Luciana Aparecida Camizotti

**Identificação e caracterização cromossomal de 9 loci de
Leishmania (L.) major relacionados com a resistência a
inibidores da via de biossíntese do ergosterol**

**Dissertação de mestrado apresentada a
Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Paulo César Cotrim

São Paulo
2008

Trabalho realizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Laboratório de Investigação Médica(LIM 48) da Faculdade de Medicina (USP).

Para minha mãe, exemplo de superação e força.
Para meu pai, por me ensinar sobre o inconformismo.
Para Jefferson, pela alegria dos meus dias.

Agradecimentos

A DEUS, pela graça, força e alegria de cada dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Cotrim pela oportunidade de realização deste trabalho, pelos ensinamentos, paciência e pela amizade.

À Edite Hatsumi Kanashiro, pelo companheirismo, carinho e atenção incansáveis. Você me ensinou pequenos tesouros dessa vida.

A Juliana Ide Aoki, pelo incentivo e palavras de amizade sempre presentes.

Aos amigos Norival Kesper Júnior, Adriano Cappelazzo Coelho, Edna Barbosa de Souza, Priscila Appugliese, Sueli de Fátima Bastos e Elizabete Ourique pelas alegrias compartilhadas e pelas dificuldades divididas. Em cada um encontrei o verdadeiro sentido da amizade.

A amiga Márcia Teixeira Carvalho Dias, pelo apoio, amizade irrestrita e cheia de alegria.

A todo o pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo: Fabiana Leoratti, Fabrício Petito de Assis, Mussya Cisotto Rocha, Fábio Alessandro, Arnaldo Rodrigues, Mariko, Maria das Graças Prianti, Beatriz Julieta Celeste, Tatiane Salvador, Kelly Kanunfre, Melissa Bastos, Érika Hoffman, Dr. Ângelo Lauretta Lindoso, Guita Rubinski, Dra. Sandra Ávila, Dra. Hiro Goto, Dra. Carmen Arroyo Sanchez, Dr. Antonio Walter Ferreira pela alegria da convivência no dia-a-dia do Laboratório e pela disponibilidade de todos.

Aos funcionários do Laboratório, Arthur de Jesus, Renato Racickas, Eunice Bonfim Pinto e Nilzete Mira da Silva pelo trabalho cuidadoso e responsável.

À Secretaria de Pós-Graduação do Programa de Fisiopatologia Experimental pela dedicação com que desenvolvem seu trabalho.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior, pelas orientações e ensinamentos compartilhados durante o estágio supervisionado do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“É necessário que haja mais chão nos nossos olhos do que cansaço
nas nossas pernas,mais esperança nos nossos passos
do que tristeza nos nossos ombros,mais estrada no
nosso coração do que medo na nossa cabeça”.
(Geraldo Eustáquio de Souza-Adaptado.)

Sumário

Resumo

Abstract

Abreviaturas

1 Introdução	1
1.1 Leishmanioses	2
1.1.1 Agente etiológico	2
1.1.2 Ciclo biológico	3
1.1.3 Hospedeiros vertebrados e invertebrados	3
1.1.4 Aspectos históricos, epidemiológicos e clínicos das leishmanioses	4
1.1.5 Diagnóstico e tratamento das leishmanioses	8
1.2. A amplificação gênica atuando como um mecanismo de resistência da leishmânia aos fármacos com ação anti parasitária	12
1.3. Via de biossíntese do ergosterol	16
1.3.1. Inibidores da via de biossíntese do ergosterol	18
1.3.1.1. Terbinafina	18
1.3.1.2 Itraconazol e Cetoconazol	19
1.4. Aplicações de técnicas de biologia molecular no estudo dos aspectos moleculares e bioquímicos relacionados com a resistência	21
2 Objetivos	24
3 Métodos	26
3.1 Organismos	27
3.2 Tampões, soluções e meios de cultura	27
3.2.1 Tampões e soluções	27
3.2.2 Meios de cultura para bactérias	27

3.2.3 Meio de cultura para <i>Leishmania major</i>	28
3.3 Vetores	28
3.4 Cultivo das formas promastigotas de <i>Leishmania major</i>	29
3.5. Mapeamento dos insertos que conferem resistência a terbinafina e ao itraconazol	29
3.5.1 Processo de transformação em <i>E. coli</i>	29
3.5.2 Extração do DNA dos cosmídeos/ plasmídeos a partir da <i>Escherichia coli</i>	30
3.5.3 Digestão do DNA dos cosmídeos/plasmídeos com enzimas de restrição	31
3.5.4 Eletroforese em gel de agarose	31
3.5.5 Obtenção das deleções por digestão parcial e total dos cosmídeos relacionados com a resistência a terbinafina e ao itraconazol/cetoconazol	32
3.6. Análise do papel de cada deleção na resistência a terbinafina e ao itraconazol/cetoconazol	32
3.6.1 Transfecção do DNA das deleções obtidas nos parasitos de <i>L. major</i>	33
3.6.2 Análise de dados	33
3.6.3 Extração de DNA de cada cosmídeo ou plasmídeo de <i>Leishmania major</i>	34
3.7 Sequenciamento do inserto relacionado com a resistência a terbinafina e ao itraconazol/cetoconazol	35

4. Resultados 37

4.1. Cosmídeo cItz2	38
4.1.1 Avaliação do DNA do inserto cItz2: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	38
4.1.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cItz2 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	43
4.2 Cosmídeo cItz1	50
4.2.1 Avaliação do DNA do inserto cItz1: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	50
4.2.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cItz1 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	52
4.3 Cosmídeo cItz4	57

4.3.1 Avaliação do DNA do inserto cItz4: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	57
4.3.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cItz4 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	59
4.4 Cosmídeo cTbf1	61
4.4.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf1: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	61
4.4.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf1 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	63
4.5. Cosmídeo cTbf2	66
4.5.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf2: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	66
4.5.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf2 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	69
4.6 Cosmídeo cTbf3	72
4.6.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf3: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	72
4.6.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf3 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	75
4.7 Cosmídeo cTbf4	78
4.7.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf4: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	78
4.7.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf4 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	80
4.8 Cosmídeo cTbf5	82
4.8.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf5: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	82
4.8.2. Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf5 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	83
4.9 Cosmídeo cTbf6	88

4.9.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf6: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional	88
4.9.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf6 no genoma de <i>L. (L.) major</i>	90
5 Discussão	94
6 Conclusões	108
7 Referências Bibliográficas	109
Anexo I	125
Anexo II	127

Resumo

Camizotti, LA. Identificação e localização cromossomal de 9 *loci* de *Leishmania (L.) major* relacionados com a resistência a dois inibidores da via de biossíntese do ergosterol [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

O ergosterol é um componente responsável por manter a integridade e a fluidez das membranas de *Leishmania* spp. A partir de uma metodologia que consiste em seleção por superexpressão gênica, foram isolados nove diferentes *loci* de *L. (L.) major* relacionados com a resistência a dois inibidores da via de biossíntese do ergosterol: Terbinafina (TBF) e Itraconazol (ITZ). Análises funcionais individuais desses nove *loci* na presença de TBF e ITZ (ou do análogo Cetoconazol - CTZ) apresentaram níveis significantes de resistência após transfecção em células selvagens de *L. (L.) major*. Nesse trabalho apresentamos a metodologia de isolamento de um desses *loci* (cItz2), bem como a análise ‘in silico’ das regiões cromossômicas correspondentes aos insertos dos nove cosmídios no genoma de *L. (L.) major*.

Abstract

Camizotti, LA. Identification and chromosomal localization of 9 *Leishmania (L.) major* loci related to resistance against two inhibitors of ergosterol biosynthesis pathway [Master thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Ergosterol is an important compound responsible to maintain integrity and fluidity of *Leishmania spp.* membranes. Starting from an overexpression/selection method, our group has isolated nine different *loci* of *L. (L.) major* related to resistance against two inhibitors of the ergosterol biosynthesis pathway, Terbinafine (TBF) and Itraconazole (ITZ). Individual functional analysis of these nine *loci* in the presence of TBF and/or ITZ (or the ITZ analog Ketoconazole, CTZ), have showed significant levels of resistance after transfection into *L. (L.) major* wild-type cells, followed by over expression induction. In this work, we show the insert mapping and chromosomal identification of one of these *loci* (cItz2), as well as discuss the “in silico” chromosomal analysis of the nine correspondent inserts in the *L. (L.) major* genome.

Abreviaturas

ATP	adenosina trifosfato
	aceleração da gravidade
CL-HYG	vetor cosmídeo
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
IC50	concentração suficiente para inibição do crescimento celular em 50 %
ITZ	itraconazol
LB	Luria Bertani
LBA	LB contendo ampicilina
LmFA1	cepa selvagem de <i>Leishmania major</i> Friedlin A1
m	massa
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
pSNBR	vetor plasmídeo
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
TEG	tampão Tris-EDTA-Glicose

Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	tampão de transformação e estocagem
U	unidade
UV	luz ultravioleta
v	volume

1 Introdução

1.1. Leishmanioses

1.1.1. Agente etiológico

As leishmanioses são parasitoses provocadas pelo parasita do gênero *Leishmania*, um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida). Esta ordem é caracterizada pela presença de flagelo e do cinetoplasto, organela autoreplicável com DNA extranuclear e localizado próximo ao flagelo (REY, 2001){REY, 2001 #136}. A família Trypanosomatidae é constituída por organismos de características muito homogêneas, que se reproduzem por divisão binária simples e podem ser monoxênicos (parasitando o hospedeiro invertebrado) ou heteroxênicos (alternando seu ciclo de vida entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado). Nesta família encontram-se os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, que possuem uma grande importância, pois são parasitas patogênicos para o homem (McGhee e Cosgrove, 1980; Willians, 1995; Rey, 2001). O gênero *Leishmania* compreende 22 espécies transmitidas para os hospedeiros mamíferos por aproximadamente 70 espécies diferentes de flebotomíneos (Dedet, 1995) classificadas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. O subgênero *Viannia* compreende espécies como: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* ou *L. (V.) peruviana*, além de espécies que raramente infectam humanos, como: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, entre outras. Já o subgênero *Leishmania* compreende, entre outras, as espécies: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major* ou *L. (L.) pifanoi* (Lainson e Shaw, 1987).

1.1.2. Ciclo biológico

O ciclo biológico do parasita se inicia quando vetores se alimentam de sangue de um hospedeiro vertebrado contaminado, ingerindo a forma amastigota do parasita. No intestino médio do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, que ficam aderidos nas microvilosidades do intestino do vetor, multiplicando-se. Após 4 a 7 dias, essas formas sofrem várias transformações, se desligam das microvilosidades e migram para o esôfago do inseto. Este conjunto de transformações é denominado metaciclogenese, que se caracteriza pela transformação das formas promastigotas procíclicas em promastigotas metacíclicas. Quando o inseto vai se alimentar novamente, inocula a saliva contendo os promastigotas metacíclicos no hospedeiro vertebrado. Os promastigotas sobrevivem aos mecanismos de defesa e infectam macrófagos. Nos macrófagos infectados ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos da célula, formando o fagolisossomo. No interior do fagolisossomo, os promastigotas se transformam em amastigotas, que são adaptados a sobreviver em meio ácido. Após a diferenciação os amastigotas se multiplicam, rompem a membrana dos macrófagos e infectam outros macrófagos (Alexander e Vickerman, 1975; Lainson e Shaw, 1987; Bates, 1994).

1.1.3. Hospedeiros invertebrados e vertebrados

Os insetos transmissores da leishmaniose são hematófagos e pertencem à ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e ao gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* ou *Psychodopigus* (Lewis e Ward, 1987). Somente as fêmeas transmitem o protozoário causador da leishmaniose, pois se alimentam de sangue para maturação dos

ovos. No Brasil, os vetores da leishmaniose são conhecidos popularmente como mosquito palha ou birigui e várias espécies podem ser transmissoras em nosso país (Rey, 2001).

No ciclo biológico do parasita, o homem ocupa o papel de hospedeiro acidental. Os principais hospedeiros vertebrados são animais silvestres (roedores, marsupiais e canídeos), considerados os reservatórios naturais e geralmente não desenvolvem a doença. Além dos animais silvestres, é freqüente o encontro de várias espécies domésticas infectadas como: cão, equinos, roedores domésticos ou felinos como o gato (Passos et al., 1996; Hervas et al., 1999; Rey, 2001; De Souza et al., 2005).

1.1.4. Aspectos históricos, epidemiológicos e clínicos das leishmanioses

Classicamente as leishmanioses se expressam no ser humano na forma visceral (leishmaniose visceral, LV), ou na forma tegumentar (leishmaniose cutânea, LC ou leishmaniose muco-cutânea, LMC). Atualmente, a leishmaniose é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em 5 países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Who, 2001). Nos países endêmicos, a leishmaniose continua negligenciada pelo setor privado da economia e tem cabido ao setor público, apesar dos recursos escassos e infraestrutura inadequada, investir no desenvolvimento de novas drogas e métodos de diagnóstico mais eficientes.

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da leishmaniose com casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos. Após o registro da primeira epidemia urbana em

Teresina, no Piauí (Costa et al, 1990), o processo de urbanização se intensificou com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades da região Nordeste (São Luís, Natal e Aracaju), Norte (Boa Vista e Santarém), Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros) e Centro Oeste (Cuiabá e Campo Grande) (Funasa, 2001).

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado. É causada por espécies pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (Lainson, 1987), sendo que no Brasil, o agente etiológico é a *L. (L.) chagasi*, espécie semelhante à *L. (L.) infantum* comum em países do Mediterrâneo e Ásia. Pelo fato da urbanização ser um fenômeno relativamente novo, pouco se conhece sobre a epidemiologia da LV nos focos urbanos. As relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas do que no rural.

A leishmaniose tegumentar é popularmente conhecida no Brasil como úlcera de Bauru e é a forma mais comum da doença. De acordo com as características clínicas e epidemiológicas, a leishmaniose tegumentar é classificada em dois grupos: a leishmaniose cutânea (LC), apresentando lesões cutâneas ulceradas ou não; e a leishmaniose mucocutânea (LMC), apresentando lesões de caráter destrutivo nas mucosas do nariz, boca e faringe. (Rey, 2001). No Brasil, as principais espécies relacionadas com essa forma clínica da patologia são: *L. (L.) amazonensis*; *L. (V.) guyanensis* ou *L. (V.) braziliensis*, sendo essa última responsável pelas formas mucocutâneas (Abramson et al., 1995; Rey, 2001).

Segundo a OMS, a leishmaniose tegumentar é uma das seis doenças infectoparasitárias de maior importância. Em 1998, a incidência no Brasil de casos de leishmaniose tegumentar era de 21.800 casos enquanto que em 2003 foram notificados

mais de 60.000 casos (Organização Mundial de Saúde, disponível em: <http://www.who.int.tdr/dw/leish2004.htm> - acesso em 01-10-2007). Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, os dados disponíveis são baseados na detecção passiva de casos.

Além das três formas clássicas da doença, outras manifestações cutâneas estão cada vez mais presentes, como: a leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), a leishmaniose recidival (LR) e a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC). A LCD é uma forma rara, na qual as lesões são papulosas ou nodulares deformantes e muito graves, distribuindo-se amplamente na superfície corporal (Walton, 1987; Rey, 2001). A LR se refere ao desenvolvimento de novas lesões no centro ou periferia de lesões anteriormente curadas; clinicamente, as lesões podem ter aparência variável, mas comumente se apresentam como feridas eritematosas, papulosas e nodulares (Momeni, 1996). Já a LDPC se manifesta primeiro como lesões de pele na face que gradualmente aumentam em tamanho e espalham-se pelo corpo; eventualmente as lesões podem desfigurar, deixando estruturas inchadas que se assemelham a lepra, e causando cegueira ocasionalmente se atingirem os olhos. Essas formas clínicas estão associadas normalmente ao status imunológico do hospedeiro (Murray, 2005).

Complementando, existem ainda os casos de co-infecção leishmaniose-HIV, cada vez mais frequentes, não só na Europa (Alvar, 2008), como também no Brasil. Ao contrário da Europa onde 88% dos casos de co-infecção ocorrem com leishmaniose visceral típica, no Brasil, os poucos trabalhos existentes, mostram que casos de co-infecção leishmaniose-HIV parecem estar mais associados com a forma muco-cutânea (43% com LMC, 37% com LV e 20% com LC) (Rabello, 2003).

A ocorrência nas áreas urbanas de infecções subclínicas decorrentes da permanente exposição do homem às picadas infectantes prenuncia um grave problema

associado à circulação do vírus HIV, podendo transformar a LV em parasitose oportunista (Dedet et al., 2000). Realmente, a LV apresenta comportamento diferente na co-infecção com HIV, que se reflete principalmente no comprometimento do sistema imune do hospedeiro; o que propicia resposta irregular ao tratamento e alteração do padrão diagnóstico. Tem sido constatado o crescente número de casos de co-infecção *Leishmania*/HIV em áreas urbanas do Brasil, levando ao aparecimento de nova forma de transmissão pelo compartilhamento de agulhas contaminadas, com risco de instalação do ciclo antroponótico artificial (Funasa, 2001).

Além do status imunológico do paciente, esta cada vez mais aceita a hipótese da existência de variação intrínseca de sensibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* frente às diferentes classes de compostos antiparasitários (Croft, 2001). Há mais de 10 anos já foram descritos que quadros clínicos causados por *L. (V.) braziliensis*, mostravam-se mais resistentes aos antimoniais pentavalentes do que os associados com a *L. (L.) mexicana* (Correia, 1996).

1.1.5. Diagnóstico e Tratamento das leishmanioses

O diagnóstico pode ser realizado a partir de quatro métodos: diagnóstico clínico, diagnóstico parasitológico (punção e/ou raspagem da lesão), diagnóstico imunológico (teste de Montenegro, imunofluorescência direta, aglutinação direta ou ELISA) e diagnóstico molecular (hibridação do DNA ou Polymerase Chain Reaction - PCR) (Willians, 1995). Dos métodos citados acima, apenas o diagnóstico molecular fornece resultados mais

sensíveis quando comparado aos outros métodos, constituindo uma das soluções para a identificação da espécie causadora da doença, o que facilita o tratamento, pois já foi observado que as diferentes espécies do parasita comportam-se de forma específica em relação às drogas. Porém, o custo desta metodologia ainda é considerado alto (Castilho et al., 2003).

A utilização dos antimoniais como tratamento para leishmaniose iniciou-se em 1912. Nesta época, os antimoniais trivalentes eram extremamente tóxicos e foram substituídos em 1936 pelos antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumine) que são, pelo menos, 10 vezes menos tóxicos que os trivalentes (Steck, 1974). Até hoje, estes compostos constituem a primeira linha de tratamento, tanto para leishmaniose tegumentar quanto para leishmaniose visceral, sendo administrados por via endovenosa ou intramuscular (Murray, 2001).

O mecanismo de ação dos compostos de antimônio ainda não está bem estabelecido, embora alguns estudos tenham mostrado que o estibogluconato de sódio (Sb-V) inibe a síntese de macromoléculas que estão relacionadas à glicólise e β -oxidação de ácidos graxos (Berman et al., 1987). No entanto, alvos específicos da via ainda não foram identificados. Estudos mais recentes demonstraram indução de apoptose caracterizada por fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserina (Serenio et al., 2001). No entanto, a ação do antimônio pode ser devida à interferência no macrófago hospedeiro (Pathak e Yi, 2001) e também pela inibição das enzimas tripartitiona redutase e glutathione redutase (Cunningham e Fairlamb, 1995).

A variação na resposta clínica aos compostos antimoniais quando utilizados no tratamento de leishmaniose tegumentar, cutânea e mucocutânea nos permite inferir que exista diferenças nos níveis de sensibilidade das diversas espécies de *Leishmania* a

determinados fármacos (Croft et al., 2006). Além de exibir um padrão de eficácia variável, a ocorrência e seleção de parasitas resistentes também dificultam o tratamento da doença (Nare et al., 1997; Mckerrrow, 1999; Thakur et al., 2001).

Devido ao aparecimento desses parasitas resistentes, a dose administrada de antimônio vem sendo aumentada (doses atuais correspondem a 4 vezes as quantidades utilizadas há 20 anos) e, conseqüentemente, os quadros de toxicidade são bem mais freqüentes, apresentando diversos efeitos colaterais, como: insuficiência renal aguda, arritmias, choque pirogênico, hepatotoxicidade e pancreatite, entre outros (Ravdin, 1990; Hepburn, 2000; Kayser et al., 2001; Yaggi e Federman, 2001).

As drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose são a anfotericina B e a pentamidina, sendo utilizadas quando não há uma resposta satisfatória do organismo ao tratamento com drogas de primeira escolha ou na impossibilidade do seu uso. O tratamento com esses fármacos também não supre completamente as necessidades para um bom tratamento, já que possuem uma alta toxicidade, além de alguns casos de resistência (Freire et al., 1997; Aggarwal et al., 1999).

O mecanismo de ação da anfotericina B ocorre através da interação da droga com a molécula de ergosterol, formando poros na membrana plasmática que alteram o equilíbrio iônico, induzindo a morte da célula (Roberts et al., 2003). A utilização da anfotericina B também pode induzir a seleção de parasitas resistentes. Os estudos com leishmania indicam que promastigotas resistentes possuem uma alteração no perfil dos esteróis da membrana plasmática (Mbongo et al., 1998). A anfotericina B também produz efeitos tóxicos graves (Bennett, 1964) e seu uso não é indicado em gestantes, idosos, cardiopatas, nefropatas e hepatopatas (Furtado, 94). As dosagens podem ser reduzidas quando o fármaco é

administrado encapsulado em lipossomos, no entanto, esse tipo de apresentação restringe o uso do medicamento devido ao alto custo (Croft et al., 2005).

Outro medicamento de segunda escolha utilizado na terapêutica é a pentamidina. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado à ligação da droga ao DNA do cinetoplasto (Croft e Coombs, 2003). A pentamidina não deve ser administrada a pacientes com insuficiência renal ou hepática, doenças cardíacas e crianças, por possuir efeitos adversos graves com danos irreversíveis ao fígado, rins e coração (Jha, 1983; Berman, 1997). Pode ainda acarretar o aparecimento de diabetes mellitus dependente ou não de insulina (Jha e Sharma, 1984).

Já o alopurinol possui efeito comparável aos antimoniais quando usado para tratar lesões cutâneas da doença, apesar de seu uso isolado não produzir benefícios nos casos de leishmaniose visceral, que respondem melhor ao tratamento com interferon-gama. Sua eficácia é otimizada com a associação aos antimoniais pentavalentes (Kaplaski et al., 1996). Os casos associados à infecção por HIV devem ser considerados quanto à metodologia de tratamento a ser adotada, pois são requeridas dosagens maiores de antimoniais pentavalentes (Alvar et al., 1997), o que intensifica os efeitos colaterais da droga e, conseqüentemente, propicia o desenvolvimento de mecanismos de resistência do parasita à terapia de tratamento da patologia (Paredes et al., 1997; Olliaro e Bryceson, 1993; Croft, 2001; Berman, 1997).

