transporter in Leishmania is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity". Biochimica et Biophysica Acta, v. 1612, p. 195-207, 2003.

QUELLETTE, M.; FASE-FOWLER, F.; BORST, P. "The Amplified H circle of Methotrexate-Resistent *Leishmania tarentolae* contains a Novel P-gycoprotein gene". J. EMBO, v. 9, p. 1027-33, 1990.

RABINOVITCH, M.; ZILBERFFAB, V.; POUCHELET, M. "*Leishmania mexicana*, destruction of isolated amastigotes by amio acid esters". Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 36, p. 7-10, 1987.

RASCHER, C.; PAHL, A.; PECHT, A.; BRUNE, K.; SOLBACH, W.; BANG, H. "*Leishmania major* parasites express cyclophilin isoforms with an unusual interaction with calcineurin". Biochem. J., v. 334, n. 3, p. 659-67, 1998. RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS,M. N.; MARZAL, P. C.. "Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose:Estado e Arte". Química Nova, v. 26, n. 4, p. 550-5, 2003.

REY, L. "LEISHMÂNIA E LEISHMANIOSES: OS PARASITOS". Parasitologia; cap. 15, p. 182-192, 1991.

RINE, J., HANSEN, W., HARDEMAN, E., DAVIS, R. W. "Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 80, p. 6750-54, 1983.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. "Molecular clonning: Laboratory Manual". V. 3, p. A8.27-A8.28, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COUSON, A. R. "Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America". v. 74, p. 5463-67, 1977.

SCHEIBEL, L. W.; COLOMBANI, P. M.; HESS, A. D.; AIKWANA, M.; ATKINSON, C. T.; MILHOUS, W. K. "Calcium and calmodulim antagonistis inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): impilcations for drug design. Proceedings of the national academy of science USA, v. 84, p. 7310-14, 1987.

SEIXAS-DUARTE M. I.; BARDARÓ, R. "Leishmaniose Viceral (Calzar)". In: Veronesi, R.; Focaccia, R. (Eds). Tratado de Infectologia. São Paulo. Ed. Atheneu, cap. 97, 1997. SOLBACH, W.; KARSTEN, F.; KAMMERER, E.; BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M "Supressive effect of ciclosporin A on the development of *Leishmania tropica* induced lesions in genetically suceptible BALB/c Mice". The journal of Immunology, v. 137, n. 2, p. 702-7, 1986a.

SOLBACH, W.; KARSTEN, F.; RÖLLINGHOFF, M "Effect of T-lymphocyte suppression on the parasite burden in leishmania maor-infected, Genetically Suceptible BALB/c Mice". Infection and Immunity, v. 54, n. 3, p. 909-12, 1986b.

THAKUR, C.P. "Sodium Antimony Gluconate, Amphotericin, and Myocardial Damage". Lancet, v. 27; n. 351(9120), p. 1928-9, 1991.

TOSI, L.R.; BEVERLEY, S.M. "Cis and trans factors affecting Mos 1 mariner evolution and transposition *in vitro*, and its potential for functional genomics. Nucleic Acids Res, v. 28, p. 784-90, 2000.

VAHLNE, A.; LARSSON, P.-A.; HORTAL, P.; AHLMÉN, J.; SVENNERHOLM, B.; GRONOWITZ, J.S.; OLOFSSON, S. "Inhibition of herpes simplex virus production in vitro by Cyclosporin". J. Arch. Viro*l.*, v. 122, p. 61-75, 1992.

VIEIRA, J., AND MESSING, J. "The pUC plasmids, an M13mp 7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers". Gene (Amst), v. 19, n. 3, p. 259-68, 1982.

WEIGLE, K. A.; LABRATDA, L. A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D. C. "PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia). J Clin Microbiol, v. 40, n. 2, p. 601-6, 2002.

WILSON K, COLLART FR, HUBERMAN E, STRINGER JR, ULLMAN B. "Amplification and molecular cloning of the IMP dehydrogenase gene of *Leishmania donovani*". J Biol Chem., v. 25; n. 266(3), p. 1665-7, 1991. http://www.who.int/emcdocuments/surveillance/docs/whocdscsrisr2001.pdf/leishma

niaseis.pdfl

http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/esp\_paleo/leishmaniose\_fer.htm

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

http://www.sanger.ac/uk/Projects/L\_major

http://www.genedb.org/

http://www.expasy.org/tools/scanprosite/