Recentemente, o miltefosine e a paramomicina foram introduzidos na quimioterapia de tratamento da leishmaniose. O miltefosine (hexadecilfosfocolina) é um medicamento que foi desenvolvido para o tratamento de câncer e quando introduzido no tratamento da leishmaniose, apresentou 95 % de cura nos casos de leishmaniose visceral na Índia (Sundar et al., 2002). O mecanismo de ação deste composto em *Leishmania spp.*

ainda não está plenamente esclarecido, no entanto, infere-se que esteja relacionado com: 1) inibição da síntese de fosfatidilcolina; 2) interferência na transdução de sinal e 3) homeostase de cálcio (Croft e Coombs, 2003). Parasitos resistentes a esse fármaco já foram obtidos in vitro (Seifert et al., 2003), e apresentaram redução dos fosfolipídios insaturados e alteração na via de biossíntese de esteróis (Rakatomanga et al, 2005).

O miltefosine possui uma grande vantagem em relação aos outros fármacos utilizados na terapêutica da leishmaniose por ser administrado por via oral. O tratamento pode então ser realizado sem a necessidade do deslocamento diário até as unidades hospitalares para a medicação, como ocorre com o antimônio. No entanto, alguns efeitos tóxicos também foram relatados, como: distúrbios gastrointestinais, hepato e nefrotoxicidade, além de efeitos teratogênicos em animais de experimentação, o que inviabiliza seu uso na gravidez (Prasad et al., 2004).

Apesar das inovações e associações farmacológicas, a utilização de fármacos no tratamento da leishmaniose vem sendo influenciada cada vez mais por fatores relacionados com: 1) variação na sensibilidade das diferentes espécies, 2) diversidade atual das formas clínicas da doença, e 3) efeitos colaterais graves causados pelas altas dosagens ministradas nos quadros de resistência. Diante desses fatos é imprescindível buscar novos alvos quimioterápicos que possuam um amplo espectro de eficácia com dosagens não tóxicas, administração oral e custos acessíveis (Croft et al., 2002 e Blum et al., 2004; Croft et al., 2006).

1.2. A amplificação gênica atuando como um mecanismo de resistência da leishmânia aos fármacos com ação anti parasitária.

Os mecanismos de resistência da leishmania aos fármacos ainda não são totalmente conhecidos, sendo que a maioria dos dados deriva de estudos com mutantes *in vitro*, nos quais a resistência foi desenvolvida por pressão seletiva (Dey et al., 1994; Legaré et al., 2001).

Para interferir na multiplicação de um microrganismo, um fármaco deve ser capaz de atravessar sua membrana plasmática e encontrar o seu alvo intracelular. O mecanismo de resistência clássica, portanto, seria a diminuição da concentração desse fármaco ativo no interior da célula. O parasita pode diminuir o nível de fármaco intracelular por vários mecanismos, incluindo: diminuição do influxo, aumento do efluxo, inibição da ativação do fármaco, inativação do fármaco ativado pelo metabolismo e finalmente, pelo desenvolvimento de uma via alternativa à via que contém o alvo quimioterápico. Dessa forma, podemos caracterizar o mecanismo de resistência aos antimoniais como multifatorial (Ashutosh et al., 2007).

Outras formas de resistência podem incluir mecanismos de competição pelo substrato, alteração do alvo ou aumento do reparo de danos causados. Em *Leishmania spp.* já foi descrito que a resistência pode estar associada à amplificação de *loci* específicos do genoma (Ellenberger e Beverley, 1989). O processo de amplificação gênica não é exclusivo destes protozoários e pode ser uma das alterações genéticas que determinam a progressão de tumores em mamíferos (Lengauer et al., 1998). As regiões amplificadas do genoma são normalmente denominadas amplicons. Um maior número de cópias de genes contidas nesses amplicons pode mediar o aumento da expressão de genes envolvidos no metabolismo ou inativação de fármacos. Apesar do mecanismo de amplificação gênica em *Leishmania spp.* também não estar totalmente esclarecido, sabe-se que pode ser dependente da presença de pequenas seqüências repetidas do genoma do parasito, que rearranjadas por

recombinação homóloga, frequentemente estão relacionadas com a resistência (Beverley, 1991; Ivens et al., 2005).

Na verdade, a amplificação gênica é um fenômeno usualmente encontrado em células de leishmânia resistentes a um amplo espectro de compostos com ação antiparasitária. Esse fenômeno demonstra a maleabilidade do genoma de *Leishmania spp.* que possui 35 mb distribuídos em 36 cromossomos que variam em tamanho de 0,2 a 3,0 mb (Wincker et al., 1996), e essas mudanças na organização genômica parecem ser uma reação natural frente a condições de estresse. O produto dessa amplificação usualmente consiste de múltiplas cópias de DNAs circulares extracromossomais, chegando a constituir 5 a 10 % do conteúdo genômico do parasita (Coderre et al., 1983; Beverley et al., 1984; Olmo et al., 1995).

Entre as amplificações que ocorrem em resposta à pressão seletiva na presença de drogas específicas, podemos citar dois sítios distintos no DNA: as regiões R e H. A região R contém, entre outros, o gene da DeHidroFolato Redutase Timidilato Sintase (DHFR-TS), cuja amplificação confere resistência ao metotrexato (MTX). Observou-se que a amplificação do gene estrutural de DHFR minimizou os efeitos do MTX em mutantes de *L. (L.) tropica* resistentes, após elevação dos níveis da atividade enzimática (Beverley et al., 1984; Coderre et al., 1983; Beverley et al., 1986; Beverley et al., 1988). O círculo H contém o gene da Pteridina Redutase (PTR1), que foi caracterizado utilizando técnicas de transfecção gênica (Callahan e Beverley, 1992; Papadopoulos et al., 1992; Bello, 1994; Chiquero et al., 1994).

Ambos os genes são capazes de conferir resistência ao MTX após amplificação de seu número de cópias e super expressão. O círculo H também contém o gene *HTBF* envolvido na resistência à terbinafina (Marchini et al., 2003), e o gene de um transportador

ABC (*MRPA*), cuja amplificação e superexpressão conferem resistência ao arsenito e aos antimoniais em *Leishmania spp* (Ouellette et al, 1990; Callahan e Beverley, 1991; Papadopoulos et al., 1994; Chiquero et al., 1994; Anacleto et al., 2003).

Outro caso de resistência relacionado com amplificação gênica foi descrito pelo nosso grupo na caracterização do gene *PRP1* em *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. Este gene codifica o transportador de membrana PRP1 (Pentamidine Resistance Protein), da superfamília de transportadores ABC (ATP Binding Cassette), e é capaz de conferir resistência a pentamidina às células selvagem do parasita após transfecção e super expressão gênica (Coelho et al., 2003; Coelho et al., 2006; Coelho et al., 2007).

Por outro lado, linhagens de *L. (V.) guyanensis* resistentes ao glucantime (Ferreira-Pinto, 1996), apresentaram dois mecanismos distintos de resistência, sendo que a amplificação gênica envolvendo seqüências homólogas do gene *PGPA* foram observadas em um amplicon extracromossômico de 30 kb somente em uma das linhagens estudadas (Anacleto et al., 2003).

Além da amplificação gênica existem outros mecanismos capazes de mediar resistência a drogas ao parasita. Dados obtidos por microarray de DNA têm demonstrado que parasitos resistentes a drogas em diferentes espécies de *Leishmania*, podem apresentar genes super expressos envolvidos na resistência ao Sb(III) e ao MTX, mas que não estão descritos como genes relacionados com a amplificação gênica (Guimond et al., 2003; El Fadili et al., 2005; Marquis et al., 2005). Também foi demonstrado que uma alteração no processamento do RNAm que codifica uma enzima envolvida na via de biossíntese do ergosterol em mutantes resistentes à anfotericina B, resultou na formação de esteróis

funcionais que substituem o ergosterol e caracterizam o fenótipo de resistência aos antibióticos polienos (Joseph-Horne et al., 1997; Pourshafie et al., 2004).

Mutantes resistentes à pentamidina de *L. (L.) major* também foram selecionados, mas nenhuma amplificação foi observada, sugerindo que esse mecanismo não parece ser o responsável pelo quadro de resistência na natureza (Ellenberger e Beverley, 1989; Coelho et al., 2008). Resultados similares foram descritos em mutantes de *L. (L.) donovani* resistentes à miltefosine (Seifert et al., 2003). Nesse último caso, o mecanismo de resistência consiste em uma deficiência no processo de internalização da droga, causado por mutações pontuais no transportador LdMT, uma ATPase tipo P pertencente a uma subfamília de translocases de aminofosfolipídios que afeta o acúmulo da droga pelo parasito (Pérez-Victoria et al, 2003).

Um processo semelhante envolvendo o transportador ABC pode desencadear o mecanismo de resistência a pentamidina nos mutantes de *L. (L.) amazonensis*. Apesar do gene *PRP1* ser capaz de conferir resistência a pentamidina após transfecção, a análise dos transcritos por Real-Time PCR demonstrou que não houve alteração nos transcritos de *PRP1* quando comparados o RNA total de linhagens selvagens e de linhagens resistentes (Coelho et al., 2007; Coelho et al., 2008).

1.3. Via de biossíntese do ergosterol

Entre a vasta diversidade de componentes de membrana, os esteróis são os mais abundantes e importantes constituintes e são encontrados em um amplo espectro de membranas entre várias espécies. Enquanto o ergosterol é o esterol principal na membrana de eucariotos inferiores, incluindo alguns protozoários, fungos, leveduras e insetos como a

Drosophila, o colesterol predomina na membrana plasmática de células de mamíferos e de alguns protozoários parasitas como o *Plasmodium spp.* ou *Giardia lamblia*, que captam o colesterol do hospedeiro para compor suas membranas (Roberts et al., 2003).

O ergosterol é essencial para a permeabilidade e fluidez da membrana, garantindo a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática. A ausência de ergosterol e de seus precursores afeta a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes, tornando o organismo suscetível (Lazardi et al., 1990; Urbina et al., 1991).

O reconhecimento desta via metabólica como indispensável à sobrevivência do parasita a torna um importante alvo de estudo para o desenvolvimento de novos métodos quimioterápicos; além de que a correspondência da via de biossíntese de ergosterol de fungos com a via de biossíntese de ergosterol de tripanossomatídeos torna possível a inserção de drogas quimioterápicas que já vem sendo utilizados com sucesso no tratamento de infecções fúngicas elegíveis para o tratamento da leishmaniose (Dixon et al., 1972).

Os três principais grupos de compostos antifúngicos utilizados atualmente que interagem ou inibem a biossíntese do ergosterol são: os antibióticos polienos, os derivados azólicos e as alilaminas/ tiocarbamatos (Urcuyo e Zaias, 1982; Weinrauch et al., 1983; Berman e Gallalee, 1987; Berman, 1988; Saenz et al., 1990; Back e Tija, 1991; Ryder, 1992; Coppens e Courtoy, 1996).

Os antibióticos polienos ligam-se ao esterol da membrana causando um aumento na permeabilidade da membrana, o que ocasiona a perda de componentes citoplasmáticos e, conseqüentemente, a morte celular (Ghannoum e Rice, 1999). Tanto as alilaminas quanto os tiocarbamatos inibem a esqualeno epoxidase, que juntamente com a oxidoesqualeno ciclase, convertem o esqualeno em lanosterol. Já os derivados azólicos são compostos

sintéticos e atuam na biossíntese do ergosterol, inibindo a C-14 demetilase, numa reação relacionada ao citocromo P450. (Georapadokou e Walsh, 1994) (Fig.1).

Figura 1: Via de biossíntese do ergosterol com as principais enzimas e respectivos inibidores.

1.3.1. Inibidores da via de biossíntese do ergosterol

1.3.1.1. Terbinafina

A alilamina terbinafina (SF-86-327, (E)-N-(6,6-dimetil-2-hepteno-4-il-metil-naftaenometanamina) (TBF) é um fármaco antifúngico que constitui um efetivo e bem tolerado tratamento para um amplo espectro de infecções superficiais da pele. Este agente

antimicótico, age bloqueando a biossíntese de ergosterol, pela inibição da enzima esqualeno-2,3-epoxidase através um complexo sistema de ligação da enzima à membrana, que não faz parte da superfamília do citocromo P450 (Ryder, 1992), e tem se apresentado como um efetivo agente contra *Leishmania Spp* e *T. cruzi* (Urbina et al., 1988). Nos fungos, a ação desses fármacos causa deficiência de ergosterol na membrana e acúmulo de esqualeno intracelular, sendo o último, o principal mecanismo fungicida deste composto contra fungos patógenos, além de apresentar pronunciado efeito no crescimento celular causado pela diminuição de esterol nas membranas celulares. (Petranyi et al., 1987 e Gupta e Shear, 1997).

1.3.1.2. Itraconazol e Cetoconazol

O itraconazol (ITZ) é um derivado triazólico, com ação antifúngica, ativo por via oral. Esse fármaco exerce ação específica sobre o P-450 citocromo, atuando como inibidor da enzima C-14 α -demetilase dos fungos e parasitas causando alteração e rompimento da membrana citoplasmática destes microorganismos sem afetar o sistema enzimático do homem nas doses terapêuticas (Back et al., 1992; Coppens e Courtoy, 1996).

O tratamento oral com ITZ tem sido empregado experimentalmente no tratamento de alguns casos de leishmaniose cutânea que são refratários à terapia convencional, e os resultados obtidos têm sido satisfatórios, o que nos indica uma possibilidade de estabelecer novas metodologias de tratamento, sem expor os pacientes aos efeitos dos antimoniais (Dogra, 1996; Consigli et al., 2006; White et al., 2006; Zeegelaar et al., 2005). A grande vantagem da utilização dos azóis reside na potencial aplicação tópica nas formas cutâneas da leishmaniose (Olliaro e Bryceson, 1993; Croft, 2001). O ITZ é pouco solúvel em água,

mas é absorvido por via oral quando formulado com polietilenoglicol, sendo geralmente bem tolerado, com efeitos adversos em 5% a 8% dos pacientes, como náuseas, cefaléia e dor abdominal (Calvopina et al., 2004).

O cetoconazol (CTZ) é um análogo do ITZ cuja ação leishmanicida já vem sendo estudada há algum tempo (Gebre-Hiwot e Frommel, 1993). Foi observada a potencialização do efeito antiparasitário de Sb-V (Meglumine) associado ao CTZ (Gangneaux et al., 1999; Saenz, 1990), após comparar o tratamento oral com o CTZ e o parenteral com antimônio, sugere que o CTZ pode ser recomendado como tratamento inicial da leishmaniose. Sabe-se também que a *L. (V.) braziliensis* (promastigota) é naturalmente resistente a inibidores de enzima 14α -demetilase (CTZ e ITZ, por exemplo), porém torna-se suscetível a essas drogas quando administrada sinergisticamente com um inibidor de enzima esqualeno epoxidase (TBF, por exemplo) (Urbina, 1997). Semelhantemente à ação do ITZ, o CTZ exerce ação fungicida por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática, que passam a perder cátions, proteínas e outros elementos vitais, ocorrendo por fim, o rompimento da membrana. Além deste mecanismo de ação, o CTZ e demais derivados imidazólicos alteram a síntese de triglicerídeos e fosfolipídios e, em altas concentrações provocam a morte celular por causar o acúmulo de peróxido de hidrogênio ao bloquear as enzimas peroxidativas. (Van Den Bossche et al., 1983).

O CTZ é rapidamente absorvido por via oral, atingindo níveis séricos máximos duas a quatro horas após a administração e mantendo concentrações ativas no sangue por mais de 11 horas, variando a absorção com estado de acidez gástrica, sendo maior em pH igual ou inferior a 2, sendo habitualmente bem tolerado (Van Den Bossche et al., 1983).

Graças a essas características, os inibidores da via de biossíntese do ergosterol, principalmente o ITZ/CTZ e a TBF seriam fármacos promissores para a cura da

leishmaniose, no entanto, os quadros de resistência apresentados pelas *Leishmania spp*, impedem a implantação desses fármacos como únicos agentes anti-leishmanicidas (Momeni et al., 1996, Calvopina, 2004). Neste trabalho, propomos o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência a fármacos, a fim de localizar possíveis alvos de ação e estabelecer novos métodos quimioterápicos.

1.4. Aplicações de técnicas de biologia molecular no estudo dos aspectos moleculares e bioquímicos relacionados com a resistência

O estudo dos aspectos moleculares e bioquímicos relacionados à resistência a fármacos em *Leishmania spp* é um campo promissor para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos compostos quimioterápicos atualmente utilizados e assim, conseqüentemente, para o estabelecimento de alternativas de tratamento e controle da doença (Croft, 2001; Ouellette, 2001). Atualmente este estudo é possível através do uso de técnicas moleculares de transfecção gênica que utilizam vetores conhecidos como “shuttle vectors” capazes de se propagar tanto no parasito quanto em prófagos. Esses vetores também têm a capacidade de se replicar extracromossomalmente após transfecção e de amplificar o número de cópias de seu DNA após indução externa (Le Bowitz et al., 1990; Ryan et al, 1993; Descoteaux et al., 1994). Através desta abordagem, Cotrim, Garrity e Beverley (1999) demonstraram que ao transfectar uma genoteca de DNA de *L. (L.) major* nos vetores citados, poderia ser isolado um cosmídeo que contém um gene e/ou locus que codifica para uma proteína cuja superexpressão confere resistência a um determinado composto. A construção da genoteca descrita neste trabalho foi constituída por DNA genômico de *L. (L.) major* da cepa V1 (virulenta) transfectado em parasitas selvagens da

cepa A1 (não virulenta) (Descoteaux et al., 1994 e Ryan et al., 1993). A viabilidade deste protocolo foi confirmada isolando cosmídeos que continham genes sabidamente conhecidos e que conferiam resistência após amplificação gênica ao metotrexato (*DHFR-TS* e *PTR1*) ou tubercidina (gene *TOR*) (Coderre et al., 1983; Callahan e Beverley, 1992; Kerby, Dekte, 1993; Dekte, 1997).

A partir desta metodologia foram selecionados nove cosmídeos resistentes a dois inibidores da via de biossíntese do ergosterol, a Terbinafina (TBF) e o Itraconazol (ITZ). Esses cosmídeos foram denominados cItz1, cItz2, cItz4 (exibindo resistência ao ITZ) e cTbf1, cTbf2, cTbf3, cTbf4, cTbf5, cTbf6 (exibindo resistência ao TBF). Esses nove cosmídeos eram diferentes entre si, pois pertenciam a diferentes *loci* gênicos e eram capazes de conferir resistência ao ITZ e à TBF após transfecção e amplificação do número de cópia de seus insertos. A análise prévia desses *loci* indicou também que se tratava de *loci* diferentes dos previamente descritos e relacionados com a resistência ao metotrexato, pentamidina ou tubercidina (Cotrim et al, 1999).

Acreditamos que a identificação desses *loci* poderá contribuir para o desenvolvimento de novas terapias alternativas baseadas em diferentes vias metabólicas do parasita que possam ser tão, ou mais, eficazes que os antimoniais pentavalentes empregados atualmente como tratamento de primeira linha nas leishmanioses. Esse tipo de abordagem vem sendo realizado com sucesso em nosso laboratório com cosmídeos isolados a partir de experimentos com pentamidina (Coelho et al., 2003) e tubercidina (Aoki et al., 2008).

Os dados da seleção dos cosmídeos resistentes ao itraconazol e à terbinafina estão descritos na tabela 1, juntamente com os resultados preliminares dos testes funcionais e seus respectivos índices de resistência.

Tabela 1: Padrão de resistência a terbinafina e itraconazol (valor de IC₅₀) das células de LmFA1 selvagem e transfectadas com os DNAs dos cosmídeos indicados.

		Terbinafina				Itraconazol			
Linhagem celular		IC 50 (μ M)	Razão de resistência	(p)	(n)	IC 50 (μ M)	Razão de resistência	(p)	(n)
A	LmFA1	13.6 $\pm$ 4.7	1		6	1.58 $\pm$ 0.25	1		5
	Tbf 1	26.0 $\pm$ 17.6	1.9 $\pm$ 0.7	< 0.05	6	9.50 $\pm$ 4.51	6.56 $\pm$ 3.22	< 0.05	4
	Tbf 2	22.8 $\pm$ 6.5	1.8 $\pm$ 0.6	< 0.05	5	0.56 $\pm$ 0.11	0.37 $\pm$ 0.12	< 0.01	5
	Tbf 3	34.6 $\pm$ 25.5	2.4 $\pm$ 0.8	< 0.01	6	4.64 $\pm$ 0.61	2.98 $\pm$ 0.78	< 0.01	5
	Tbf 4	36.0 $\pm$ 23.0	2.5 $\pm$ 0.5	< 0.01	5	0.57 $\pm$ 0.19	0.36 $\pm$ 0.14	< 0.01	5
	Tbf 5	20.2 $\pm$ 11.9	1.5 $\pm$ 0.4	< 0.01	6	5.62 $\pm$ 2.28	3.80 $\pm$ 1.59	< 0.01	4
	Tbf 6	27.0 $\pm$ 3.9	1.9 $\pm$ 0.5	< 0.05	5	4.42 $\pm$ 2.03	2.75 $\pm$ 1.00	< 0.05	5
B	LmFA1	11 $\pm$ 1.1	1		4	0.81 $\pm$ 0.19	1		4
	ltz 1	14.6 $\pm$ 7.56	1.33 $\pm$ 0.60	ns	4	1.37 $\pm$ 0.51	1.65 $\pm$ 0.26	< 0.01	4
	ltz 2	21.2 $\pm$ 7.18	1.9 $\pm$ 0.50	< 0.05	4	4.77 $\pm$ 2.46	6.15 $\pm$ 3.84	< 0.05	4
	ltz 3	12.0 $\pm$ 1.00	1.13 $\pm$ 0.05	ns	3	1.07 $\pm$ 0.38	1.27 $\pm$ 0.31	ns	4
	ltz 4	16.5 $\pm$ 4.80	1.47 $\pm$ 0.52	ns	4	3.37 $\pm$ 1.20	4.07 $\pm$ 0.57	< 0.05	4

- A média +/- o desvio padrão dos (n) experimentos estão representados (μM). Valores significativamente diferentes (p) em relação às células selvagens (razão de resistência = 1) foram determinados pelo teste *t* de Student.
- ‘razão de resistência’ é a razão entre os valores de IC₅₀ obtidos quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com os cosmídeos, pelo valor de IC₅₀ das células selvagens (LmFA1) medido em cada experimento.
- A: cosmídeos selecionados em presença de terbinafina;
- B: cosmídeos selecionados em presença de itraconazol.

2 Objetivos

Os objetivos principais do trabalho apresentado nesta dissertação foram a identificação, análise e localização cromossômica de nove diferentes *gene-loci* de *Leishmania (L.) major* clonados em cosmídeos de expressão e que apresentaram relação com a resistência a TBF e ao ITZ/CTZ após transfecção e amplificação gênica. Os experimentos apresentados e discutidos nesta dissertação visaram:

1. Mapear os insertos de DNA dos cosmídeos relacionados com a resistência a TBF e ao ITZ/CTZ;
2. Obter diferentes deleções dos insertos dos cosmídeos relacionados com a resistência a TBF e ao ITZ/CTZ;
3. Analisar o índice de resistência aos fármacos em estudo das deleções obtidas após transfecção dos insertos em células selvagens de *L. (L.) major*;
4. Subclonar, seqüenciar e analisar os *gene-loci* relacionados com a resistência a TBF e ao ITZ/CTZ;
5. Localizar cromossomalmente os *gene-loci* relacionados com a resistência a TBF e ao ITZ/CTZ.

3 Métodos

3.1 Organismos

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

Escherichia coli [DH5- α].

3.2 Tampões, soluções e meios de cultura

3.2.1 Tampões e soluções

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

TAE 1x: Tris acetato 40 mM; ETA 2 mM.

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

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

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

3.2.2 Meios de cultura para bactérias

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

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

LBA líquido: LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para selecionar as bactérias transformadas com o cosmídeo ou plasmídeo.

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

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

TSB glicose: TSB contendo glicose 20 mM.

3.2.3 Meio de cultura para *Leishmania major*

M199 (GIBCO-BRL): suplementado com soro fetal bovino 10%, previamente inativado por uma hora a 56°C; adenina 100 uM; HEPES 40 mM (pH 7,4); hemina 10 ug/mL; penicilina 50U/mL; estreptomicina 50ug/mL; biotina 4uM (Kapler et al., 1990). Esterilizado por filtração.

3.3 Vetores

Os vetores utilizados foram os “shuttle vectors” cLHYG e pSNBR capazes de se propagar tanto em *Leishmania spp* quanto em *Escherichia coli* (Ryan, Dasgupta & Beverley, 1993). Os vetores escolhidos possuíam genes marcadores através de resistência a antibióticos, a saber: o gene Hygromicina B fosfotransferase, que confere resistência a Hygromicina (Cruz, Coburn & Beverley, 1991) e o gene Neomicina fosfotransferase, que confere resistência ao antibiótico Neomicina (G418) (Cruz e Beverley, 1990), para seleção em *Leishmania spp*. Esses vetores replicam-se extra-cromossomalmente após

transfecção e podem ser induzidos a amplificar seu número de cópias (Kapler, Coburn & Beverley, 1990; LeBowitz et al., 1990; Ryan, Dasgupta & Beverley, 1993). Ainda possuem uma origem de replicação e um gene marcador de resistência a ampicilina para propagação em *E.coli* (Descoteaux e cols, 1994).

3.4 Cultivo das formas promastigotas de *Leishmania major*

Para análise da inibição do crescimento *in vitro* das formas promastigotas de *L. major*, os parasitos foram cultivados em meio 199 e incubados separadamente em concentrações crescentes de terbinafina, itraconazol/cetoconazol em estufa B.O.D a 26 °C, em frascos de 25 cm³ contendo 5 a 10 ml de meio de cultura ou em placas de 24 poços com 1 ml de meio. Após a incubação, em intervalos de 12/24 h durante 96/120 h, foi retirado 0,1 ml de cada cultura para contagem celular em um contador de células Coulter Counter, modelo T890.

3.5. Mapeamento dos insertos dos cosmídeos que conferem resistência a terbinafina e ao itraconazol/cetoconazol

3.5.1 Processo de transformação em *E. coli*

O processo de transformação utilizado foi baseado no protocolo descrito por Chung & Miller (1988) com algumas alterações. A princípio, preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia de bactéria *Escherichia coli* (DH10-β) em 5 ml de meio Luria Bertani (LB), que foi ser incubado cerca de 14 horas a 37°C. Após isso, foi feita uma diluição em meio

LB, na proporção de 1:100, sendo incubada por mais 2 horas. Essa nova cultura foi centrifugada a 1.000xg por 10 minutos a 4°C e ressuspensa em 1:10 do volume total em TSB gelado. A cerca de 100µl desta suspensão gelada, foi adicionada 10µg do DNA que foi transformado. A suspensão foi mantida em gelo por um período de 30 minutos e em seguida, incubada por 2 horas a 37°C com agitação e plaqueada em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas de petri foram incubadas por 24 horas a 37°C.

3.5.2 Extração do DNA dos cosmídeos/ plasmídeos a partir da *Escherichia coli*

O processo de extração de DNA do cosmídeo segue o protocolo descrito por Birboim & Doly (1979), no qual inicialmente foi coletada uma colônia recombinante da placa de Petri contendo o produto da transformação do item anterior, inoculando-a em um tubo com 4 ml de LBA líquido e incubando-a a 37°C sob agitação constante por 14 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 100 µl da solução contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM (pH8,0) e glicose 50 mM e transferidas para um microtubo onde adicionou-se 200 µl da solução de NaOH 0,2 M; SDS 1%. Por inversão, as células foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente durante 3 minutos. A seguir, adicionou-se 200µl de solução de ácido acético glacial 6 M e acetato de potássio 3 M, incubando a amostra no gelo por 25 minutos. A suspensão foi centrifugada a 13 °C a 13.000 rpm durante 8 minutos. Do resultante desta centrifugação, cerca de 400µl do sobrenadante foram transferidos para um tubo contendo 300µl de isopropanol. A

centrifugação foi repetida nas mesmas condições. O DNA precipitado foi lavado com 500µl de etanol 70% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi removido e o tubo contendo DNA precipitado, seco em estufa a 42°C por 30 minutos. Após esse período, o DNA precipitado foi ressuspensão em 40 µl TE RNase e incubado por minutos a 37°C.

3.5.3 Digestão do DNA dos cosmídeos/plasmídeos com enzimas de restrição

Uma vez isolados, os DNAs dos cosmídeos/plasmídeos foram submetidos a digestões totais com enzimas de restrição. Para a digestão foi utilizado cerca de 5 µl do DNA obtido no processo anterior, 1µl da enzima de restrição apropriada para a reação (10 U/µl), tampão de reação apropriado da enzima 10X e água bidestilada, deionizada e autoclavada, para um volume final de 10 µl. As digestões foram processadas sempre num período de 4 horas a temperatura adequada conforme orientação do fabricante. Os DNAs digeridos com as enzimas apropriadas foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose para análise do padrão de restrição.

3.5.4 Eletroforese em gel de agarose

Foi utilizado gel de agarose 0,8%, dissolvido em tampão de corrida TAE, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), e o padrão de peso molecular obtido foi o DNA do fago Lambda (λ) digerido com *Hind III*, que apresenta os seguintes fragmentos em quilobase (kb): 23,1; 9,4; 6,5; 4,4; 2,3; 2,0 e 0,6. Para as amostras foi adicionado tampão de amostra de DNA (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 20% de glicerol). As

corridas eletroforéticas foram realizadas a 60V, ou com a voltagem de acordo com o produto a ser analisado.

3.5.5 Obtenção das deleções por digestão parcial e total dos cosmídeos relacionados com a resistência a terbinafina e ao itraconazol/cetoconazol

A fim de procedermos com a digestão parcial e total, foi necessário selecionar uma enzima de restrição que não possuísse sítios no interior do vetor escolhido, visando manter as propriedades do vetor inalteradas.

O processo de obtenção das deleções foi iniciado pela digestão parcial, que permitiu a digestão em diferentes intervalos de tempo. O intervalo escolhido foi o que forneceu melhor relação tamanho pela quantidade de fragmentos obtidos.

O intervalo escolhido foi submetido à ligação dos fragmentos através da ação da enzima T4 DNA ligase (GIBCO), para a obtenção de ligantes diferenciados. Realizada a ligação, o produto desta foi transformado, conforme o protocolo descrito anteriormente. As colônias provenientes da transformação tiveram seu DNA isolado e digerido totalmente com a enzima selecionada para cada cosmídeo, o que possibilitou o mapeamento das deleções obtidas.

3.6. Análise do papel de cada deleção na resistência a terbinafina e ao itraconazol/cetoconazol

A análises da deleções destes cosmídeos foram realizadas através da transfecção de cada uma das deleções obtidas em parasitos selvagens (A1) de *L. major*, por eletroporação. Os protocolos de transfecção estão descritos detalhadamente em Kapler e cols, 1990;

Beverley e Clayton, 1993 e Descoteaux e cols, 1994; e conduziram os processos descritos a seguir.

3.6.1 Transfecção do DNA das deleções obtidas nos parasitos de *L. major*

Para cada transfecção foram utilizadas cerca de 4×10^7 parasitos selvagens de *L. major*, cepa Friedlin A1, para cada 10 a 100 µg de DNA a ser transfectado. O equipamento para processar a eletroporação é um sistema gerador de pulsos elétricos (Gene Pulser II e Capacitância Extender Plus – (Bio RAD)), regulado para voltagem e capacitância de 2.25 kV/cm e 500µF, respectivamente. Após a transfecção, os parasitos foram incubados por 10 minutos no gelo e, em seguida, cultivados por cerca de 18h a 26°C em 10 mL de meio 199. Após esse período, os parasitos foram repicados em meio 199 acrescido de higromicina e mantidos por 10 a 15 dias a 26°C. Apenas os parasitos que possuíam o cosmídeo cLHYG, que contém um gene de resistência a higromicina, foram capazes de sobreviver e dividir-se.

Desta forma, os repiques foram realizados até ser atingida a quantidade de 500 µg/ml de higromicina, o que selecionou os parasitas, induzindo a amplificação de cópias do cosmídeo; condição favorável para o início dos testes com o fármaco em estudo.

3.6.3 Análise de dados

Para cada cosmídeo testado, foram realizados pelo menos 6 experimentos independentes. O número de parasitos vivos, determinado após a contagem de cada cultura individual era convertido para valores em porcentagem, considerando um crescimento de

100% a cultura cultivada em ausência dos fármacos. Estes valores eram então utilizados para a elaboração de curvas de inibição do crescimento em que determinava-se o valor de IC50 (concentração de droga necessária para inibir o crescimento celular em 50%) para cada experimento independente. A média e o desvio padrão dos valores de IC50 de um número (n) experimentos eram calculados para cada linhagem testada (parasitos selvagens e transfectados). A razão de resistência foi o parâmetro utilizado para os testes estatísticos de resistência a droga, que foram definidos pela razão do valor do IC50 da linhagem experimental (transfectantes) pelo IC50 das células selvagens (Lm A1) medido num mesmo experimento de um número (n) de experimentos. Valores diferentes do tipo selvagem (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base do teste t de *Student*, considerando um $p > 0,05$ como significativo.

3.6.3 Extração de DNA de cada cosmídeo ou plasmídeo de *Leishmania major*

Para a confirmação do DNA transfectado em células selvagens, este foi extraído segundo protocolo por Ryan, Dasgupta, Beverley (1993); Descoteaux et al., (1994). Cerca de 2×10^8 células eram centrifugadas por 10 minutos a 1.680xg. O sobrenadante era descartado e com o sobrenadante residual ressuspensava-se o sedimento celular que era em seguida transferido para um tubo de microcentrífuga. As células eram novamente sedimentadas e, após total remoção do sobrenadante, ressuspensas em 100 μ l da solução contendo Tris-HCl 25 mM (pH8,0); EDTA 10mM (pH8,0) e glicose 50 mM. Após isto, era adicionado 200 μ l da solução de NaOH 0,2 M; SDS 1%, agitando-se lentamente por inversão e incubando no gelo por 30 minutos. A seguir, 150 μ l da solução de acetato de sódio 3M (pH 4,8) era adicionado e a solução incubada no gelo por mais 5 minutos. A

solução era centrifugada a 18.000 xg, a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA do cosmídeo/plasmídeo era transferido para um novo tubo de microcentrífuga contendo 400 ul de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado a 18.000xg por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa era transferida para um outro tubo contendo etanol 100% e a solução incubada a -20°C por 30 minutos. A seguir, esta solução era centrifugada após 10 minutos a 18.000 xg a 4°C. O sobrenadante foi removido e o tubo contendo o DNA precipitado foi submetido a secagem a 42 °C durante 30 minutos. Após a secagem, o DNA obtido foi ressuspensão em 50 ul de TE RNase e incubado por minutos a 37°C. Em seguida, era adicionado 50 ul da solução de NaCl 0,8 M; PEG (PM 8000) 13% (m/v) e então o tubo contendo o DNA incubado no gelo durante 2 horas. Após a incubação o tubo era centrifugado a 18.000 xg por minutos a 4°C. O sobrenadante era removido e adicionava-se então 500ul de etanol 70%, sendo centrifugado a 18.000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente removido e o tubo contendo o DNA precipitado foi submetido à secagem a 42°C por 30 minutos. O DNA obtido era ressuspensão em 20 ul de TE e armazenado a -20°C, podendo assim, ser analisado em gel de eletroforese após digestão com enzimas de restrição.

3.7 Sequenciamento do inserto relacionado com a resistência a terbinafina e ao itraconazol/cetoconazol

Determinada a região do inserto relacionado com a resistência, foi dado início ao sequenciamento destas regiões. O método utilizado foi o do dideoxinucleotídeo descrito por Sanger & Coulson, 1977; sendo processado por um sequenciador automático modelo ALFExpress TM (Amersham Pharmacia Biotech), em conjunto com o kit para reação

Cy5™ Thermo Sequenase Dye Terminator (Amersham Pharmacia Biotech), que utiliza marcadores fluorescentes para leitura dos resultados.

Os fragmentos seqüenciados foram submetidos a análise e comparação através de programas de computador apropriados que se encontram disponíveis em associação com análises comparativas no GenBank, pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul e cols, 1990) do site do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) no site do Projeto Genoma de *Leishmania major* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/beowulf_index.shtml) e no Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>)

4 Resultados

Vimos que o objetivo principal desse projeto é identificar e localizar cromossomalmente 9 *loci* de *L. (L.) major* relacionados com a resistência a dois inibidores da biossíntese de Ergosterol. Assim, a título de facilitar a disposição dos resultados obtidos, e considerando que cada identificação é um processo individual, os resultados serão apresentados em itens separados de acordo com cada um dos cosmídeos analisados. Primeiramente serão relatados os resultados referentes à caracterização do DNA do inserto do cosmídeo cItz2 que servirá de modelo para a estratégia seguida nas demais caracterizações. O DNA do inserto cItz3, não conferiu resistência após transfecção em LmFA1 e, portanto não foi considerado. No decorrer dos relatos de cada um dos cosmídeos analisados vou sempre me referir aos dados apresentados na tabela 1, apresentada na introdução.

4.1.Cosmídeo cItz2

4.1.1 Avaliação do DNA do inserto cItz2: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O primeiro procedimento adotado na identificação de um gene no interior de um inserto clonado é a análise do padrão de digestão total do DNA do cosmídeo com diferentes enzimas de restrição. No entanto, deve-se utilizar uma enzima de restrição que não clive o DNA do vetor cL-HYG, que deve permanecer íntegro para os procedimentos posteriores de transfecção e transformação. Várias enzimas de restrição preenchem esse requisito, entre elas: *Apa I*, *Bgl II*, *Eco RV*, *Hind III*, *Kpn I* ou *Xba I*. É importante ainda que essa enzima de restrição reconheça um mínimo de 5 sítios no interior do inserto para gerar em uma segunda etapa um grande número de deleções do inserto. Assim, o DNA do cosmídeo cItz2 foi inicialmente digerido em condições totais com algumas das enzimas restrição indicadas

acima. Verificamos que a digestão com a enzima *Eco* RV (Fig. 2, linha 3) foi capaz de gerar 8 fragmentos do inserto cItz2 (reconhecendo portanto 8 sítios no interior desse inserto). Dessa forma, a enzima *Eco* RV foi utilizada para a obtenção de deleções do inserto cItz2 por digestão parcial, descrita a seguir.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo o produto da digestão total do DNA do cosmídeo cItz-2 com diferentes enzimas de restrição. 1- *Apa* I; 2- *Bgl* II; 3- *Eco* RV; 4- *Hind* III; 5- *Kpn* I; 6- *Xba* I.
PM: Padrão de peso molecular em quilobase representado pelo DNA do fago λ digerido com *Hind* III.

O DNA do cosmídeo cItz2 foi submetido à digestão parcial com *Eco* RV, seguido de ligação das extremidades com a enzima *T4*-DNA Ligase, também em condições parciais. Essa técnica propicia a obtenção de diferentes populações de deleções do inserto, conforme descrito no item 5.5 de Materiais e Métodos. Todas as construções obtidas foram

transformadas em *E. coli*, e após expansão e plaqueamento, o DNA de um grande número de colônias foi extraído e submetido novamente à digestão com *Eco* RV (agora total). De acordo com a figura 3, podemos verificar a presença de 5 diferentes padrões de digestão. Uma sexta deleção também foi obtida, porém não está representada na figura 3. Conforme as regras de nomenclatura aceita, as deleções foram denominadas: cItz2- Δ *Eco*RV-A, cItz2- Δ *Eco*RV-B, cItz2- Δ *Eco*RV-C, cItz2- Δ *Eco*RV-D, cItz2- Δ *Eco*RV-E e cItz2- Δ *Eco*RV-F, sendo que a deleção cItz2- Δ *Eco*RV-C era o produto da digestão total do DNA do cItz2 com *Eco* RV.

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo o produto da digestão total com a enzima *Eco* RV dos DNAs do inserto cItz-2 e das cinco deleções indicadas. Não está representada a digestão do DNA da deleção cItz2- Δ *Eco*RV-E.
PM: Padrão de peso molecular em quilobase representado pelo DNA do fago λ digerido com *Hind* III I.

Com base no padrão de digestão total dos DNAs das deleções obtidas, deduzimos um provável mapa para o inserto *cItz2*, conforme registrado na figura 4). Para essa dedução, partimos da suposição que as deleções contendo um ou dois fragmentos *Eco* RV do inserto (*cItz2*- Δ *Eco*RV-A, *cItz2*- Δ *Eco*RV-B e *cItz2*- Δ *Eco*RV-D na Fig. 3), devem ter um desses fragmento diretamente ligado ao fragmento contendo o DNA do vetor (o DNA do vetor *cLHYG* tem cerca de 11kb de extensão), e assim por diante. Dessa forma, representamos na figura 4 os mapas prováveis das 5 deleções obtidas (contendo insertos com cerca de 2,2; 5; 1; 1,1; 1,2; 5,5 e 2kb, respectivamente), bem como do inserto *cItz2* original de aproximadamente 25-30 kb.

Figura 4: Mapa de restrição do cosmídeo *cItz2* e suas deleções representados linearmente. Os números representam o tamanho de cada fragmento em kb. Os retângulos laterais representam o DNA do vetor *cLHYG*.

Os DNAs de todas as deleções obtidas foram transfectados e analisados funcionalmente em presença de doses crescentes de Cetoconazol, após superexpressão gênica induzida por passagens sucessivas em presença de higromicina, conforme descrito no item 6.1 de Materiais e Métodos.

Os testes funcionais indicaram que apenas a deleção cItz2- Δ EcoRV-F foi capaz de conferir níveis de resistência maiores do que os apresentados pelo inserto do cItz2 original, e por sua vez ambos maiores do que os níveis de resistência ao CTZ apresentados pelas células selvagens de *L. (L.) major* da cepa FriedlinA1 (LmFA1), respectivamente 1,5 e 2 vezes maiores (Fig. 5).

Figura 5: Curva de inibição de crescimento das células selvagem (LmFA1) e transfectadas com os DNAs do cosmídeo cItz-2 e das deleções indicadas sempre em presença de concentrações crescentes e indicadas de CTZ.

A análise quantitativa desses testes funcionais mostrou que o padrão de resistência apresentado pelas células transfectadas com os DNAs do cItz2 original e da deleção cItz2- Δ EcoRV-F, também poderiam ser considerados significativamente diferente aos padrões de resistência verificados para as células selvagens (tabela 2). Os dados da tabela 2 representam os valores de IC₅₀ calculados para cada experimento, e mostram que as células

transfectadas com os DNAs do *cItz2* e da deleção *cItz2-ΔEcoRV-F* apresentavam, respectivamente, a razão de resistência (RR) de 2,5 e 1,64 vezes mais resistentes que as células LmFA1.

Comparando estes dados com o mapa genômico proposto na figura 4 é possível supor que o gene relacionado com resistência a ITZ/CTZ esteja contido no fragmento *EcoRV* de aproximadamente 5,0 Kb. Esse é o único fragmento comum presente tanto no inserto da deleção *cItz2-ΔEcoRV-F*, como no inserto do *cItz2* original, e que foram as únicas construções a conferir níveis significantes de resistência a ITZ após transfecção e super-expressão gênica (Tab. 2 e Fig. 4).

Tabela 2. Resistência das células transfectadas com os DNAs dos cosmídeos *cItz2*, *cItz2-ΔEcoRV-2B*, *cItz2-ΔEcoRV-2C*, *cItz2-ΔEcoRV-2D*, *cItz2-ΔEcoRV-2F* e células LmFA1 em presença de concentrações crescentes de ITZ/CTZ.

Linhagem celular	ITZ/CTZ		(n)	(p)
	IC ₅₀ (μg/mL)	RR		
Lm FA1	10,1 ± 3,95	1	10	ns
<i>cItz2</i>	16,4 ± 2,09	1,64	5	< 0,001
<i>cItz2-ΔEcoRV-2B</i>	5,60 ± 1,25	0,56	4	ns
<i>cItz2-ΔEcoRV-2C</i>	13,7 ± 1,72	1,37	6	ns
<i>cItz2-ΔEcoRV-2D</i>	8,60 ± 2,25	0,86	4	ns
<i>cItz2-ΔEcoRV-2F</i>	20,8 ± 1,29	2,05	6	< 0,001

- A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (**n**) de experimentos independentes está representado para cada linhagem testada.
 - A razão de resistência foi definida pela média ± o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com os cosmídeos, pelo valor de IC₅₀ das células selvagens medido em cada experimento.
 - Valores significantemente diferentes do valor do tipo selvagem (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student.
- ns** – não significante (**p** > 0,05)

4.1.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cItz2 no genoma de *L. (L.) major*.

A estratégia utilizada para a localização do inserto cItz2 no genoma de *L. (L.) major* consistiu em subclonar o fragmento de aproximadamente 2 Kb do inserto cItz2 em vetor apropriado, seguida de seqüenciamento de nucleotídeos e posterior comparação com os dados disponibilizados no banco de dados genômico (GenBank).

A construção apropriada para o sequenciamento foi realizada iniciando-se pela digestão total do DNA do inserto cItz2- Δ EcoRV-A com a enzima de restrição *Eco* RV, que gerou um fragmento de aproximadamente 2 kb.

Por se tratar de um fragmento gerado pela digestão com uma enzima que cliva as extremidades em fundo cego (*blunt ends*), sua subclonagem no vetor pGEM-T (Promega, Fig. 6A) seria possível se inseríssemos dois resíduos de adenina nas extremidades do fragmento, já que o vetor escolhido é conveniente para a clonagem de produtos de PCR, por possuir um resíduo timina em ambas extremidades, o que proporciona a eficiência da ligação de um produto de PCR ao plasmídeo e evita a recircularização do vetor. Outra característica importante desse vetor é a presença de um sítio de reconhecimento para a enzima *Eco* RI no sítio de clonagem. Essa propriedade facilita a remoção do inserto para subclonagem ou análise em eletroforese com um único processo de digestão.

Procedemos com a inserção dos resíduos de adenina no fragmento de aproximadamente 2 Kb da deleção cItz2- Δ EcoRV-A (Fig. 6B), extraído a partir do gel de eletroforese e purificado com GeneClean e o clonamos no vetor pGEM-T. Transformamos o produto da ligação em *E. coli*, conforme o protocolo descrito em Materiais e Métodos (item 5.1) e obtivemos quatro colônias. Os DNAs dessas colônias foram extraídos e digeridos totalmente com a enzima *Eco*RI. Os produtos das digestões foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose, no qual foi possível verificar o aparecimento de dois fragmentos: um de aproximadamente 2,0 Kb e o outro, de aproximadamente 3,0 Kb; sendo que o fragmento de 3 kb corresponde ao DNA do vetor pGEM-T e o fragmento de 2kb corresponde ao fragmento purificado a partir da digestão do *clt2-ΔEcoRV-A* com *EcoRV* (Fig. 6B e 6C).

(A)

(B)

(C)

Figura 6: (A) Esquema representativo do vetor pGEM-tTM EVS, com os genes marcadores e o sítio de clonagem com as enzimas que podem ser utilizadas para a remoção do fragmento inserido.

(B) Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo o produto da clonagem do fragmento de aproximadamente 2 kb proveniente da digestão do *clt2-ΔEcoRV-A* com *EcoRV*, que teve dois resíduos de adenina adicionados às suas extremidades, após digestão com a enzima *EcoRI*, que confirmou a clonagem, fornecendo dois fragmentos, um de aproximadamente 3 kb referente ao vetor, e outro referente ao fragmento do cosmídeo *clt2-ΔEcoRV-A* de aproximadamente 2kb.

(C) Representação esquemática do mapa genômico do cItz2 e do cItz2- Δ EcoRV-A, que foi o cosmídeo utilizado para a remoção do fragmento de aproximadamente 2 kb para subclonagem em pGEMT™.

A análise comparativa da sequência de nucleotídeos das extremidades do fragmento da deleção cItz2- Δ EcoRV-A contendo 742 pb na extremidade 3' e 664 pb na extremidade 5' foram obtidas de acordo com o método de seqüenciamento dos dideoxirribonucleotídeos proposto por Sanger, Nicklen e Coulson, com os dados disponibilizados no GenBank, permitiu localizar o inserto cItz2 no interior do cromossomo 29 do genoma de *L. (L.) major*. Verificamos ainda que o inserto total de cItz2 possui aproximadamente 20.400 e que o mapa de restrição previsto anteriormente com base apenas no perfil de digestão total com a enzima *EcoRV* (Fig.3) estava correto, tanto na localização dos fragmentos em relação às extremidades, quanto à estimativa do tamanho dos mesmos. A partir desses dados, podemos representar o mapa genômico do inserto do cItz2, de acordo com os dados do banco genômico (Figura 7).

Figura 7: Mapa de restrição do cosmídeo cItz2 e suas deleções representados linearmente. Os números representam a quantidade de pares de bases (pb) Os retângulos laterais representam o DNA do vetor cL-HYG.

Com base nesses dados, estamos sugerindo que a região obtida através de análise no Gene DB é a mesma região isolada através dos nossos testes de análise de fenótipo/genótipo. Os valores estimados relativos ao tamanho dos fragmentos do inserto cItz2 foram então corrigidos de acordo com os dados encontrados na sequência do contig.

A partir da sequência de nucleotídeos do fragmento de 2,102 pb, deduzimos a sequência de aminoácidos do inserto cItz2, verificando a presença de 2 fases de leitura abertas (Open Reading Frames –ORFs) localizadas no interior do fragmento de 5,780 pb que contém o provável locus relacionado com a resistência a ITZ (Fig.8)

Figura 8: Identificação das fases de leitura aberta existentes no cItz2, de acordo com análises no GeneDb através dos programas Clone Manager e EditSeq (DNASTAR, INC). (A) Proteína hipotética (LmjF.29.2970). (B) Proteína inosina-adenosina-guanosina-nucleosídeo hidrolase (LmjF. 29.2800).

A análise computacional das duas ORFs no Gene Bank, revelou que uma delas codifica para uma proteína hipotética (LmjF.29.2790) denominada ORF A, e a outra para uma inosina-adenosina-guanosina-hidrolase (LmjF.29.2800), denominada ORF B.

A ORF A possui 568 nucleotídeos e codifica para uma proteína hipotética de 192 aminoácidos que possui dois domínios transmembrana localizados entre os resíduos 77-92 e 102-124, sendo que a localização desses domínios é a mesma para outros tripanossomatídeos como *T. cruzi* e *T. brucei*, que também apresentam esse gene. O alinhamento das sequências de LmjF: 29.2790 com o gene ortólogo presente em L. (L.)

braziliensis demonstrou índices de similaridade de 88,5% e foi possível localizar uma assinatura protéica determinada por G-L-W-x-x-C-x-x-x-S-G-x-x-x-x-C característica de uma família de proteínas denominadas proteínas claudinas, presente entre os aminoácidos 51-66, aonde a letra x se refere a qualquer aminoácido, sem risco de alteração da assinatura protéica (Figura 9).

```
L.major    1.      MSGSFALRKLLFDIDDEEDVNRRGYHYAGAYAPLLHSVAVLQPAAVLPKS   50  
          ||| |  
L.brazil.  1.      MSGSFALRKLLFDRGDEEDVNRRGYHYAGAYAPLLHPVAVLHPASVLPKS   50  
  
L.major    51      GLPFAACLCLFSSFSATCLTMKVRNKERWWMGVFAICAVYNGVKAHKVNNG   100  
          ||| |  
L.brazil.  51.     GLWFACLCLFSSFMTCLTMKVRNREKWMMGMFAISVVYNSIAHKVGNG   100  
  
L.major    101     LVGHQSGFFAAGMGAIGCVARLMAKCGSARMNAGCLGLFTALMWYEIGRY   150  
          ||| |  
L.brazil.  101     LLGHQSGFFAAGMTIGCTARLMAKSGSARQNVGGLSLFVALLOWEIGRY   150  
  
L.major    151     HLWAEHVFTEFRRDVTPEERSYDLLGDYVPQSLEVEFLPYRTVT       192  
          ||| |  
l.brazil.  151     HLWAEHVFTEFRRDVTPEORSYDLAGYVPPTYEVFEFLPYRPVL        192
```

A ORF B possui 1001 nucleotídeos e codifica para uma proteína de 333 aminoácidos que está identificada por homologia no genoma de *L. (L.) major* como uma inosina-adenosina-guanosina-hidrolase, possuindo genes ortólogos em outros tripanossomatídeos como *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) infantum*, *T. brucei* e *T. cruzi*. O

Figura 10: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF:29.2800 com o gene ortólogo presente em *L. infantum* sob a identificação de LinJ 29 V3.2860 através do programa Clustal W . Os aminoácidos que definem a assinatura protéica característica da família das proteínas hidrolases estão em cinza.

4.2 Cosmídeo cItz1

4.2.1 Avaliação do DNA do inserto cItz1: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

A análise do padrão de digestão total do DNA do cosmídeo cItz1 foi realizada baseada no método utilizado para a análise do cItz2. Inicialmente foi realizada digestão total com uma série de enzimas como: *Apa I*, *Bgl II*, *Eco RV*, *Hind III*, *Kpn I* ou *Xba I*. A análise do padrão de digestão com essas enzimas indicou que a enzima de restrição *Apa I* foi a que melhor clivou o inserto, apresentando 10 fragmentos de tamanhos entre 6,8 e 0,4 kb aproximadamente (Fig.11).

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo o produto da digestão total do DNA do cosmídeo cItz-1 com diferentes enzimas de restrição. 1- *Apa* I; 2- *Kpn* I; 3- *Eco* RV; 4- *Sma* I e 5- *Xba* I.

PM: Padrão de peso molecular em quilobase representado pelo DNA do fago λ digerido com *Hind* III. Através do processo de digestão parcial, um total de 3 deleções do inserto do cItz1 foram produzidas, recebendo as seguintes denominações: cItz1- Δ *Apa*I-A, cItz1- Δ *Apa*I-B e cItz1- Δ *Apa*I-C.

A partir da análise dos padrões de digestão total com *Apa* I dos insertos dessas 3 deleções após corrida eletroforética, deduzimos um provável mapa de restrição do inserto cItz 1, contendo fragmentos com cerca de 6,8; 5; 4,3; 3,5; 1,8; 1,5; 1,3; 1,1; 0,8 e 0,4 kb, aproximadamente, bem como do inserto cItz1 original de aproximadamente 27 kb conforme mostrado na figura 12.

Figura 12: Mapa de restrição do inserto *cltz1* e das deleções transfectadas (*cItz1-ΔApaI-A*, *cltz1-ΔApaI-B* e *cItz1-ΔApaI-C*) com *Apa I* representados linearmente. A digestão dupla de *cltz1* realizada com *Apa I* e *Eco RV* foi realizada para posterior confirmação do inserto no banco de dados do *Leishmania (L.) major*. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor *cL-HYG*. A, *Apa I*; EV, *Eco RV*. Os sinais à direita (+) e (-) correspondem à capacidade ou não de

Os DNAs das deleções obtidas foram transfectados e analisados funcionalmente em presença de doses crescentes de ITZ/CTZ, após superexpressão gênica induzida por passagens sucessivas em presença de higromicina.

A análise quantitativa desses testes funcionais mostrou que o padrão de resistência apresentado pelas células transfectadas com as deleções não eram considerados significativamente diferentes dos padrões de resistência verificados para as células selvagens.

Comparando estes dados com o mapa genômico proposto na figura 12 é possível supor que o gene relacionado com resistência a ITZ/CTZ esteja contido no fragmento *Apa I* de aproximadamente 6,8 Kb, o único fragmento do inserto original que não está presente em nenhuma das deleções obtidas.

4.2.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto *cltz1* no genoma de *L. (L.) major*.

A estratégia utilizada para a localização do inserto cItz1 no genoma de *L. (L.) major* consistiu em subclonar o fragmento de aproximadamente 4,5 kb obtido a partir da digestão total do inserto do cItz1 com *EcoRV* (Fig.12), que gera extremidades em fundo cego, apropriadas para subclonagem no sítio *SmaI* do vetor pUC π , seguida de seqüenciamento de nucleotídeos e posterior comparação com os dados disponibilizados no banco de dados do genoma de *L. (L.) major* (GenBank).

Obtivemos para cada extremidade do fragmento seqüenciado dois consensos (3' ou Fowrd: 539pb e 5' ou reverse: 309pb) que após análise pelo BLAST, reconheceu duas regiões do cromossomo 26 de *L. (L.) major*, distanciadas por exatos 5.176pb, o que está em perfeito acordo com o fragmento *Eco RV* clonado (Figura 13) . Verificamos ainda que o mapa de restrição previsto anteriormente com base apenas no perfil de digestão total com a enzima *ApaI* estava correto, tanto na localização dos fragmentos em relação às extremidades, quanto à estimativa do tamanho dos mesmos. A partir desses dados, podemos representar o mapa de restrição do inserto do cItz1 de acordo com os dados do banco genômico .

Figura 13. Representação esquemática do alinhamento (DNASTar - Seqman, item 2.5) entre as seqüências determinadas das extremidades do fragmento *Eco RV* de 4,5kb do inserto cItz 1 (ITZ1F#539pb e ITZ1R#302pb) com a região de 50.041 a 60.000pb do contig 6 do cromossomo 26 de *L.(L.) major*, identificada após análise comparativa no GenBank – BLAST.

Na sequência de aminoácidos do inserto cItz1 verificamos a presença de uma ORF localizada no interior do fragmento de 7.508 pb, que contém o provável locus relacionado com a resistência a ITZ (Fig.14).

Figura 14: Mapa de restrição do cosmídeo cItz1 e deleções representadas linearmente. Os números representam a quantidade de pares de bases (pb) Os retângulos laterais representam o DNA do vetor. Seta em vermelho: identificação da fase de leitura aberta existente no cItz1: Proteína hipotética (LmjF.26.2610), de acordo com análises no GeneDb através dos programas Clone Manager e EditSeq (DNASTAR,INC). A, *Apa* I

A análise computacional da ORF no Gene Bank, revelou que a mesma codifica para uma proteína hipotética (LmjF.26.2610) e possui 1.706 nucleotídeos, codificando para uma proteína hipotética de 568 aminoácidos que possui quatro domínios localizados entre os resíduos 2-24, 183-198, 328-343 e 382-398, característicos de uma flavoproteína monooxigenase, com ortólogos presentes em *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) infantum* e *T. brucei*, ressaltando que o ortólogo de *T. brucei* não possui o último domínio desse gene (Figura 15).

L.major	1	MRVVIVGAGLSGLSLAAFLRGLNVDCVVLEQVPFLQANYIAPYTLFANAL	50
L.brazil	1	MRVVIVGAGLSGLSLAAFLRRLNVDCVVLEQAPFLQANYIAPYTLFANAL	50

L.major	51	SCFKAFGMGEGIFTSSGIQPEACFGIQNHKGKWLKTANRNLHLPALGAED	10
L.brazil	51	SCFKAFDLEHIFTSSRMQPEECFGIQGDRGNWLLKISNRNIRLPALGAED	100
L.major	101	VIPLSTAPPANSESIVSQRLSEARKQEMGYVPLRCTLPASYLREALRRYI	150
L.brazil	101	VVPLSTAPPANSESIVSQRLSENKQEMGYVPLRCTLPASYLREALRRHI	150
L.major	151	PEIKFSARVIDLLPHDGVKGGVHAVLEDGSTEWG DDVVVGADGMHSTIRRL	200
L.brazil	151	PEIKFSAQVIDLLPHDGVKGGVHAVLEDGRTEWG DDVVVGADGICSTIRRL	200
L.major	201	LYPSEHVGTSSRSLGMMQVDGFVDCPHCPPHLMQPVECWGTGRTLQTVPL	250
L.brazil	201	LYPGEYVGTSSRTLGMIIHIDGFVDCPHCPPHLVQPVECWGRGRTLQTVPF	25
L.major	251	HRFGENTLAFSATLHSLPQELVDLRHGVD AIEVLQVFQRL LGREYAGFGD	300
L.brazil	251	HRFGENTLAFSATLHSSPRELVDLQQGM DAMEVLQAFRHLLGREYAGFGG	300
L.major	301	RVATLLSQAKLAVPTEVLEVPVMPRWYNNRAVLMGEAAHGS LPSFLNQDA	350
L.brazil	301	EVGTLLSEAKLAVPTEVLEVPVMPRWYNNRAVLI GEAAHGS LPSFLNQDA	350
L.major	351	SLCVEDAALLAVALLDVPLQRDSGF EYAFRQY ETVRRDRVERYIRQSRR A	400
L.brazil	351	SLCVEDAAILAVALLDVPLQRDSGF EYAFRQY ETVRRDRIERYIRQSRR A	400
L.major	401	RKLTAMTNTALRNTLLRLTSPIAVDLAQRWLS SWTYSSQQLAVDPKIKME	450
L.brazil	401	RKLTSMKNATLRNALLRLTSPIVVNLAQRWLS NWTYSSQQLMVDPKTKLE	450
L.major	451	TAFR	454
L.brazil	451	TAFR	454

Figura 15: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF:26.2610 com o gene ortólogo presente em *L.(V.) braziliensis* sob a identificação de através do programa Clustal W . Os aminoácidos que definem a assinatura protéica característica da família das flavoproteínas monooxigenases estão em cinza.

A comparação “in silico” dessa sequências com outras sequências presentes no Genoma de *L.(L.) major* apontaram para a presença da assinatura característica das flavoproteínas nas sequências disponíveis codificadoras para esqualeno monooxigenase -like de *L. (L.) major* identificada como LmjF: 13.1620, na qual os domínios característicos da assinatura das proteínas da família das flavoproteínas estão localizadas entre os resíduos: 37-

59, 209-224, 353-369. Sabendo que a esqualeno-monoxigenase é uma enzima importante para a via de biossíntese do ergosterol, procedemos com o alinhamento da sequência de LmjF: 26.2610 com a sequência LmjF: 13.1620 a fim de verificar a possível identidade existente entre elas. No resultado do alinhamento obtivemos apenas 26,6% de similaridade, apesar das assinaturas identificadas (Figura 16).

```

LmjF:13.1620 362 CFRDAIRLANSLNGIQSLRS-VNQEEMAAIEDKIQAAILNYARYRYTHSC 410

LmjF:26.2610 359 ---LLAVALLDV---PLQRDSGFY-----A 378
      ||:.||..|   |..||:..|:|
LmjF:13.1620 411 CINLLSWALYSVFSSPALRDACFDYFLCGNCVTGPMDLLAGLDPNVGSL 460

LmjF:26.2610 379 FRQYETVRRD-----RVERYIRQSRARKLTAMTNTA-----LRN 413
      |..|..|...   |...|...:..|..||..|   :..
LmjF:13.1620 461 FFHYCCVMLHGVANVMMRTGAYSESGKQLSNLEKLTNVASFFVDWERMKH 510

LmjF:26.2610 414 T--LLRLTSPIAVDLAQ-RWLSSWTYSSQQLAVDPKIKMETAFR 454
      . ||...:..||:..|:..|.|.:.   |||...:....:
LmjF:13.1620 511 AAYLLGKSTQIALPLAKSEFYSMWRF-----VDPTSPLANISKRIKTMV 554

LmjF:26.2610 455 454
LmjF:13.1620 555 YTKQFNGKQRPVGL 569

```

Figura 16: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF:26.2610 com o LmjF: 13.1620, sequência gênica responsável pela codificação de uma esqualeno-monooxigenase-like de *L.(L.) major* através do programa Clustal W . Os aminoácidos que definem a assinatura protéica característica da família das flavoproteínas monooxigenases estão em cinza.

Observando a localização desta fase de leitura aberta no inserto de cItz1(Fig.11), verificamos que nenhuma das deleções transfectadas e testadas continham o fragmento com o provável *loci* íntegro, o que pode explicar a ausência de resistência nos testes funcionais das deleções. Uma abordagem estratégica pode isolar a fase de leitura aberta e subcloná-la para testes posteriores, a fim de confirmar sua relação com o fenótipo de resistência observado na Tabela 1.

4.3 Cosmídeo cItz4

4.3.1 Avaliação do DNA do inserto cItz4: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O cosmídeo cItz4 foi selecionado em presença de altas concentrações de ITZ e os experimentos processados para obtenção de resultados foram os mesmos utilizados até aqui para os outros cosmídeos. Na verdade, todo o procedimento de identificação do *locus* desse cosmídeo foi realizado anteriormente por Cotrim et al (1999). Entretanto, como todo o processo foi realizado antes da disponibilidade do banco genômico de *L. (L.) major*, os dados foram acrescentados nesse trabalho apenas para revisão e eventual atualização.

De acordo com os estudos anteriores, o cosmídeo cItz4 foi digerido parcialmente com a enzima *Apa* I, fornecendo nove deleções denominadas: cItz4- Δ *Apa*I-A, cItz4- Δ *Apa*I-B, cItz4- Δ *Apa*I-C, cItz4- Δ *Apa*I-D, cItz4- Δ *Apa*I-E, cItz4- Δ *Apa*I-F, cItz4- Δ *Apa*I-G, cItz4- Δ *Apa*I-H e cItz4- Δ *Apa*I-I (Figura 17).

Figura 17: Mapa de restrição do inserto cItz4 e das deleções representados linearmente. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. A, *Apa* I. Os sinais à direita (+) e (-) correspondem à capacidade ou não de conferir resistência ao ITZ.

Todas as deleções tiveram seu DNA transfectado em células promastigotas de LmFA1 e foram induzidas à amplificação gênica através de passagens sucessivas em concentrações crescentes de higromicina. Após o processo de amplificação gênica, as células foram submetidas aos testes funcionais, que envolviam incubações em concentrações crescentes de ITZ.

A análise quantitativa desses testes funcionais mostrou que o padrão de resistência apresentado pelas células transfectadas com todas as deleções eram considerados significativamente diferentes dos padrões de resistência verificados para as células selvagens.

A partir do mapa de restrição das deleções obtidas no processo de digestão parcial verificou-se que o locus gênico relacionado com a resistência ao TBF no *clt4* devia estar presente na região que compreende os dois fragmentos das extremidades ligados ao vetor presentes em todas as deleções e no *clt4*.

A partir desse dado, a próxima etapa foi obter fragmentos do *clt4-ΔApaI-H* que pudessem ser subclonados, a fim de testá-los quanto à capacidade de conferir resistência ao ITZ.

Os fragmentos necessários foram obtidos a partir de digestão dupla com as enzimas *ApaI* e *Hind III* que geraram dois fragmentos: um de 3,0 kb e outro de 8,0 kb aproximadamente. Esses fragmentos foram subclonados no vetor pSNBR e analisados funcionalmente. A análise dos testes funcionais indicaram que o locus gênico responsável ou relacionado com o fenótipo de resistência a drogas estava localizado na região de aproximadamente 3,0 kb isolada pela a partir de *clt4-ΔApaI-H* por digestão dupla com *ApaI-Hind III*.

4.3.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cItz4 no genoma de *L. (L.) major*.

Determinada a provável região do inserto original relacionada com o fenótipo observado, a próxima etapa foi o sequenciamento dos nucleotídeos do loci relacionado com a expressão do fenótipo. O sequenciamento foi feito através de primers dirigidos às extremidades do vetor cLHYG pelo método do didesoxinucleotídeo (Sanger et al, 1980). Os resultados obtidos e descritos por Cotrim et al.(1990) confirmaram a presença do gene da Esqualeno-Sintetase utilizando primers do próprio gene.

Neste trabalho, analisamos o locus gênico proposto por Cotrim et al. (1990) para o inserto do cItz4 “in silico”, já que na época de sua publicação ainda não estava disponível o banco de dados do Genoma de *Leishmania (L.) major*.

A análise computacional atual pelo banco de dados confirmou a presença do inserto cItz4 no interior do cromossomo 31 de *L. (L.) major* cepa Friedlin A1 podendo verificar mais uma vez que o padrão de digestão estimado anteriormente no mapa da figura 17, foi confirmado no genoma, certificando o nosso processo de mapeamento. As determinações ‘in silico’ do *locus* correspondente à região do inserto cItz4 relacionado com a resistência ao ITZ mostram uma região de 1.245 pb pares de base que codifica uma fase de leitura aberta de 414 aminoácidos, anotada como LmjF31.2940, entre as posições 1384868 a 1386112 (sequência complementar) do cromossomo 31 de *L. (L.) major*. Pelos dados preditos, trata-se (como previmos anteriormente por comparação pelo BLAST), de uma farnesiltransferase, com

domínios e assinatura características da superfamília das terpenóides sintases, a qual pertence a proteína Esqualeno Sintase (EqS) de *Leishmania (L.) major*.

O alinhamento da fase de leitura aberta LmjF: 31.2940 identificada no inserto presente no cItz4, com a fase leitura aberta responsável pela codificação da proteína Esqualeno Sintetase (EqS) em *Leishmania (V.) braziliensis*, sob a identificação LbrM31_V2.3310, permitiu a localização dos domínios característicos entre os resíduos 164-179 e 200-227 (Figura 18).

L.major	1	MGFFSDSVAMMRVKWQMRSVKIQVPPEETDLRFCYDIMNDVSRFAVVVA	50
		. . : : . : : .	
L.brazil.	1	MGLLSDSLAMMRVKWQMRSVKLVPPPEADLRFCYEVMDVSRFAAVVA	50
L.major	51	QLADQQLRDAICIFYLVLRALDTLEDDMSVPVDVKLKLKPKFHTHTSDMS	100
		: : . . . :	
L.brazil.	51	QLADQQLRDAICIFYLVLRALDTLEDDMSVPVNVKLKEMPKFHTRMSDTN	100
L.major	101	WCMSGVGEGRERELLAKYPCVSREFKKLKEYQDVIANICERMANGMCEF	150
		. : . : : :	
L.brazil.	101	WSMTGVGEGRERELLEKYPCVAREFKKLKEYQDVIANICERVANGMCEF	150
L.major	151	LKRPPVTKDDYNQYCHYVAGLVGHGLTQLFARCGFEDPSLDDLTSSNHM	200
		: : :	
L.brazil.	151	LQRPVVTLDYDNLVCHYVAGLVGHGLTHLFARCGFEDSHLDEDLTNSNHM	200
L.major	201	GLFLQKTNIIRDYYEDIREPPRMFWPKEIWGTYYTELKELKSESNNAAA	250
		. : : . . : . :	
L.brazil.	201	GLFLQKTNIIRDYYEDICDEPPRMFWPKDIWSLYATELKDLEKESNSAAA	250
L.major	251	VQCLNAMVADALVHPYIVDYLSALRDPSVFRFCAIPQVMAIATLKEVYN	300
		: . :	
L.brazil.	251	VQCLNAMVADALVHPYVVDYLSLQDPSVFRFCAIPQVMAIATLKEVYN	300
L.major	301	NPDTFQVKVKSVPESCRIMLKATTLYSSLSMFRDYCVELQEKLDMDQDAS	350
		. : . .	
L.brazil.	301	NPDTFHVVKVKSVPESCRIMLKTTTLYSSLSLFRDYCVELQETLDMDDPS	350
L.major	351	SVSIANSLAAAIERIDLQKKCQDVSYTRSLARYPGLGGQFLLTVMDTV	400
		. : :	
L.brazil.	351	STSIANSLAAAIERIDMELKKCQDVSYTRSLARYPGLGGQFVLTVMMDTV	400
L.major	401	AGFFGGRKEIAGHA	414
		: : .	
L.brazil.	401	SGFFGGRREIVGHA	414

Figura 18: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF:31.2940 com LbrM31_V2.3310, sequência gênica responsável pela codificação de uma esqualeno-sintase de *L.(V.) braziliensis* através do programa Clustal W . Os aminoácidos que definem a assinatura protéica característica da família das terpenóides sintases estão em cinza.

4.4 Cosmídeo cTbf1

4.4.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf1: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O DNA do cosmídeo cTbf1 foi inicialmente digerido em condições totais com a enzima *Apa* I, que foi capaz de gerar 6 fragmentos do inserto cTbf1 (reconhecendo portanto 5 sítios no interior desse inserto). Dessa forma, a enzima *Apa* I foi utilizada para a obtenção de deleções do inserto cTbf1 por digestão parcial.

Na primeira etapa de obtenção de deleções do inserto, foram produzidas 3 deleções através da digestão parcial com a enzima *Apa* I, a partir das quais, desenhamos um provável mapa de restrição (Figura 19).

Figura 19. Mapa de restrição de cTbf1 e das 3 deleções originadas a partir da digestão parcial com *Apa* I (A), representados linearmente. Os números representam os tamanhos aproximados em kb de cada fragmento encontrado. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. A letra (H) representa os sítios para a enzima *Hind* III.

Para os testes funcionais, o DNA de cada uma das deleções obtidas, denominadas: cTbf1-Δ*Apa*I-A, cTbf1-Δ*Apa*I-B e cTbf1-Δ*Apa*I-C; foi separadamente transfectado em

células promastigotas de LmFA1, assim como o DNA do cosmídeo original cTbfl. Após indução e amplificação do número de cópias do DNA transfectado, as células foram submetidas a culturas contendo concentrações crescentes de TBF.

Os resultados dos testes funcionais das células transfectadas em presença de TBF mostraram que apenas duas das três deleções geradas foram capazes de conferir resistência ao TBF (rTBF). A tabela 3 mostra a síntese desses resultados com os cálculos estatísticos da razão de resistência (RR) ao TBF conferida após a transfecção dos DNAs indicados.

Tabela 3. Razão de Resistência (RR) das células transfectadas com os DNAs dos cosmídeos cTbfl- Δ ApaI-A, cTbfl- Δ ApaI-B e cTbfl- Δ ApaI-C e células LmFA1 em presença de concentrações crescentes de TBF.

Linhagem celular	TBF		(n)	(p)
	IC ₅₀ (μg/mL)	RR		
Lm FA1	1,1 ± 0,03	1	5	ns
cTbfl	1,27 ± 0,08	1,2	5	< 0,001
cTbfl- Δ ApaI-A	1,28 ± 0,06	1,2	5	< 0,001
cTbfl- Δ ApaI-B	1,29 ± 0,08	1,2	4	< 0,001
cTbfl- Δ ApaI-C	1,14 ± 0,05	1,0	4	ns

- A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (**n**) de experimentos independentes está representado para cada linhagem testada.
 - A razão de resistência foi definida pela média ± o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com os cosmídeos, pelo valor de IC₅₀ das células selvagens medido em cada experimento.
 - Valores significativamente diferentes do valor do tipo selvagem (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student.
- ns** – não significativa (**p** > 0,05)

A análise quantitativa dos testes funcionais mostrou que o padrão de resistência apresentado pelas células transfectadas com os DNAs do cTbfl original e das deleções

cTbfl- Δ ApaI-A e cTbfl- Δ ApaI-B também poderiam ser considerados significativamente diferentes dos padrões de resistência verificados para as células selvagens (tabela 3).

Pelos dados expostos na tabela 3, verificamos que o DNA da deleção cTbfl- Δ ApaI-C não foi capaz de conferir rTBF após transfecção. Ao contrário do que foi apresentado para os outros cosmídeos, onde os testes funcionais com as células transfectadas com os DNAs das deleções permitiram a localização de uma região relacionada com o fenótipo analisado, aqui notamos que o DNA do inserto da deleção cTbfl- Δ ApaI-A (que confere rTBF após transfecção) está inteiramente contido no inserto cTbfl- Δ ApaI-C, o que não explica a incapacidade deste inserto não conferir rTBF.

De qualquer forma, podemos notar na tabela 3 que os valores de RR são significativamente diferentes aos do tipo selvagem não transfectado (LmFA1), apesar de serem inferiores aos encontrados nos testes preliminares representados na tabela 1 da introdução (1,9 contra 1,27 para o DNA do inserto cTbfl 1). Mesmo assim, partimos para a determinação da sequência de nucleotídeos do inserto, a fim de identificarmos a presença de prováveis ORFs que codificassem proteínas que pudessem estar relacionadas com o fenótipo de resistência apresentada pelo cosmídeo cTbfl.

4.4.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbfl no genoma de *L. (L.) major*.

Paralelamente aos testes funcionais, uma região de aproximadamente 2 kb e outra de aproximadamente 3,5 kb pertencentes ao inserto cTbfl- Δ ApaI-A, foram purificadas e subclonadas no vetor pUC- π , a fim de procedermos com a determinação da sequência nucleotídica para localização do inserto no banco de dados do Genoma de *L. (L.) major*.

Os consensos finais obtidos com as várias reações de seqüenciamento realizadas permitiu chegarmos a um total de 647 nucleotídeos na extremidade 3' e 730 nucleotídeos na extremidade 5' do fragmento de 2-kb e 810 nucleotídeos seqüenciados na extremidade 5' da região de 3,5 kb.

O consenso das seqüências de nucleotídeos das extremidades dos fragmentos analisados mostrou similaridade com o cromossomo 20 de *L.(L.) major* da cepa Friedlin A1 (LmFA1), após análise computacional no banco de dados do GeneDB com auxílio do programa de busca omni-BLAST.

Após identificação e isolamento da região de similaridade entre o cromossomo 20 e os três fragmentos das extremidades dos insertos seqüenciados, comparamos o padrão de digestão de várias enzimas de restrição obtido durante o mapeamento de DNA do cosmídeo cTbfl. Verificamos também que o tamanho da região isolada entre as seqüências obtidas com o seqüenciamento das extremidades do fragmento do cosmídeo cTbfl, confere com o padrão de digestão *Apa* I encontrado e no mapa anterior deduzido para o cTbfl (Fig. 19). A partir desses dados, podemos representar o mapa genômico preciso do inserto do cTbfl de acordo com os dados encontrados no banco genômico (Fig. 20).

Figura 20: Mapa de restrição do cosmídeo cTbfl representado linearmente. Os números representam a quantidade de pares de bases (pb). As setas em cinza representam as fases de leitura aberta identificadas: A, LmjF:20.0530; B, LmjF: 20.0540 e C, LmjF: 20.0640. Os retângulos laterais representam o DNA do vetor cL-HYG. A, *Apa* I, H. *Hind* III.

A partir dos resultados obtidos pela estratégia de seqüenciamento, buscamos fases de leitura abertas que pudessem codificar proteínas que possivelmente estivessem relacionadas

com a resistência ao TBF e localizamos três hipotéticas proteínas identificadas no genoma de *L.(L.) major* e anotadas como: LmjF20.0530, LmjF20.0540 e 20.0640.

A proteína anotada como LmjF20.0530 é uma proteína hipotética conservada, de 223 aminoácidos; que apresenta genes ortólogos em *L.(V.) infantum*, *T.brucei*, *T.cruzi*, sem domínios que possibilitem inferir a sua função por homologia definidos.

A proteína anotada como LmjF20.0540 também está descrita como uma proteína hipotética conservada e contém 142 aminoácidos, com genes ortólogos presentes em *L.(V.) infantum*, *T.brucei*, *T.cruzi*. Apesar de não apresentar uma função conhecida segunda as predições têm no seu interior um domínio RWD, de função desconhecida presente em algumas proteínas helicases.

Já a proteína anotada como LmjF20.0640 contendo 1062 aminoácidos, tem uma função inferida por homologia como uma provável kinesina. A função foi inferida devido à presença de uma assinatura protéica própria da família das kinesinas, proteínas associadas aos microtúbulos, possuindo, em sua maioria, função motora.

Até esse ponto, as análises realizadas com o DNA desse cosmídeo não permitiram identificar precisamente qual fase de leitura que está realmente envolvida com o fenótipo de resistência a TBF. Será necessária a realização de análises adicionais envolvendo nova obtenção de deleções e novos testes funcionais para chegarmos a uma conclusão.

4.5. Cosmídeo cTbf2

4.5.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf2: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O DNA do cosmídeo cTbf2 original apresenta um inserto de *L. (L.) major* com cerca de 34,5 kb e foi selecionado em presença de altas concentrações de TBF após experimentos de superexpressão induzida com Higromicina (Cotrim e cols., 1999). De acordo com a tabela 1 da introdução, as primeiras análises funcionais com este inserto em presença de TBF e CTZ-ITZ revelaram que além de conferir níveis de resistência ao TBF (rTBF) da ordem de 1,8 vezes, a transfecção desse DNA em células LmFA1 também era capaz de desenvolver hipersensibilidade ao CTZ-ITZ (cerca de 0,3 vez). Portanto, o DNA deste inserto deve conter um *locus* relacionado com a resistência a TBF e provavelmente outro *locus* relacionado com a hipersensibilidade ao CTZ-ITZ.

Nas análises de mapeamento, realizadas previamente no nosso laboratório, foram obtidos um total de 4 deleções do inserto cTbf2 após digestão parcial com a enzima *Apa* I, denominadas: cTbf2- Δ *Apa*I-A, cTbf2- Δ *Apa*I-B, cTbf2- Δ *Apa*I-C e cTbf2- Δ *Apa*I-D, e a partir dessas deleções foi possível sugerir um provável mapa genômico do inserto (Fig. 21).

Figura 21. Mapa de restrição do inserto cTbf2 e das deleções obtidas após digestão parcial com *Apa* I representados linearmente. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. A, *Apa* I; H, *Hind* III.

O DNA de cada uma das deleções obtidas foi separadamente transfectado em células promastigotas de LmFA1 e as células induzidas a amplificar o número de cópias de seu DNA para a posterior realização dos testes funcionais em presença de TBF em concentrações crescentes.

A análise dos testes funcionais mostraram que as células transfectadas com o DNA do cosmídeo cTbf2 e com o DNA das deleções obtidas submetidas aos testes com o TBF, após amplificação gênica, apresentaram valores de razão de resistência (RR) também diferentes dos apresentados na tabela 1 da introdução, no entanto, todos fenótipos positivos quanto à resistência a TBF.

Verificamos que o DNA da menor deleção obtida cTbf2- Δ ApaI-B conferia uma RR de $1,45 \pm 0,27$ (n=3), um pouco maior que a verificada com o DNA do cosmídeo original (cTbf2) $1,17 \pm 0,07$ (n=3), mas ainda menor que a RR verificada na tabela 1 (considerada 1,8; $\pm 0,6$ vezes mais resistente), e que de todas as deleções, essa era a menor, o que facilitaria o processo de subclonagem seguinte (Tabela 4).

Tabela 4. Resistência das células transfectadas com os DNAs dos cosmídeos cTbf2, cTbf2- Δ ApaI-B e células LmFA1 em presença de concentrações crescentes de TBF.

Linhagem celular	TBF			
	IC ₅₀ (µg/mL)	RR	(n)	(p)
LmFA1	10,1 $\pm$ 1,20	1	10	ns
cTbf2	11,7 $\pm$ 0,07	1,17	5	< 0,001
cTbf2- Δ ApaI-B	14,5 $\pm$ 1,27	1,45	6	<0,001

- A média $\pm$ o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (**n**) de experimentos independentes está representado para cada linhagem testada
- A razão de resistência foi definida pela média $\pm$ o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com os cosmídeos, pelo valor de IC₅₀ das células selvagens medido em cada experimento
- Valores significantemente diferentes do valor do tipo selvagem (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student. **ns** – não significante (**p** > 0,05)

A fim de determinarmos a provável região codificadora relacionada com a rTBF, o DNA do inserto cTbf2- Δ ApaI-B (com cerca de 8kb), foi digerido com uma série de enzimas de restrição na tentativa de obter novos fragmentos do inserto. A digestão total com a enzima *Hind* III foi novamente a mais adequada, originando um fragmento de 7kb (que foi purificado e subclonado em pSNBR, originando a construção cTbf2- Δ ApaI-Ba, e um outro fragmento de 1kb que permaneceu ligado a uma das extremidades do vetor cL-HYG, denominado de cTbf2- Δ ApaI-Bb (Figura 22).

Figura 22. Mapa de restrição do inserto cTbf2- Δ ApaI-B e das novas construções obtidas após digestão total com *Hind* III e subclonagem em vetor pSNBR representados linearmente. Os retângulos laterais representam o DNA do vetor. A, *Apa* I; H, *Hind* III.

Os DNAs das duas novas construções (cTbf2- Δ ApaI-Ba e cTbf2- Δ ApaI-Bb) foram transfectados em LmFA1, e após amplificação gênica, as células foram submetidas aos testes funcionais com TBF. A análise das curvas de inibição obtidas revelou que os testes funcionais em presença de TBF indicaram a perda do fenótipo, ou seja, perderam a característica de resistência. Esse resultado aponta para a possibilidade de fragmentação do gene pela presença de um provável sítio interno para a enzima *Hind* III. Estes dados indicam ainda, que o gene/*locus* relacionado com a rTBF pode estar contidos no fragmento de cerca de 5,3 kb ligado à extremidade direita do vetor cLHYG. Como já salientado, grande parte dos experimentos com o cTbf2 foram concluídos numa época em que os dados do

seqüenciamento do genoma de LmFA1 não estava disponível, o que dificultava uma conclusão mais objetiva.

4.5.2 Determinação da seqüência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf2 no genoma de *L. (L.) major*.

Iniciamos a determinação da seqüência de nucleotídeos dos insertos, utilizando iniciadores dirigidos às extremidades dos DNAs dos vetores cLHYG e pSNBR, a fim de obtermos um consenso para cada uma das regiões seqüenciadas dos insertos cTbf2- Δ ApaI-Ba (com cerca de 7kb) e cTbf2- Δ ApaI-Bb (com cerca de 1kb).

A análise comparativa desses dados com os dados atualmente disponibilizados pelo projeto genômico de *L. (L.) major* permite concluir que os consensos obtidos (467pb para cTbf2- Δ ApaI-Ba 3'; 310pb para cTbf2- Δ ApaI-Ba 5' e 296pb e 550pb cTbf2- Δ ApaI-Bb 3' e cTbf2- Δ ApaI-Bb 5') mostram grande similaridade com o cromossomo 27 de *L. (L.) major*. A partir dos resultados obtidos pela estratégia de seqüenciamento, buscamos fases de leitura abertas que pudessem codificar proteínas que possivelmente estivessem relacionadas com a resistência ao TBF e presentes no cosmídeo que demonstrou maior índice de resistência nos testes funcionais. Assim, localizamos uma fase de leitura aberta que codificava para uma proteína hipotética identificada no genoma de *L. (L.) major* como LmjF27.1170, que possui certa similaridade com uma proteína hipotética conservada, sem domínios transmembrana e possui genes ortólogos em outros tripanossomatídeos como *L. (V.) braziliensis*, *L. infantum*, *T. cruzi* e *T. brucei*. O alinhamento de LmjF27.1170 com os genes ortólogos presentes em *L. (V.) braziliensis* (LbrM27_V2.1270) (Fig. 23), e de *L. infantum* (LinJ27_V3.1050) apresentaram, respectivamente, uma similaridade de 87,4% e 91,5%. Já o alinhamento de LmjF27.1170 com os ortólogos de *T. cruzi* (Tc00.1047053506369.50) e de *T. brucei*

(Tb11.55.0003), apresentaram, respectivamente, uma similaridade menor de 54,8% e 59,3%, como era de se esperar.

L. major	1	MSGAGRKHRAKHLTQQYLDASGWVGPKEGERLAICMESPHGQHVRVLLLV	50
L.brazil	1	MSGAGRKHRAKHLTQQYLDTSGWVGPKEGEALAICLEAPHGQHVRVLLLA	50
L. major	51	HPNSAPASSSTEAPAPDGSSSSDAPHGAKESEAGVSASPPSAAPLLEVEQ	100
L.brazil	51	HSSSAAAHFPSEASVPHGSSSHDAPHGAKESEANVSAS-PSTAPFHEVEK	99
L. major	101	VVHLPRKFHKVIWLSIKDVVVIADGTVSFKPSPEQVESFLKDPRNKGWRE	150
L.brazil	100	VVHLPRKFHKVIWLSIKDVVVIADGAVSFKPSPEQVENFLKDPRNEGWARE	149
L. major	151	RVATAQHRAEDQRAALQRMPhYAATAQTTSVLTGPQVRSGVRATANGTS	200
L.brazil	150	RVVVAQHRAENQRVALQRMPhYSATARTTTSVLTHPQVRSGVRMAADGAS	199
L. major	201	EQDSEGSEGEADMRNPNNWRNIKHQQHFFYGLGDDSD-EIEEEEDA	245
L.brazil	200	EQDGESEGEADGVYNNPNWRNIKHQQHFFYGLGDDSDDEEVEEEEDS	244

Figura 23: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF27.1190 com o gene ortólogo presente em *L.(V.) braziliensis* sob a identificação de (LbrM27_V2.1270) através do programa Clustal W .

A análise dos sítios de restrição presentes fase de leitura aberta indicou a presença de um sítio interno para a proteína *Hind* III. A presença desse sítio confirma a perda do fenótipo de resistência da deleção cTbf2- Δ Apal-B quando digerida com a enzima *Hind* III para subclonagem dos fragmentos resultantes em pSNBR, a fim de gerar novas deleções identificadas como cTbf2- Δ Apal-Ba e cTbf2- Δ Apal-Bb (Figura 24).

Figura 24. Mapa de restrição do inserto cTbf2-ΔApaI-B e das novas construções obtidas após digestão total com *Hind* III e subclonagem em vetor pSNBR representados linearmente. A seta representa a fase de leitura aberta identificada como LmjF: 27.1170. Os retângulos laterais representam o DNA do vetor. A, *Apa* I; H, *Hind* III.

Dessa forma, a localização do sítio *Hind* III presente na proteína LmjF27.1170 é um indicativo de que, apesar de não estar diretamente envolvida com a via de biossíntese de ergosterol e não ter ainda função inferida, nem mesmo por homologia, possa ser a provável proteína responsável pelo fenótipo de resistência exibido pelo cosmídeo cTbf2 quando transfectado e superexpresso em células selvagens de *Leishmania (L.) major*.

4.6 Cosmídeo cTbf3

4.6.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf3: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O cosmídeo cTbf3 original apresenta inserto de aproximadamente 38,5 kb. Esse cosmídeo foi selecionado em presença de altas concentrações de TBF, após experimentos de superexpressão induzida com higromicina. A partir de digestões parciais com a enzima *Apa* I, foram produzidas 9 deleções deste inserto, que correspondem respectivamente às deleções: cTbf3- Δ *Apa*I-A, cTbf3- Δ *Apa*I-B, cTbf3- Δ *Apa*I-C, cTbf3- Δ *Apa*I-D, cTbf3- Δ *Apa*I-E, cTbf3- Δ *Apa*I-F, cTbf3- Δ *Apa*I-G, cTbf3- Δ *Apa*I-H, cTbf3- Δ *Apa*I-I. Com base no padrão de digestão das deleções obtidas foi possível sugerir um provável mapa de restrição do inserto que está representado na figura 25.

Figura 25: Provável mapa de restrição do inserto cTbf3 e das deleções obtidas após digestão parcial com *Apa* I representados linearmente. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. A, *Apa* I.

O DNA de cada deleção foi separadamente transfectado em células LmFA1 e induzidas a amplificar o seu número de cópias através de passagens em concentrações crescentes em higromicina. Após a amplificação gênica, a análise do fenótipo foi realizada através de curvas de inibição de crescimento em presença de concentrações crescentes de TBF. Em seguida, determinou-se a concentração de células através de contagem em um contador automático. A análise dos testes funcionais demonstrou que todas as deleções foram capazes de conferir fenótipo de resistência quando comparadas às células selvagens, inclusive a deleção cTbf3- Δ *ApaI*-C que contava apenas com as extremidades do inserto ligadas ao vetor, comumente utilizadas como controle.

Para determinar a extensão da região responsável pela resistência a TBF, a qual parece estar contida nos fragmentos ligados às extremidades do vetor, a partir do cosmídeo cTbf3- Δ *ApaI*-C foram realizadas digestões duplas com *ApaI*-*SpeI* e *ApaI*-*Hind* III.

O padrão das digestões duplas realizadas permitiu estimar em cerca de 10 kb o tamanho dos fragmentos de DNA ligados ao vetor originados após digestão total do cosmídeo cTbf3- Δ *ApaI*-C com a enzima *Apa* I. Observamos que o fragmento localizado à esquerda do sítio *Apa* I apresenta 1,7 kb, enquanto o fragmento ligado à outra extremidade do vetor apresenta cerca de 8,3 kb. Determinado o tamanho da região relacionada com a resistência a TBF, o cosmídeo cTbf3- Δ *ApaI*-C foi digerido com várias outras enzimas de restrição para a obtenção de novos fragmentos deste inserto. A enzima que se mostrou mais apropriada para cumprir esse objetivo foi *Hind* III. Esta enzima liberou do inserto cTbf3- Δ *ApaI*-C um fragmento de DNA de 4,0 kb, restando 6,0 kb ligado a outra extremidade do vetor. Este fragmento foi posteriormente purificado do gel de agarose e clonado no vetor pSNBR. O

restante do inserto permaneceu ligado ao vetor cLHYG, conforme está demonstrado na figura 26.

Figura 26: Representação esquemática das novas deleções obtidas a partir do cosmídeo cTbf3-ΔApaI-C. Os quadrados laterais em cinza representam o DNA do vetor CLHYG e os quadrados laterais pontilhados representam o vetor pSNBR. A, *Apa* I; H, *Hind* III.

O DNA de cada uma dessas novas deleções obtidas foi transfectado em células promastigotas de LmA1 e as células foram induzidas a amplificar o número de cópias do DNA do cosmídeo transfectado através de passagens sucessivas em concentrações crescentes de neomicina e higromicina (de acordo com o vetor utilizado, neomicina para pSNBR e higromicina para cLHYG, respectivamente). Após a amplificação gênica, a análise do fenótipo foi realizada através de curvas de inibição do crescimento em presença de concentrações crescentes de TBF. Ambas as deleções apresentaram fenótipo negativo, ou seja, perderam a capacidade de resistência ao TBF, e isso pode ter sido gerado pela interrupção do gene de interesse através da digestão com a enzima *Hind* III (Tabela 5).

Tabela 5. Resistência das células transfectadas com os DNAs dos cosmídeos cTbf3, cTbf3- Δ ApaI-C, subdeleções cTbf3- Δ ApaI-Ca e cTbf3- Δ ApaI- e da célula selvagem em presença de TBF.

Linhagem celular	TBF	(n)	(p)
Razão de resistência (RR)			
Lm A1	1	5	ns
cTbf-3	1,3 $\pm$ 0,1	5	< 0,001
cTbf3- Δ ApaI-C	1,4 $\pm$ 0,01	5	<0,001
cTbf3- Δ ApaI-Ca	1,1 $\pm$ 0,01	3	ns
cTbf3- Δ ApaI-Cb	1,11 $\pm$ 0,02	3	ns

A razão de resistência foi definida pela média $\pm$ o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de IC₅₀ das células transfectadas com os cosmídeos, pelo valor de IC₅₀ das células selvagens medido em cada experimento. Valores significantemente diferentes do valor do tipo selvagem (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste t de Student. ns – não significante (p>0,05)

4.6.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf3 no genoma de *L. (L.) major*.

Baseados nesse resultado pudemos concluir que o gene provavelmente estaria localizado no interior do fragmento que possuía um sítio de restrição para a enzima *Hind* III.

A fim de nos certificarmos acerca desta afirmativa, procedemos com o sequenciamento das extremidades do inserto cTbf3- Δ ApaI-Ca e cTbf3- Δ ApaI-Cb com iniciadores dirigidos às extremidades do vetor pSNBR.

A análise ‘in silico’ no banco de dados GeneDB utilizando o sistema de busca omni-BLAST do consenso das seqüências de nucleotídeos das extremidades do inserto dos cosmídeos cTbf3- Δ ApaI-Ca cTbf3- Δ ApaI-Cb, mostrou similaridade com o cromossomo 10 de *Leishmania (L.) major* cepa Friedlin A1. Analisamos essa região a fim de encontrarmos fases de leitura abertas que codificassem para proteínas que pudessem estar envolvidas com o fenótipo de resistência apresentado nos testes de resistência iniciais e encontramos uma fase de leitura aberta identificada no genoma como LmjF10.0218, localizada entre a posição 95.388 e a posição 97.526 do cromossomo 10 de *Leishmania (L.) major*, com extensão de 2.139 pb, que codifica uma proteína hipotética conservada de 712 aminoácidos, que possui genes ortólogos em *L.(V).braziliensis* e em *L.(L) infantum*. . Não estão descritos domínios característicos que permitam inferir função por homologia; no entanto, encontramos um sítio de restrição para a enzima *Hind* III no seu interior e os sítios para as enzimas *Kpn*I e *Sma*I em localizações próximas, que forneceu informações para os processos de subclonagem (Figura 26).

Figura 26: Mapa de restrição do cTbf3, com a representação da deleção cTbf3- Δ ApaI-C e das subdeleções cTbf3- Δ ApaI-Ca cTbf3- Δ ApaI-Cb. Os retângulos em cinza representam o vetor cLHYG, os pontilhados representam o vetor pSNBR.S, SmaI; K, Kpn I, H, Hind III, A, Apa I.

Análises em busca de seqüências conhecidas como assinaturas protéicas e domínios característicos de superfamílias protéicas foram realizados, mas não encontramos nenhuma seqüência capaz de indicar qual a provável função desta proteína relacionada com a resistência a TBF (outubro-2008). Análises posteriores são necessárias a fim de afirmarmos qual a sua participação no fenótipo encontrado.

4.7 Cosmídeo cTbf4

4.7.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf4: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O cosmídeo cTbf4 original apresenta um inserto de aproximadamente 36 kb e foi selecionado em presença de altas concentrações de TBF e os experimentos processados para obtenção de resultados foram os mesmos utilizados até aqui para os outros cosmídeos. Na verdade, todo o procedimento de identificação do *locus* desse cosmídeo (descrito abaixo), já foi realizado anteriormente no laboratório. Entretanto, como todo o processo foi realizado antes da disponibilidade do banco genômico de *L. (L.) major*, os dados foram acrescentados nesse trabalho apenas para revisão e eventual atualização.

De acordo com os estudos anteriores, o cosmídeo cTbf4 foi digerido parcialmente com a enzima *Apa* I, fornecendo seis deleções denominadas: cTbf4- Δ *Apa*I-A, cTbf4- Δ *Apa*I-B, cTbf4- Δ *Apa*I-C, cTbf4- Δ *Apa*I-D, cTbf4- Δ *Apa*I-E e cTbf4- Δ *Apa*I-F. Todas as deleções tiveram seu DNA transfectado em células promastigotas de LmFA1 e foram induzidas à amplificação gênica através de passagens sucessivas em concentrações crescentes de higromicina. Após o processo de amplificação gênica, as células foram submetidas aos testes funcionais, que envolviam incubações em concentrações crescentes de TBF.

De acordo com a análise dos resultados dos testes funcionais, foi possível verificar que as células transfectadas com o cTbf4- Δ *Apa*I-E exibiram índices de resistência superiores quando comparados com as células transfectadas com o cTbf4, que contém o inserto original.

A partir do mapa de restrição das deleções obtidas no processo de digestão parcial (dados não mostrados), verificou-se que o locus gênico relacionado com a resistência ao TBF no cTbf4 devia estar presente na região que compreende os dois fragmentos *Apa* I de 0,65 e de 6,08 kb presentes apenas no DNA das deleções cTbf4- Δ *Apa*I-E e no inserto original cTbf4.

A partir desse dado, a próxima etapa foi obter fragmentos do cTbf4- Δ *Apa*I-E que pudessem ser subclonados, a fim de testá-los quanto à capacidade de conferir resistência ao TBF. Os fragmentos necessários foram obtidos a partir da digestão com a enzima *Bst*E, que gerou três fragmentos a partir da deleção cTbf4- Δ *Apa*I-E. Esses fragmentos gerados foram subclonados no vetor pSNBR e analisados funcionalmente. A análise dos testes funcionais indicaram que o locus gênico responsável ou relacionado com o fenótipo de resistência a drogas estava localizado em uma região de aproximadamente 2,3 kb, constante na construção nomeada como cTbf4- Δ *Apa*I-Eb (Fig. 27).

Figura 27: Mapa de restrição de cTbf4, suas deleções obtidas após digestão parcial com *Apa* I e subdeleções obtidas a partir da deleção cTbf4 Δ *Apa*I-E. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG e os retângulos pontilhados representam o DNA do vetor pSNBR. A, *Apa* I; H, *Hind* III; B, *Bst*E.

4.7.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf4 no genoma de *L. (L.) major*.

Determinada a provável região do inserto original relacionada com o fenótipo observado, a próxima etapa foi o seqüenciamento dos nucleotídeos do loci relacionado com a expressão do fenótipo. Após análise computacional no banco de dados do Gene Bank, o consenso gerado pelas seqüências de nucleotídeos das extremidades do inserto do cosmídeo cTbf4 (contendo 523 pb na extremidade 3' e 417 na extremidade 5') mostrou, na época, grande similaridade com cromossomo 13 de *L. (L.) major* cepa Friedlin A1.

A análise atual pelo banco de dados confirmou a presença do inserto cTbf4 no interior do cromossomo 13 de *L. (L.) major*, podendo verificar mais uma vez que o padrão de digestão estimado anteriormente no mapa da figura 23, foi confirmado no genoma, certificando o nosso processo de mapeamento. As determinações 'in silico' do *locus* correspondente à região do inserto cTbf4 relacionado com a resistência ao TBF mostram uma região de 1.710 pares de base que codifica uma fase de leitura aberta de 569 aminoácidos, anotada como LmjF13.1620, entre as posições 611.155 e 612.864 do cromossomo 13 de *L. (L.) major*. Pelos dados preditos, trata-se (como previmos anteriormente por comparação pelo BLAST), de uma Esqualeno Mono-oxigenase-like (EqMO), ou da Esqualeno Epoxidase, exatamente a enzima alvo da Terbinafina.

A análise 'in silico' atual ainda permitiu a identificação dos três domínios característicos das proteínas monooxigenases, que estão presentes nas flavoproteínas monooxigenases, família de proteínas da qual faz parte a proteína provavelmente envolvida no fenótipo de resistência a TBF também exibido pelo cosmídeo cItz1 (descrito nessa

dissertação). O alinhamento da sequência de LmjF13.1620 com o ortólogo de *L. (V.) braziliensis* anotado como LbrM13_V2.1480, apresentou uma alta identidade (92,3%), permitindo a localização dos domínios característicos das monooxigenases, localizados entre os resíduos 37-59, 209-224 e 353-369 (Fig. 28).

L.major	1	MLYFFAAVLCAVSTLLLLLNRTLRLSPARTSYDYDVIIVGGSIAGPVL	50
L.brazil.	1	MLYFFATVLCAGFTLLLLLNRTLRLVSPARTSYDYDVIIVGGSIAGPVM	50
L.major	51	AKALSDQGRKVLMMVERTLFTKPDRIVGELLQPGGLNALKEVGMKECAETI	100
L.brazil	51	AKVLSAQGRKVLMMVERTLFTKPDRIVGELLQPGGLNALKEVGMKECAESI	100
L.major	101	GMPCHGYVVVDHKGKQVDLPYRKASGVSFHFGDFVQSLRSHVFNCKAN	150
L.brazil.	101	GMPCHGYLVVDLKGQVDLPYRKASGVSFHFGDFVQGLRSYVFNCKKN	150
L.major	151	VTMVEGTVNNILTEGLSFSERAYGVEYTTAEKYEVPTKPFREDPPKTNPV	200
L.brazil	151	VTMIEGTVNAILTEGFSFSARAYGVEYTVAEKYGVPANPFREDPPKADPM	200
L.major	201	AATVRKVAATAPLVVMCDGGMSKWKSRYPHYTPAYEYHSHFIGLVLKTVRL	250
L.brazil	201	VRTVRRVATAPLVVMCDGGMSKWKSRYPHYTPASANHSNFVGLVLKKVRL	250
L.major	251	PKEQRGTVFVFGKTGPILSYRLDDNELRLLVDYNKPTLPSLEKQSEWLIQD	300
L.brazil	251	PKEQRGTVFVFGKTGPILSYRLDDSELRLILVDYNKPMLPSLEKQSEWLIQD	300
L.major	301	VAPCLPENMREQFVRVSKDTKSLRSMPPMARYPPAFPSIKGYVGIGDHANQ	350
L.brazil	301	VAPRLPEHMRREEFIRVSKDTKSLRSMPPVALYPPAFPCIKGYVGIGDHANQ	350
L.major	351	RHPLTGGGMTCCFRDAIRLANSLNGIQSLRSVNQEEMAAIEDKIQAAIILN	400
L.brazil	351	RHPLTGGGMTCCFRDAIRLANSLKGIPSLRSANQDEMAAIEDTVQSAILN	400
L.major	401	YARYRYTHSCCINLLSWALYSVFSSPALRDACFDYFLCGGNCVTGPMDDL	450
L.brazil	401	YVRFYRYTHSCCINLLSWALYSVFSTPALRDACFDYFVCGGECVSGPMDDL	450
L.major	451	AGLDPNVGSLFFHYCCVMLHGVANVMMRTGAYSESGKQLSNLEKLTNVAS	500
L.brazil	451	AGLDPSLGALIFHYGVVLYSVANVIMGVGVHNGSGKQLSDLEKLMNVAS	500
L.major	501	FFVDWERMKHAAYLLGKSTQIALPLAKSEFYSMWRFVDPTSPLANISKRI	550
L.brazil	501	FFVDWERMKHAAYLLGKSTKIALPLVKNEFFSMWRFVDPTSPLANISKRI	550
L.major	551	KTMVYTKQFNGKQRKPVGL	569
L.brazil	551	KMMIYARQLNGKQRKPVGI	569

Figura 28: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF:13.1620 com o gene ortólogo presente em *L.(V.) braziliensis* sob a identificação de LbrM13_V2.1480 através do programa Clustal W. Os aminoácidos que definem a assinatura protéica característica da família das monooxigenases estão em cinza.

4.8 Cosmídeo cTbf5

4.8.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf5: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O cosmídeo cTbf5 original possui um inserto de aproximadamente 28 kb e foi selecionado em presença de altas concentrações de TBF, após experimentos de superexpressão induzida com higromicina. A partir de digestões parciais com a enzima *Hind* III, foram produzidas 4 deleções deste inserto, que correspondem respectivamente às deleções: cTbf5- Δ *Hind*III-A, cTbf5- Δ *Hind*III-B, cTbf5- Δ *Hind*III-C e cTbf5- Δ *Hind*III-D. Com base no padrão de digestão das deleções obtidas foi possível sugerir um provável mapa de restrição do inserto que está representado na figura 29.

Figura 29: Provável mapa de restrição do inserto cTbf-5 e das deleções obtidas após digestão parcial com *Hind* III representados linearmente. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. H, *Hind* III.

Todas as deleções tiveram seu DNA transfectado em células promastigotas de LmFA1 e foram induzidas à amplificação gênica através de passagens sucessivas em concentrações crescentes de higromicina. Após o processo de amplificação gênica, as células foram submetidas aos testes funcionais, que envolviam incubações em concentrações crescentes de TBF.

De acordo com a análise dos resultados dos testes funcionais (dados não mostrados), foi possível verificar que apenas as células transfectadas com as deleções cTbf5- Δ *Hind*III-A e cTbf5- Δ *Hind*III-C, além das células transfectadas com o inserto cTbf5 original, exibiam o fenótipo de resistência a TBF quando comparado com as células selvagens do parasita.

Analizando o mapa de restrição sugerido baseado nas deleções obtidas a partir da digestão parcial, juntamente com o resultado dos testes funcionais, verificou-se que o locus gênico relacionado com a resistência a TBF no cTbf5 deve estar presente na região que compreende o fragmento *Hind* III de aproximadamente 8kb presente nos cosmídeos transfectados que foram capazes de conferir resistência a TBF.

4.8.2. Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf5 no genoma de *L. (L.) major*.

Determinada a região do inserto cTbf5 original contendo o provável *locus* relacionado com o fenótipo de resistência a TBF, a próxima etapa foi o seqüenciamento dos nucleotídeos das extremidades do fragmento *Hind*III de aproximadamente 3,5-kb contido na deleção cTbf5- Δ *Hind*III-D (Fig. 29), que após digestão e purificação foi subclonado no vetor pUC- π para o seqüenciamento. O consenso das seqüências de nucleotídeos das extremidades do

inserto do cosmídeo cTbf5, contendo 568 pb na extremidade 3' e 510 na extremidade 5' mostrou similaridade com cromossomo 12 de *Leishmania (L.) major* cepa Friedlin A1, após análise computacional no banco de dados do GeneDB utilizando a ferramenta de busca omni-BLAST (Fig. 30).

Figura 30: Provável mapa de restrição do inserto cTbf-5 e representação esquemática da localização da ORF identificada (LmjF: 12.1190). Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. H, *Hind* III

A análise ‘in silico’ da sequência correspondente ao *locus* do inserto cTbf5 relacionado com a resistência ao TBF revelou a existência de uma grande fase de leitura aberta de 1607 aminoácidos anotada no genoma de *L. (L.) major* como LmjF12.1190. De acordo com as predições anotadas, trata-se de proteína hipotética conservada que apresenta ortólogos em outros tripanossomatídeos como: *L. infantum*, *L. braziliensis*, *T. cruzi* e *T. brucei*. Apresenta ainda uma série de domínios relacionados com processos biológicos ou funções moleculares, como: de transportadores ABC, ou assinatura de lipocalina, ou um domínio de associação com ATPases.

O alinhamento da proteína LmjF12.1190 com o ortólogo de *L. (V) braziliensis*, que possui domínios característicos de proteínas da família dos transportadores ABC e a assinatura própria dessa família, identificada no genoma como LbrM12_V2.0870 (Fig. 31),

resultou em 69,3% de similaridade, indicando que a proteína hipotética presente no *locus* do cTbf5 pode ter função inferida por homologia de uma proteína transportadora, apesar de não ter domínios transmembrana identificados.

L.major	1	MYFHGPSSSDVDRPSL--SRSPPTICTGAPSTAAAALPGIQGQCGPSP	48
L.brazil.	1	MYLGRSSNADGVDGPSSCPSSQPT-CTEAESTATATLHGIRSQQCDLH	49
L.major	49	SSALSSNSTWINASFLRALHSAYAATPKAVGQSD---GERARNGDGVRES	95
L.brazil.	50	SSSFSLYFKWIRASLHRALRSAHATVLKSPGWSNDRHDERARNDSGKCDS	99
L.major	96	TLFPCAVARLFHAWYEALATTRACAVVLPDVGPLVVHLTLLLVGWEMM	145
L.brazil.	100	PSLPAAALRWLHASYEALATTRVCSVILPQVDDGPLVVHLTLLLVGTEIA	149
L.major	146	QATSLYLRRHRAMRVSAKTEAEATQDCDENAADAEEPSDFLTSRQFATAQ	19
L.brazil.	150	QATSFFLRYRRRAVRASAKAKAMAAPECVENAADVEEPSHLSTSLHPVTTQ	199
L.major	196	VPSPPEMESVQTGQSLPRSTRARRLCSYWALIEKAVRAAPRKAGAP	245
L.brazil.	200	APPPPEMGSVLTGRSRLPRGSSRALYRLCSYWALLERAVRAAPRKAGAP	249
L.major	246	TNVAALGWVVSSELVGHNSAQGGRRRAFHLRPSDAAPHGAGTVLVLSAQ	295
L.brazil.	250	TDVTELGWFFRTLHPGHDSVRDGGGGHKFDRLTPDGVPHGAATVVLVLPDD	299
L.major	296	AAFPVMTEPGGSSERQPGVASYAASLVT-----AEKPA	328
L.brazil.	300	AAFPVLAEPGGCTRTTPPMAPLEMSIVNDKPPAAGRSPDAVSPIMTEKPA	349
L.major	329	EVAEPWRVMHFLWTDVVRYSVTYTELRLQLLLGCTVAEIAKVFENAGDAGS	378
L.brazil.	350	-VEEPWKVMHLLWTDVMVRYSVTHSELRLQLLLDCTVAELAKLFASSGNSES	398
L.major	379	CQGGL-----C-----AAYSTRVLPPRGRGNSSRNVSHE	407
L.brazil.	399	LWGGTRVPQTIWGTMGSCSVSSEPVASAAHST-----VNSSLHPS-G	439
L.major	408	AAATTAHCVTSPTSSGVSPSCYADPRVAVACVALTWYLSLVREVYDAVIV	457
L.brazil.	440	AVAFSAHYVPSSTSHGTSPSCYADPRVAVACAALTWYLSLVREVYEAVVV	489
L.major	458	HEDVQRCAGALEEELEGHSKAMYQHGVQAGLAFFEEELHNVWYLGADASS	507
L.brazil.	490	HEDAQRCADELEELQAYGRAVYQRGIAVGAAFFDEALRSVSCPGVKHASS	539
L.major	508	-----GTGEGCASGQPHCHEHPMVLPEVVSTDDHAAPAAASSSASMAA	551
L.brazil.	540	TRSRVVGVTNEECACRLPRRHEKPTGLPEAAITAHGNTGAVVCSTVPMMA	589

L.major	552	GVHLSCRRAGNGNHSRCGGAGDSPLALSVPPRSREECVLVGATHTPIRVA	601
L.brazil.	590	SAHLGNRCESHSSNLLC-----RDGVPVATPHMGIRGA	622
L.major	602	SPRACWAELNGALAALLLRRRLMELLHVRSLFSYMYTSSVAKMVSSAVLT	651
L.brazil.	623	SPRICWAELTAALAALLRRRLMEMSHVRSLSFSYMYTGSVAKMTSIAVLT	672
L.major	652	GLTCLSSRVAASGQVAREAISSNLDYYRTHGALSPPGSHSDSGSGPSHG	701
L.brazil.	673	VLTCCLSSRVAAVGLAVREAIGSNLDYYRTQGALSPSGSDSDSSRLCGS	722
L.major	702	GAVSTQQRILSLCLLECMRLAVNTVLTRTTHAYINMAASHRRNAKAELY	751
L.brazil.	723	GTVTVQQRIFALCLFECMRLAVNTVLTHTMREYIAMAASQRRNAMKAALY	772
L.major	752	EALTRLPLAFFDTHSFDEVEQIVYYVNDIEGVEVHVHHYICSLVMSLFAM	801
L.brazil.	773	EALTRLPLAFFDLHSFDEVEQIVYYVNDIEGVEVHVHRYICSLVTSLSAM	822
L.major	802	QHAVHQLPCRARLLVGATVAVSLTVKCIGQRIKQWVQVAQRTGGVLPWWL	85
L.brazil.	823	QHAMHQLPRRARLLVGATVAVSLAVKYIGRRMKQLMRVAQRTGGVPPSWL	872
L.major	852	RGDELGGVVRGTAELDAQVEENTESNARQGGVMLRGLDIVAVLPQLRLYA	901
L.brazil.	873	RGYNLNGTASAAAELDAQVEENTESNARRGGVMLRGLDIVAALPQLRPYA	922
L.major	902	ADLSLMRWVTHHTRACGAMAGATEASTFLQGLLVLPFQAYGHLLPALGGA	951
L.brazil.	923	ADFRLMRSWTDHTRAC----GAEEAATFAWSLRALPSQAYGQLLPALGGA	968
L.major	952	LMTFADWVLPPLVASYGASMAFCSVDALSLSNRLVEAMRCIGDTVDAVVD	1001
L.brazil.	969	LLTFADWVLPPLVASYGTSTAFCSLDTLSLSNRLIEAMRCVSDTVDVLD	1018
L.major	1002	GRRVAEVVLLNAYKANILEKVLDARRWEPTTADYARGFGFRGEADEHHRD	1051
L.brazil.	1019	GHRVAEVVLLNAYKASVLEKVLDARRWEPTTADYAKGVALGGEADYN---	1065
L.major	1052	KDKSHDAGTGCATRAGEVGSPPRYQGGRYLLQSLRPADSHTVTTSPPSLML	1101
L.brazil.	1066	---TADAGASCGTPAAEVSSRHYVLRHHHLRSLYRAGTHAATAWPPPLTV	1112
L.major	1102	RWMHILKHNCWCVCVTRAPPIRILRGYLRVRSRLATMGIVKEDCRGNRRR	1151
L.brazil.	1113	RWMRVLKDSCRWCVTHLPRVFTLGGRLRLAWRVLATMGLVKSDRRGSNRH	1162
L.major	1152	QSRKPYHHRCPCNRPCLSCRRRRRSPQEDPQPSKSLRPLPPGSASAATD	1201
L.brazil.	1163	QSRQLYHHHRRPPRPRHVSCWRKGRPQQVNQQQPNQAQDPACGVASEAAE	1212
L.major	1202	ACLSNHSSSEDVVGGRADARPSSSPCSDSDVDCEAAAAATLALLTSGTVH	1251
L.brazil.	1213	VCLNSRLSEDDGSRCAHARPSSSSFDDSELCSEAAAAAALANATVH	1262
L.major	1252	AVTVRNVQFCYPTTPTVPVFSHPITCSFVLQGNRDASPPSSPSPSPSAS	1301
L.brazil.	1263	AVAVOSLOFYPTAPTVPVFAHPITCTVVLOGNRNFAFSSSL-----SSST	1301

L.major	1302	PPQRTRCSCSSRGRVLVCLVGPSGHGKSTLLSLLLGMYTHYETPSHILDKD 	1351
L.brazil.	1308	QPQTVRGTCASRGQLVCLVGPSGHGKSTLLSLLLGMTNYGASSPVLGTG	1357
L.major	1352	NDASRGAGGGEVQQQGAEALDRGAALFNLSSPAVIPDIVLTLA----- 	1395
L.brazil.	1358	ENASSGGDDGEEQQESGVETQARGGLPLTPSSSVAVPDIVLTLALPHSP	1407
L.major	1396	HSSDELEPAGLHDAASTPAASAVSEVVYEQLSVASIPRDILRGRLSFSVP 	1445
L.brazil.	1408	SSSEALESTDSPSAAPTSSASVMPEVEYVQLSVALIPRDILRGNLFSFVP	1457
L.major	1446	QSPVIFSGATIAHNISLENYVSLEQEELLAIEAQCAAWAHCEYIHRFPQG 	1495
L.brazil.	1458	QNPIIFSGATIAHNISLENYVSLEQEELMAEIAQCAAWAHCEYIQRFPG	1507
L.major	1496	LMTYIADSGAGASSPLASAGTGGGGAGGGGVRLSIGQAQRLLMARALF 	1545
L.brazil.	1508	LMTYIADSGAGPWASPLAAAASG---GGGGAVRLSVGQAQRLLMARALF	1553
L.major	1546	HGRRGGTVLMDEPTASLDKEVKLKILEEWRELLDSGIVRGAI CATHDDD 	1595
L.brazil.	1554	HGRRGGSVLVMDPTASLDKEVKLKILEEWRLLEG GIVRGMLCATHDDD	1603
L.major	1596	LI AVADQV VRLP	1607
L.brazil.	1604	LI A VADEVVRLP	1615

Figura 31: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF:12.1190 com o gene ortólogo presente em *L.(V.) braziliensis* sob a identificação de LbrM12_V2.0870 através do programa Clustal W. Os aminoácidos que definem a assinatura protéica característica da família das proteínas transportadoras ABC estão em cinza e o domínio determinado como assinatura protéica das proteínas pertencente à família das lipocalinas está contido no quadro.

Como a ORF identificada não está diretamente relacionada como a via de biossíntese do ergosterol, a próxima abordagem seria o isolamento e clonagem do *locus* contendo a ORF, seguido transfecção em células selvagens e testes funcionais, a fim de caracterizar com mais detalhes a relação dessa proteína hipotética com a resistência a TBF em *Leishmania* spp.

4.9 Cosmídeo cTbf6

4.9.1 Avaliação do DNA do inserto cTbf6: padrão de digestão, obtenção de deleções e análise funcional.

O cosmídeo cTbf6 original possui um inserto de aproximadamente 36 kb e foi selecionado em presença de altas concentrações de TBF, após experimentos de superexpressão induzida com higromicina. Inicialmente, o DNA do cosmídeo cTbf6 foi digerido por digestão total com a enzima *Apa* I.

A partir de digestões parciais com a enzima *Apa* I, foram produzidas dez deleções deste inserto, que correspondem respectivamente às deleções: cTbf6- Δ *Apa*I-A, cTbf6- Δ *Apa*I-B, cTbf6- Δ *Apa*I-C, cTbf6- Δ *Apa*I-D, cTbf6- Δ *Apa*I-E, cTbf6- Δ *Apa*I-F, cTbf6- Δ *Apa*I-G e cTbf6- Δ *Apa*I-H, cTbf6- Δ *Apa*I-I e cTbf6- Δ *Apa*I-J, a partir das quais sugerimos um provável mapa de restrição do inserto que está representado na figura 32.

O DNA de todas as deleções obtidas foi transfectado em células promastigotas de LmFA1 e foram induzidas à amplificação gênica através de passagens sucessivas em concentrações crescentes de higromicina. Após o processo de amplificação gênica, as células foram submetidas aos testes funcionais, que envolviam incubações em concentrações crescentes de TBF.

De acordo com a análise dos resultados dos testes funcionais, foi possível verificar que apenas as células transfectadas com o inserto original total cTbf6 e com a deleção cTbf6- Δ *Apa*I-C, exibiram índices de resistência superiores aos apresentados pelas células selvagens (Tabela 6).

Figura 32. Mapa de restrição de cTbf6 e das dez deleções originadas a partir da digestão parcial com *Apa* I (A), representados linearmente. Os números representam os tamanhos aproximados em kb de cada fragmento encontrado. Os retângulos em cinza representam o DNA vetor cLHYG.

Tabela 6. Resistência das células transfectadas com os DNAs dos cosmídeos cTbf6, cTbf6-C e, cTbf6-J e da célula selvagem em presença de TBF.

Linhagem celular	TBF	(n)	(p)
Razão de resistência (RR)			
Lm A1	1	4	
cTbf6	1,70 ± 0,85	4	< 0,0006
cTbf6-Δ <i>Apa</i> I-C	1,61 ± 0,43	4	<0,02
cTbf6-Δ <i>Apa</i> I-J	1,28 ± 0,69	4	<0,001

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

A razão de resistência foi definida pela média $\pm$ o desvio padrão das razões obtidas quando se dividia o valor de RR das células transfectadas com os cosmídeos, pelo valor de RR das células selvagens medido em cada experimento. Valores significativamente diferentes do valor do tipo selvagem (considerado 1 vez resistente) foram calculados com base no teste *t* de Student. ns – não significativo ($p>0,05$)

Pelos dados expostos na tabela 6, verificamos que o DNA da deleção cTbf6-C foi a única deleção capaz de conferir rTBF após transfecção. Esse dado permite a localização de um *locus* relacionado com rTBF, pois de acordo com a análise conjunta dos dados apresentados na tabela 6 e do mapa obtido na figura 32, podemos verificar a presença de um fragmento na deleção cTbf6-C que não ocorre nas demais.

Baseados neste resultado, isolamos um fragmento *Hind* III de aproximadamente 3 kb a partir do cosmídeo cTbf6 para posterior subclonagem no vetor puc π e seqüenciamento dos nucleotídeos.

Analisando o mapa genômico sugerido, verifica-se que o locus gênico relacionado com a resistência ao TBF no cTbf6 e no cTbf6-C deve estar presente na região que compreende o fragmento *Apa* I de aproximadamente 3 kb presente apenas no DNA da deleção cTbf6-C e no inserto original cTbf6.

4.9.2 Determinação da sequência de nucleotídeos, identificação e localização do inserto cTbf6 no genoma de *L. (L.) major*.

Determinada a provável região do inserto original relacionada com o fenótipo de resistência observado, a etapa seguinte foi o seqüenciamento dos nucleotídeos do locus relacionado com a expressão do fenótipo. Inicialmente o cTbf6 foi digerido com *Hind* III, a fim de obtermos um fragmento pequeno e que pudesse ser clonado no vetor plasmidial puc π . O produto da digestão foi submetido a uma corrida eletroforética e uma banda de aproximadamente 2,6 kb foi purificado a partir do gel de agarose e posteriormente ligado ao

vetor anteriormente citado. A confirmação da obtenção do produto esperado para o processo de seqüenciamento adequado foi feita através de corrida eletroforética após digestão com *Hind* III. O produto da digestão permitiu observar a existência de duas bandas, uma de aproximadamente 3 kb, que corresponde ao vetor, e outra de aproximadamente 2,6 kb, que corresponde ao fragmento selecionado (Figura 33).

Figura 33: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo o produto da clonagem do fragmento de aproximadamente 2,6 kb proveniente da digestão do cTbf6-C com *Hind* III. PM: padrão de peso molecular em quilobase (kb) representado pelo DNA do fago λ digerido com *Hind* III. H III, *Hind* III.

O consenso das seqüências de nucleotídeos das extremidades dos fragmentos analisados mostrou similaridade com o cromossomo 17 de *Leishmania (L.) major* cepa Friedlin A1, após análise computacional com auxílio do programa do Gene DB – BLAST (Altschul et al, 1997).

Após a identificação e o isolamento da região de similaridade entre o cromossomo 17, verificamos também que o tamanho da região isolada entre as seqüências obtidas com o sequenciamento das extremidades do fragmento do cosmídeo cTbf6, confere com o padrão de digestão *Apa* I encontrado no isolamento da região responsável pela resistência ao TBF.

T.cruzi	203	-----HDATLYT-----	209
L.major	305	AEHVLRRQERFRVRSTAAMARGAYWVDVPLTAEEERDRREIGVAASTDA : :	354
T.cruzi	210	-----VVADVADMAGGQYWVEIAP-----	227
L.major	355	AISAVADTENNSITCERVDRDALLHPPVALYVDPLLPCDELYSERGVNT : : : . . : : : . . : . . . : . :	404
T.cruzi	228	-----TEPSTMSRRVDREDIIIEFPRPVFYDFLLPADEFNNIRGTST	270
L.major	405	SVYVFFLRALQQQHKLADGRILCGTAASDSSSDCSGMRPGTGIGTPDPP . : :	454
T.cruzi	271	CLFV-----	274
L.major	455	EAAAALALQLALCARQRLELASRIHRAINAANRSSVLRVPSPRAVATCV . . . : :	504
t.cruzi	275	--AATLAL-----RGI-----RLP-----	286
L.major	505	QAGTAVTSAKCSGLGAPAVSLQVRVDH---ARGSVQLRALTLSDSADST : . . . : : : : : . : . . . :	550
T.cruzi	287	REKTMVTANKMKGF---SKNVTVMGHYVRGLRKKLSECLARRSCCD--	331
L.major	551	SDALGSDWDASGRAATPTSSAAARPLQDTETSSAAYTKRRREDAVEGEE . : : .	600
T.cruzi	332	-----EPGM---TLSGLVEVRMTQDCV----	350
L.major	601	AVRSSHNAAITKATRSPTEVLLRSALKLAALYDITRSASLELQQAERSA . : : . : . : : . : . . .	650
T.cruzi	351	TLRYGGRA-----IEVLQRTVERLSLLWD---ARL---QRER--	381
L.major	651	SDESSEVRVTSPEGAQMNASLPASLSSWLATSLLRRLTGPRQAVSGLTAS . :	700
T.cruzi	382	-----EGT-----AVNG----	388
L.major	701	GTTGVHSEASCDSWSSTVVLHRGGACSPSTMPLAGERVPCPSLSAGRIDH : . . . : . .	750
T.cruzi	389	--RGVESARD V --- WQYAVTQQR ----- TSVSDGL--H	414
L.major	751	SSASSPPLLADDPPPTGVPAATAIASTTLTTTTTTTEERIFLGRLFHTLL . . . : 	800
T.cruzi	415	VFM TSEPFFL-----RAFTML	430
L.major	801	LRYRTLFGHEGYNQGPQAAVPPPVMELHAAFEISAEAFASPLNAQLPQF : : : . : . .	850
T.cruzi	431	LRYRSLFGEMGYNQGPAAVPPVLMRQLCEAFDVQCEAFASPINAQLSHF	480
L.major	851	GSLFPDTRDRHFGSMGSFFDLQFGGASGDCHAQRAPIPTDCAVPPPGCHIE . : : . . : .	900
T.cruzi	481	GSLFPDTDYYFGSLGSFFDLSF--VAG-----HYE	508
L.major	901	VNPPFDITLLRHMGTHL----LSCLTRAQUESTQSLLFLIVLPSHDLTDAE . . : : : . . : : .	946
T.cruzi	509	VNPPFVTAVLQRLQTCLLQGALAC--HDGEDDSPLLFVIVLPSHDLDDAE	556
L.major	947	KAAAAVASTRLPTQAAAAKR-----LSSDRLRGST . : : : . : : . . . : .	976
T.cruzi	557	---VALHDSPTPSQHRHTVREKVGNI DDNRDGGGGDGHHGGVS RKRGRPDS	603
L.major	977	AATASVPPSTERTLRESPYCLGHVLCAAAESAYVDGHQHLLQSPFFRIET : . . : : . .	1026
T.cruzi	604	AGETM---SVERALRESSFCFAHALCAAESAYVDGHOHLRLRAPLFCIGT	650

L.major	1027	PTRLILLGNTAARTRFPHATTQLEAVRAAWKEVT-ESALRQQR	1068
		: . . : .:. ..: . :.. :.. .. .:.	
T.cruzi	651	PTRLIVLGNRAARRRYDNAAERLAAVKDTWRRYTLEFKLEKRRRA	694

Figura 34: Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína LmjF:17.0940 com o gene presente em *T. cruzi* sob a identificação de Tc00.1047053511313.20 através do programa Clustal W. Os aminoácidos que definem a assinatura protéica característica da família das proteometiltransferases estão em cinza.

5 Discussão

Foi descrito neste trabalho a identificação e a caracterização de nove loci de *Leishmania major* relacionados com a resistência aos inibidores da via de biossíntese do ergosterol, fármacos potenciais na quimioterapia de leishmaniose.

Como em *Leishmania spp.* a amplificação gênica e a conseqüente superexpressão do produto gênico constitui um importante mecanismo relacionado com a resistência a fármacos, a utilização de vetores (*shuttle vectors*) capazes de amplificarem e superexpressarem os genes clonados no inserto seria uma ferramenta molecular para a caracterização de loci relacionados com a resistência a uma série de compostos anti-parasitários (Cotrim et al, 1999). Até então, a identificação dos prováveis alvos de um determinado fármaco era feita a partir do cultivo das células do parasita em concentrações crescentes do mesmo fármaco (Beverley et al, 1984; Ellenberger, Beverley, 1989). No entanto, esta estratégia freqüentemente seleciona parasitas que exibem múltiplos mecanismos de resistência, além das amplificações, o que dificulta o isolamento de prováveis loci envolvidos na resistência a fármacos (Beverley, 1981; Borst, Ouellette, 1995).

Baseado no protocolo de seleção por superexpressão, foram isolados 44 cosmídeos relacionados com a resistência a uma série de compostos com ação leishmanicida, a partir de uma genoteca construída no vetor cLHYG com fragmentos de DNA genômico de *Leishmania (L.) major* da cepa Friedlin V1 de cerca de 30-45 kb de extensão (Ryan et al, 1993; Descoteaux et al, 1994; Cotrim et al, 1999). Dois desses compostos testados – Terbinafina (TBF) e aos análogos Itraconazol/Cetoconazol (ITZ/CTZ)- agem inibindo a biossíntese de ergosterol, produto final da biossíntese dos esteróis em leishmania e fungos,

que contribui com a manutenção da integridade e fluidez da membrana. Além disso, membranas depletadas de ergosterol são mais permeáveis à glucose, outras moléculas polares e íons, o que as tornam suscetíveis a danos, levando à ocorrência de morte celular (Mercer, 1991; Coppens e Courtoy, 1996).

Nesta abordagem, populações de células transfectadas com o DNA da genoteca construída no vetor cLHYG foram plaqueadas na presença desses dois inibidores (TBF e ITZ), e colônias contendo as células que abrigavam os cosmídeos portadores do *loci* responsável pela resistência puderam ser isolados e posteriormente analisados.

Dos experimentos de seleção com TBF foram isolados seis cosmídeos, que tiveram seus DNAs extraídos e analisados quanto ao padrão de digestão, não apresentando nenhuma região em comum; portanto foram denominados: cTbf1, cTbf2, cTbf3, cTbf4, cTbf5 e cTbf6. Enquanto para o ITZ, foram identificados três cosmídeos também não relacionados entre si, denominados: cItz1, cItz2 e cItz4. A análise do padrão de digestão dos cosmídeos com a mesma enzima de restrição evidencia que esses loci estão localizados em regiões distintas no genoma do parasita, o que sugere que diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos no fenótipo de resistência.

Cada um dos insertos desses nove loci foram mapeados de acordo com o perfil de restrição, e uma série de deleções foram obtidas através de digestão parcial com as enzimas de restrição apropriadas para cada cosmídeo.

Os DNAs de todos os nove cosmídeos e suas deleções foram transfectados e as células testadas funcionalmente em presença dos inibidores. Com a posterior subclonagem e sequenciamento de nucleotídeos os loci envolvidos nos fenótipos de resistência fossem identificados no genoma de LmFA1.

Embora os níveis de resistência a TBF/ITZ conferido pelos cosmídeos fossem modestos, eram estatisticamente significantes para os cosmídeos que continham os insertos totais, bem como as deleções e construções que continham a região codificadora (loci) e os sinais necessários para o correto processamento do transcrito dos genes envolvidos.

Da mesma forma, índices de resistência conferidos por genes ligados a resistência a outros fármacos, clonados em vetores e posteriormente transfectados, bem como a amplificação endógena de genes relacionados com a resistência, mostra níveis modestos de resistência para vinblastine (Henderson et al., 1992; Chow et al., 1993), primaquina (Ellenberger, Beverley, 1989). Porém, foi observado um aumento nos níveis de resistência quando regiões irrelevantes do inserto eram removidas, fenômeno esse já observado anteriormente (Cotrim et al, 1999; Singh et al, 2001).

Em contrapartida, a análise das seqüências nucleotídicas dos nove *loci* demonstrou que apenas dois deles estão diretamente envolvidos com a via de biossíntese do ergosterol, cItz4 e cTbf4, contendo um loci relacionado com a resistência ao ITZ e à TBF respectivamente. Os demais loci identificados como prováveis responsáveis pelos fenótipos de resistência apresentados foram analisados quanto à presença de domínios ou seqüências repetitivas características de proteínas conhecidas, que pudessem indicar sua função, já que não estavam diretamente ligados à via de biossíntese do ergosterol ou codificavam para proteínas hipotéticas de função desconhecida.

Estudos realizados por MacPherson et al (2005) indicaram a presença de reguladores transcricionais da família dos *zinc clusters proteins* envolvidos na resistência pleiotrópica em *C. albicans*, que possuem papel determinante na resistência aos antifúngicos através da ativação de uma via alternativa de produção de esteróis sugerindo um mecanismo autoregulatório mediado pelo gene Upc2p. Observou-se que os indivíduos

mutantes que tinham esse loci deletado eram hipersensíveis aos antifúngicos e ainda mais, que indivíduos tratados continuamente exibiam fenótipo de resistência com níveis de Ec50 cada vez maiores, corroborando a possibilidade de envolvimento na participação ou ativação de alguma via alternativa de transcrição de genes ERG (genes envolvidos na via de biossíntese do ergosterol de membrana de fungos). As proteínas pertencentes à família das *Zinc clusters* são encontrados unicamente em fungos, mas sua existência nos alerta para o fato de que podem existir proteínas de função ainda não esclarecida, que estejam atuando em processos semelhantes a esse nos tripanossomatídeos, já que estes produzem ergosterol a partir da mesma via.

Observou-se também que mutantes resistentes a TBF de *Nectria haematococca*, um fungo fitopatogênico, contém ao menos, 10 vezes mais esqualeno do que as cepas selvagens, isso possivelmente sugere a presença de uma forma alternativa de esqualeno epoxidase nestes mutantes. Portanto, uma reduzida afinidade da esqualeno-epoxidase tanto pelo substrato quanto pelo fungicida podem explicar a resistência à TBF nestes mutantes (LASSERON DE-FALANDRE et al., 1999).

Com relação à possibilidade de alteração da expressão de genes, mutantes que alteraram a expressão do gene *ERG9*, um gene codificador da esqualeno sintase de *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram suscetibilidade alterada a TBF. Essas mutações alteram a regulação transcricional do gene *ERG9* afetando o fluxo através da via de biossíntese pelo aumento da concentração intracelular de enzimas da via. Isso pode explicar a diminuição da suscetibilidade dos organismos aos compostos que têm como alvo as enzimas da via biossintética do ergosterol (KENNEDY e BARD, 2001).

Os resultados obtidos pelos estudos acima sugerem que os mecanismos de resistência aos inibidores da via de biossíntese do ergosterol são muito variados e podem constituir-se através de vias alternativas.

A análise “in silico” dos *loci* identificados foi feita baseada nos dados disponibilizados no GeneDB e no site do Projeto Genoma de *Leishmania (L.) major*, sendo constantemente comparada com o genoma de outros tripanossomatídeos disponíveis.

Na análise do locus presente no cosmídeo cItz1 foi identificado um gene que codificava para uma proteína hipotética (LmjF26.2610), localizada entre a posição 1052081 e 1053445, possuindo 1706 nucleotídeos, codificando para uma proteína de 568 aminoácidos que possui quatro domínios localizados entre os resíduos 2-24, 183-198, 328-343 e 382-398, característicos de uma flavoproteína monooxigenase, com ortólogos presentes em *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) infantum* e *T. brucei*, ressaltando que o ortólogo de *T. brucei* não possui o último domínio característico desse grupo protéico.

A localização desses domínios próprios de flavoproteínas monooxigenases indica que o fenótipo de resistência apresentado pelo inserto cItz1 pode estar relacionado com a superexpressão de um gene que esteja relacionado com a via de biossíntese do ergosterol.

Neste estudo, as análises in silico dos loci identificados anteriormente nos insertos dos cosmídeos cItz4 e cTbf4 foi imprescindível porque quando os estudos com esses insertos foram finalizados ainda não se possuía o Genoma de *Leishmania (L.) major* disponível para consultas e verificações.

A proteína esqualeno monooxigenase (LmjF13.1620) foi identificada no locus gênico presente no cosmídeo cTbf4 e está localizada no genoma entre as posições 611155 e 612864, sendo codificada por 569 aminoácidos. A esqualeno monooxigenase é uma flavoproteína que catalisa a formação do esqualeno (através da monohidroxilação de anéis

aromáticos) e em *Leishmania* spp produzirá uma molécula de 2,3-Epoxido-Esqualeno, de forma semelhante ao processo biossintético descrito para fungos (Favre e Ryder, 1997)

O fato de o locus presente no cosmídeo cItz1 codificar para uma proteína com domínios pertencentes à família das flavoproteínas, indica que o fenótipo de resistência encontrado provavelmente está relacionado com alguma interferência na via de biossíntese do ergosterol; já que a ausência ou interrupção desse gene é responsável pela perda do fenótipo de resistência observado nas deleções de cItz1 testadas funcionalmente em presença de TBF.

Na análise do cosmídeo cItz2 foi optou-se por uma estratégia de subclonagem diferenciada das demais devido ao fato de o sítio de restrição resultante da digestão com *Eco* RV ser em extremidades com fundo cego (blunt ends). A adição de um resíduo de adenina nas extremidades do fragmento de 2,102pb presente na deleção cItz2- Δ *Eco*RV-A purificado a partir do gel de agarose, permitiu a sua subclonagem no vetor pGEM-t (Fig. 6). O produto dessa subclonagem foi submetido a sequenciamento obtendo cerca de 97% da sequência seqüenciada sem a ocorrência de erros (dados não mostrados). Na análise do locus presente no cosmídeo cItz2 foram identificadas duas fases de leitura abertas que codificavam para as proteínas LmjF29.2790 e para LmjF29.2800. A proteína (LmjF29.2790) é uma proteína hipotética conservada, descrita em outros tripanossomatídeos, como *L. braziliensis*, *T. cruzi* e *T. brucei*, e possui dois domínios transmembrana, sendo que o primeiro está localizado entre os nucleotídeos 77 e 92 e o segundo entre os nucleotídeos 102 e 124, além de uma assinatura encontrada no gene ortólogo presente em *L. braziliensis*, identificada como própria de uma família de proteínas conhecida como claudinas (Fig.9). Essas proteínas criam uma barreira primária, impedindo o transporte de solutos e restringindo a difusão lateral de lipídios de membrana e proteínas,

o que contribui para a manutenção da polaridade da membrana (Furuse et al, 1998; Tsukita et al, 1999). Esse dado é um indicativo de que, apesar de não atuar diretamente na via de biossíntese do ergosterol, essa proteína possivelmente é capaz de manter a membrana estável enquanto os níveis de ergosterol estão baixos por causa do tratamento com o inibidor da via de biossíntese do ergosterol.

A proteína LmjF29.2800 codifica para uma proteína conhecida como inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase que catalisa a hidrólise de nucleotídeos a nucleosídeos e ribose. Possui função importante para os parasitas que não sintetizam purinas como *Leishmania* spp., mas não possui relação aparente com a via de biossíntese do ergosterol (Shi et al, 1999).

Na análise do cosmídeo cTbf1 localizamos uma proteína identificada no genoma de *Leishmania (L.) major* como LmjF20.0640, que possui função inferida por homologia como uma provável kinesina. A função foi inferida devido à presença de uma assinatura protéica própria da família das kinesinas, que são proteínas associadas aos microtúbulos, possuindo, em sua maioria, função motora. Ainda não é possível afirmar como esse gene pode alterar o fenótipo de resistência de células LmFA1 quando transfectadas com o cosmídeo cItz1 e serão necessários estudos adicionais para caracterização funcional desse gene de acordo com o fenótipo apresentado quanto testado funcionalmente em presença de TBF.

Na análise do cosmídeo cTbf2 localizamos uma fase de leitura aberta que codificava para uma proteína hipotética identificada no genoma de *L. (L.) major* como LmjF27.1170, que possui certa similaridade com uma proteína hipotética conservada, sem domínios transmembrana e com genes ortólogos em outros tripanossomatídeos como *L. (V.) braziliensis* (LbrM27_V2.1270), *L. infantum* (LinJ27_V3.1050), *T. cruzi* (Tc00.1047053506369.50) e *T.*

brucei (Tb11.55.0003), sendo que o alinhamento com os ortólogos apresentou similaridade de 87,4%, 91,5%, 54,8% e 59,3% respectivamente; sem apresentar domínios característicos de famílias protéicas.

A análise dos sítios de restrição presentes nesta proteína indicou a presença de um sítio interno para a proteína *Hind* III, dado que confirma a perda do fenótipo de resistência da deleção cTbf2- Δ ApaI-B quando digerida com a enzima *Hind* III para subclonagem dos fragmentos resultantes em pSNBR, a fim de gerar novas deleções identificadas como cTbf2- Δ ApaI-Ba e cTbf2- Δ ApaI-Bb.

A análise computacional através do Gene DB e do Blast para o cosmídeo cTbf3 , mostrou similaridade com o cromossomo 10 de *L. (L.) major* cepa Friedlin A1, onde foi localizada uma região identificada como LmjF10.0218, localizada entre a posição 95388 e a posição 97526, que codifica para uma proteína de 712 aminoácidos, que não possui nenhuma relação direta com a via de biossíntese do ergosterol, nem possui função conhecida; com ortólogos em *L. infantum* e em *L. braziliensis*, sem domínios característicos através dos quais se possa atribuir uma função por inferência. No entanto, encontramos um sítio de restrição para a enzima *Hind* III no seu interior, o que, de acordo, com os resultados dos testes funcionais obtidos indica que provavelmente o gene foi interrompido e tornou-se inativo. O sítio para a enzima *Hind* III já havia sido identificado nos processos de obtenção de deleções e subdeleções. A ausência do fenótipo de resistência após a digestão com a enzima *Hind* III aponta para uma possível relação deste gene com o fenótipo apresentado pelas células transfectadas.

A análise computacional pelo BLAST da sequência correspondente à região do inserto cTbf5 relacionado com a resistência ao TBF revelou uma fase de leitura aberta de 1617

aminoácidos que codifica para uma enzima identificada no genoma de *Leishmania.(L.) major* como LmjF12.1190, uma proteína conservada, que possui domínios característicos de uma proteína transportadora da família ABC, e uma assinatura protéica própria da família das lipocalinas. As lipocalinas são um grupo de proteínas largamente distribuídas, que compartilham motivos altamente conservados (short conserved region – SCR) nas suas sequências de aminoácidos. Além de estarem envolvidas na ligação e transporte de moléculas hidrofóbicas pequenas, essas proteínas participam da distribuição de vários compostos endógenos ou exógenos. No entanto, a função fisiológica não está restrita a processos de transporte, mas também de regulação dos processos imunológicos e de desenvolvimento; e também estão envolvidas nas respostas dos organismos a vários fatores de estresse oxidativo e vias de transdução de sinais (Grzyb et al.; 2006; Flower, 1996). A presença de genes ortólogos em outros tripanossomatídeos como *L. infantum*, *L. braziliensis*, *T. cruzi* e *T. brucei*, confirmam que se trata de uma proteína comum a esses organismos. A superfamília das proteínas ABC (ATP-binding cassette) têm uma estrutura bastante conservada. São proteínas de membrana constituídas de uma duplicação em tandem, sendo que, geralmente, cada uma possui seis regiões transmembrana de α -hélices e um domínio de ligação de ATP, essencial para a atividade de ATP (Endicott, Ling, 1989; Gottesman, Pastan, 1993). A primeira glicoproteína transportadora caracterizada em *Leishmania* spp. foi a PGPA (glicoproteína-P A) que está relacionada com a resistência ao arsenito e aos antimônios (Callahan, Beverley, 1991; Ouellette, Fase-Fowler, Borst, 1990; Papadopoulou et al, 1994). O fato de a proteína provável responsável pelo fenótipo de resistência a terbinafina neste cosmídeo possuir domínios característicos das proteínas transportadoras é relevante devido à existência de trabalhos recentes nos quais foi identificada e caracterizada uma proteína PRP1 envolvida com a resistência à pentamidina (Coelho, 2003; Coelho,2006). A ausência de

domínios transmembrana possibilita inferir tratar-se de uma proteína intracelular, cujo mecanismo de resistência à drogas se dá pelo acúmulo da droga em vesículas e posterior exocitose pela região do bolso flagelar (Wyllie; Cunningham, Fairlamb, 2004; Ouellette, Drummelsmith; Papadopoulou, 2004).

Análises futuras permitirão a caracterização deste locus gênico e a verificação de sua função relacionada com o fenótipo de resistência observado.

A análise do cosmídeo cTbf6 indicou a presença de uma fase de leitura aberta identificada no genoma de *Leishmania (L.) major* como LmjF17.0940, e que possui ortólogos em presentes em *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e em *T. brucei*. O ortólogo de *T. brucei* apresenta uma assinatura proteica própria das metiltransferases. No entanto, o alinhamento não permitiu a identificação deste domínio em LmjF17.0940, apresentando apenas 34% de similaridade.

Magaraci (2003) demonstrou que células selvagens de *Leishmania* spp e *T. cruzi* quando tratadas com azasteróis, inibidores conhecidos das esteróis 24-metiltransferases, sofrem mudanças morfológicas drásticas, incluindo o destacamento de um dos folhetos da membrana, formando bolhas; o destacamento da membrana do corpo celular e do flagelo dos microtúbulos subpeliculares e axonemais, respectivamente, aumento da bolsa flagelar, aparecimento de um vacúolo localizado próximo à bolsa flagelar, que parece corresponder ao vacúolo contrátil, aumento da mitocôndria, com o aparecimento de estruturas concêntricas formadas pelas invaginações da membrana mitocondrial interna, alterações no núcleo de algumas células, onde a cromatina aparece em grumos, como descrito para células apoptóticas, formação de uma vesícula na superfície do parasito entre a bolsa flagelar e o citóstoma e bloqueio do processo de divisão celular. Sabendo-se que as metiltransferases são

responsáveis pela transferências de grupos metila a esteróis, e esses são participantes essenciais da via de biossíntese do ergosterol; o fato de o locus gênico presente no cTbf6 possuir um ortólogo com um domínio de assinatura pertencente a superfamília dessas proteínas, pode explicar o fenótipo de resistência conferido ao cosmídeo. No entanto, não se pode afirmar que o locus gênico presente no cTbf6 se trata de uma região codificadora para uma metiltransferase, sem que estudos adicionais sejam realizados para a caracterização ou não deste locus como uma metiltransferase envolvida na via de biossíntese de esteróis de membrana.

As análises propostas por este trabalho permitiram compreender que a utilização isolada de inibidores da via de biossíntese do ergosterol para o tratamento de leishmanioses podem ser ineficazes devido à diversidade de genes que podem ser superexpressos simultaneamente, visando proporcionar resistência e garantir a sobrevivência do parasita.

Estudos de caracterização adicionais são necessários para uma melhor compreensão das interações ocorrentes entre os fármacos e os genes superexpressos e a ativação de vias alternativas de produção de esteróis e manutenção da membrana.

6 Conclusões

Através deste estudo pode-se concluir que os fenótipos de resistência relacionados com os inibidores da via de biossíntese de ergosterol observados nos cosmídeos isolados estavam relacionados com a presença de genes envolvidos ou não na via de biossíntese do ergosterol.

Os cosmídeos contendo os prováveis loci envolvidos na via de biossíntese do ergosterol são: cItz1, cItz4, cTbf4 e cTbf6, na qual as fases de leitura abertas codificam para flavoproteína monooxigenase, esqualeno sintase, esqualeno monooxigenase e metiltransferase, respectivamente.

Os cosmídeos contendo loci que provavelmente atuem por vias alternativas ou de manutenção de estabilidade da membrana são: cItz2 e cTbf5, nas quais as fases de leitura abertas codificam para: provável proteína claudina e provável lipocalina, proteína pertencente à família dos transportadores ABC.

Os cosmídeos contendo os loci que não possuem domínios característicos que permitiram inferir sua função por homologia, mas a interrupção da fase de leitura aberta por sítios de restrição localizados em seu interior proporcionaram a perda do fenótipo são: cTbf1, cTbf2 e cTbf3.

7 Referências Bibliográficas

Abramson MA, Dietze R, Frucht DM, Schwantz R, Kenney RT. Comparison of New and Old World leishmanias in an endemic region of Brazil. *Clin Infect Dis* 1995;20(5):1292-7.

Aggarwal P, Handa R, Singh S, Wali JP. Kala-azar--new developments in diagnosis and treatment. *Indian J Pediatr* 1999;66(1):63-71.

Alexander J, Vickerman K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Protozool* 1975;22(4):502-8.

Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(2):298-319.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(2):334-59, table of contents.

Anacleto C, Abdo MC, Ferreira AV, Murta SM, Romanha AJ, Fernandes AP, et al. Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* cell line. *Parasitol Res* 2003;90(2):110-8.

Aoki JI, Yamashiro-Kanashiro EH, Ramos DC, Cotrim PC. Efficacy of the tubercidin antileishmania action associated with an inhibitor of the nucleoside transport. *Parasitol Res* 2008.

Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 2):143-53.

Back DJ, Tjia JF. Comparative effects of the antimycotic drugs ketoconazole, fluconazole, itraconazole and terbinafine on the metabolism of cyclosporin by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 1991;32(5):624-6.

Back DJ, Tjia JF, Abel SM. Azoles, allylamines and drug metabolism. *Br J Dermatol* 1992;126 Suppl 39:14-8.

Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 1994;79(2):215-8.

Bello AR, Nare B, Freedman D, Hardy L, Beverley SM. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(24):11442-6.

Bennett JE. Amphotericin B Toxicity; Review of Selected Aspects of Pharmacology. *Ann Intern Med* 1964;61:335-40.

Berman JD, Gallalee JV, Best JM. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* 1987;36(2):197-201.

Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis* 1988;10(3):560-86.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997;24(4):684-703.

Beverley SM. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 1991;45:417-44.

Beverley SM, Coburn CM. Recurrent de novo appearance of small linear DNAs in *Leishmania major* and relationship to extra-chromosomal DNAs in other species. *Mol Biochem Parasitol* 1990;42(1):133-41.

Beverley SM, Coderre JA, Santi DV, Schimke RT. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocate during stabilization. *Cell* 1984;38(2):431-9.

Beverley SM, Ellenberger TE, Cordingley JS. Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(8):2584-8.

Beverley SM, Petrillo-Peixoto M. Naturally-occurring gene amplifications conferring drug resistance in *Leishmania tarentolae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83 Suppl 1:330-3.

Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(2):158-66.

Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:427-60.

Callahan HL, Beverley SM. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1992;267(34):24165-8.

Calvopina M, Guevara AG, Armijos RX, Hashiguchi Y, Davidson RN, Cooper PJ. Itraconazole in the treatment of New World mucocutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 2004;43(9):659-63.

Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 2003;41(2):540-6.

Chiquero MJ, Olmo A, Navarro P, Ruiz-Perez LM, Castanys S, Gonzalez-Pacanowska D, et al. Amplification of the H locus in *Leishmania infantum*. *Biochim Biophys Acta* 1994;1227(3):188-94.

Chow LM, Wong AK, Ullman B, Wirth DF. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60(2):195-208.

Coderre JA, Beverley SM, Schimke RT, Santi DV. Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(8):2132-6.

Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130(2):83-90.

Coelho AC, Yamashiro-Kanashiro EH, Bastos SF, Mortara RA, Cotrim PC. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2006;150(2):378-83.

Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(8):3030-2.

Coelho AC, Gentil LG, da Silveira JF, Cotrim PC. Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Exp Parasitol* 2008;120(1):98-102.

Consigli J, Daniello C, Gallerano V, Papa M, Guidi A. Cutaneous leishmaniasis: successful treatment with itraconazole. *Int J Dermatol* 2006;45(1):46-9.

Coppens I, and Courtoy, P.J. The mevalonate pathway in parasitic protozoa and helminths. *Experimental Parasitology* 1996;82:76-85.

Correia D, Macedo VO, Carvalho EM, Barral A, Magalhaes AV, de Abreu MV, et al. [Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulfate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29(5):447-53.

Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piaui, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica* 1990;24(5):361-72.

Cotrim PC, Garrity LK, Beverley SM. Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. *J Biol Chem* 1999;274(53):37723-30.

Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001;6(11):899-905.

Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002;8(4):319-42.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003;19(11):502-8.

Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005;21(11):508-12.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):111-26.

Cunningham ML, Fairlamb AH. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem* 1995;230(2):460-8.

De Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol* 2005;128(1-2):41-5.

Dedet JP. Current status of epidemiology of Leishmaniasis. In: FARREL JPe, editor. *Leishmania*. Massachussets: Kluwer Academic Publisher; 1995. p. 1-10.

Descoteaux S, Yu Y, Samuelson J. Cloning of *Entamoeba* genes encoding proteolipids of putative vacuolar proton-translocating ATPases. *Infect Immun* 1994;62(8):3572-5.

Detke S. Identification of a transcription factor like protein at the TOR locus in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;90(2):505-11.

Dey S, Papadopoulou B, Haimeur A, Roy G, Grondin K, Dou D, et al. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 1994;67(1):49-57.

Dixon H, Ginger CD, Williamson J. Trypanosome sterols and their metabolic origins. *Comp Biochem Physiol B* 1972;41(1):1-18.

Dogra J, Saxena VN. Itraconazole and leishmaniasis: a randomised double-blind trial in cutaneous disease. *Int J Parasitol* 1996;26(12):1413-5.

El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, et al. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(5):1988-93.

Ellenberger TE, Beverley SM. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1989;264(25):15094-103.

Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989;58:137-71.

Favre B, Ryder NS. Cloning and expression of squalene epoxidase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Gene* 1997;189(1):119-26.

Ferreira-Pinto KC, Miranda-Vilela AL, Anacleto C, Fernandes AP, Abdo MC, Petrillo-Peixoto ML, et al. *Leishmania (V.) guyanensis*: isolation and characterization of glucantime-resistant cell lines. *Can J Microbiol* 1996;42(9):944-9.

Freire M, Badaro F, Avelar ME, Luz K, Nakatani MS, Teixeira R, et al. Efficacy and Tolerability of Liposomal Amphotericin B (Ambisome) in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997;1(5):230-240.

Furtado TA. Leishmaniose. In: Machado-Pinto J, editor. *Doenças Infecciosas com Manifestações Dermatológicas*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica; 1994. p. 319-338.

Gangneux JP. [Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities]. *Presse Med* 1999;28(37):2057-66.

Gebre-Hiwot A, Frommel D. The in-vitro anti-leishmanial activity of inhibitors of ergosterol biosynthesis. *J Antimicrob Chemother* 1993;32(6):837-42.

Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4):501-17.

Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, El Fadili A, Peytavi R, et al. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2003;31(20):5886-96.

Gupta AK, Shear NH. Terbinafine: an update. *J Am Acad Dermatol* 1997;37(6):979-88.

Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 1992;12(6):2855-65.

Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000;25(5):363-70.

Hervas J, Chacon MDLF, Sanchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castillo JA, et al. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *J Feline Med Surg* 1999;1(2):101-5.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005;309(5733):436-42.

Jha TK. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77(2):167-70.

Jha TK, Sharma VK. Pentamidine-induced diabetes mellitus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984;78(2):252-3.

Joseph-Horne T, Hollomon DW. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiol Lett* 1997;149(2):141-9.

Kaplanski G, Buscaylet S, Penot-Ragon C, Durand JM, Soubeyrand J. Antimony/interferon-gamma combination in the treatment of visceral leishmaniasis in AIDS. *Aids* 1996;10(10):1172-4.

Kayser O, Kiderlen AF, Bertels S, Siems K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(1):288-92.

Kennedy MA, Bard M. Positive and negative regulation of squalene synthase (ERG9), an ergosterol biosynthetic gene, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2001;1517(2):177-89.

Kerby BR, Detke S. Reduced purine accumulation is encoded on an amplified DNA in *Leishmania mexicana amazonensis* resistant to toxic nucleosides. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60(2):171-85.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: W. PETERS; KILLICK-KENDRICK R, editor. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press Inc.; 1987. p. 1-120.

Lazard D, Tal N, Rubinstein M, Khen M, Lancet D, Zupko K. Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450IIA and UDP-glucuronosyl transferase. *Biochemistry* 1990;29(32):7433-40.

LeBowitz JH, Coburn CM, McMahon-Pratt D, Beverley SM. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(24):9736-40.

Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, et al. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* 2001;276(28):26301-7.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396(6712):643-9.

Lewis DJW, R.D. Transmission and vectors. In: PETERS WK-K, R., editor. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press Inc.; 1987. p. 235-262.

MacPherson S, Akache B, Weber S, De Deken X, Raymond M, Turcotte B. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(5):1745-52.

Magaraci F, Jimenez CJ, Rodrigues C, Rodrigues JC, Braga MV, Yardley V, et al. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem* 2003;46(22):4714-27.

Marchini JF, Cruz AK, Beverley SM, Tosi LR. The H region HTBF gene mediates terbinafine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;131(1):77-81.

Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 2005;57(6):1690-9.

Mbongo N, Loiseau PM, Lawrence F, Craciunescu DG, Robert-Gero M. Uptake into *leishmania donovani* promastigotes and antileishmanial action of an organometallic complex derived from pentamidine. *Arzneimittelforschung* 1998;48(8):850-5.

McGhee RB, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev* 1980;44(1):140-73.

McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem* 1999;7(4):639-44.

Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Bashardost N, Ghassemi RL, Meghdadi M, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with itraconazole. Randomized double-blind study. *Arch Dermatol* 1996;132(7):784-6.

Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(8):2185-97.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366(9496):1561-77.

Nare B, Luba J, Hardy LW, Beverley S. New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. *Parasitology* 1997;114 Suppl:S101-10.

Olliaro PL, Bryceson AD. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today* 1993;9(9):323-8.

Olmo A, Arrebola R, Bernier V, Gonzalez-Pacanowska D, Ruiz-Perez LM. Co-existence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 1995;23(15):2856-64.

Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *Embo J* 1990;9(4):1027-33.

Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Int Health* 2001;6(11):874-82.

Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *Embo J* 1992;11(10):3601-8.

Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Ouellette M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltgpa* to oxyanion resistance. *J Biol Chem* 1994;269(16):11980-6.

Paredes R, Laguna F, Clotet B. Leishmaniasis in HIV-infected persons: a review. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 1997;3(6):22-39.

Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91(1):19-20.

Pathak MK, Yi T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol* 2001;167(6):3391-7.

Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(8):2397-403.

Petranyi G, Meingassner JG, Mieth H. Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1987;31(9):1365-8.

Pourshafie M, Morand S, Virion A, Rakotomanga M, Dupuy C, Loiseau PM. Cloning of S-adenosyl-L-methionine:C-24-Delta-sterol-methyltransferase (ERG6) from Leishmania donovani and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin B-Resistant promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(7):2409-14.

Prasad R, Kumar R, Jaiswal BP, Singh UK. Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. Indian J Pediatr 2004;71(2):143-4.

Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. Ann Trop Med Parasitol 2003;97 Suppl 1:17-28.

Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(7):2677-86.

Ravdin JJ. Protozoal Diseases. In: Mandell GMD, R.G.Jr.; Bennett, J.E., editor. Principles and Practice of Infectious Disease. New York: Churchill Livingstone; 1990. p. 2035-2130.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126(2):129-42.

Ryan KA, Dasgupta S, Beverley SM. Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene* 1993;131(1):145-50.

Ryder NS. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br J Dermatol* 1992;126 Suppl 39:2-7.

Saenz RE, Paz H, Berman JD. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* 1990;89(2):147-55.

Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 2003;22(4):380-7.

Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(7):2064-9.

Singh AK, Papadopoulou B, Ouellette M. Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*. *Exp Parasitol* 2001;99(3):141-7.

Steck EA. The leishmaniasis. *Prog Drug Res* 1974;18:289-351.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002;347(22):1739-46.

Thakur CP, Dedet JP, Narain S, Pratlong F. Leishmania species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95(2):187-9.

Urbina JA, Lazard K, Aguirre T, Piras MM, Piras R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(8):1237-42.

Urbina JA, Lazard K, Aguirre T, Piras MM, Piras R. Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195,739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(4):730-5.

Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 1997;114 Suppl:S91-9.

Urcuyo FG, Zaias N. Oral ketoconazole in the treatment of leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1982;21(7):414-6.

Van den Bossche H, Willemsens G, Cools W, Marichal P, Lauwers W. Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activity of N-substituted imidazoles and triazoles. *Biochem Soc Trans* 1983;11(6):665-7.

Walton BC. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: PETERS WK-K, R., editor. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press Inc; 1987. p. 637-664.

White JM, Salisbury JR, Jones J, Higgins EM, Vega-Lopez F. Cutaneous leishmaniasis: three children with *Leishmania major* successfully treated with itraconazole. *Pediatr Dermatol* 2006;23(1):78-80.

Weinrauch L, Livshin R, Even-Paz Z, El-On J. Efficacy of ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol Res* 1983;275(5):353-4.

Willians JE. Leishmania and Trypanosoma. In: Gillespie SHH, P.M., editor. *Medical Parasitology A Practical Approach*. New York: Oxford University Press; 1995. p. 151-176.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, et al. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 1996;24(9):1688-94.

Yaggi HK, Federman DG. Cutaneous leishmaniasis in an Italian woman: case report. *Conn Med* 2001;65(6):333-7.

Zeegelaar JE, Steketee WH, van Thiel PP, Wetsteyn JC, Kager PA, Faber WR. Changing pattern of imported cutaneous leishmaniasis in the Netherlands. *Clin Exp Dermatol* 2005;30(1):1-5.

Anexo I