

JULIANA IDE AOKI

Ação do análogo de purina tóxico tubercidina
em *Leishmania* spp.

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

Área de Concentração:
Fisiopatologia Experimental

Orientador:
Prof. Dr. Paulo César Cotrim

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Aoki, Juliana Ide

Ação do análogo de purina tóxico tubercidina em *Leishmania* spp. / Juliana Ide Aoki. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--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.

Descritores: 1.*Leishmania* 2.Tubercidina 3.Transfecção 4.Nucleosídeos de purina

USP/FM/SBD-213/08

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

Aos meus pais, Orlando e Madalena,
por tudo que sou, pelo exemplo de vida

e sobretudo, pelo amor e carinho.

Aos meus irmãos, Fábio e Danielle,

pelo amor e companheirismo.

Ao meu tio Miguel, pelo apoio irrestrito

durante toda a minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cotrim pela oportunidade e confiança dada para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e paciência transmitidos durante esses anos.

Ao Adriano Cappellazzo Coelho, pelos ensinamentos compartilhados, companheirismo e, principalmente, pela amizade.

À Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro pelo seu carinho, atenção, disponibilidade em ajudar e, principalmente, pela amizade.

Às minhas amigas e companheiras do Laboratório Luciana Aparecida Camizotti, Priscila Cristiane Appugliese de Larriccia, Sueli Fátima Bastos e Elizabete Ourique de Melo pelo companheirismo e pela amizade.

À todos os amigos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia que compartilharam momentos únicos durante essa jornada: Mussya, Luiza, Edna, Erika, Fábio, Fabrício, Célia, Márcia, Sandra, Prianti, Eduardo, Beatriz, Arnaldo, Priscila, Renata, Laísa, Mariko, Tacyana, Wesley, Camila, Fabiana, Melissa, Kelly, Sarita, Norival, Tatiane, Alex, Guita, Carmen, Walter e Sandra do Lago, pela amizade e convivência no dia-a-dia do laboratório.

À Profa. Dra. Hiro Goto e ao Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso pelas sugestões ao longo da realização deste trabalho.

Aos funcionários Eunice, Nilzete, Paulo Oliveira, Ione (*in memmorian*), Arthur, Renato e Genival pela disponibilidade em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, Claudia Barreto, Fábio e Érica do Departamento de Dermatologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por disponibilizar a utilização do seqüenciador.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade e Felipe Hermida do Laboratório de Protozoologia pelas sugestões e amizade.

À Profa. Lucile Maria Floeter-Winter pelos ensinamentos durante a realização do curso de pós-graduação.

À Profa. Márcia Regina Machado dos Santos da Universidade Bandeirantes pelos ensinamentos e sugestões.

À Profa. Maria Aparecida Basile pela atenção, orientação, carinho, amizade e, principalmente, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional durante o estágio PAE.

À secretária Gladis dos Santos do Departamento de Graduação de Moléstias Infecciosas pelas lições de vida, pelos momentos de bom humor e pela amizade.

Às secretárias Tânia e Sonia do Departamento de Pós-graduação Fisiopatologia Experimental e Sonia do CEDEM pela atenção e auxílio.

Às funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela atenção e auxílio.

Às minhas grandes amigas Fernanda, Mariana, Selma, Simone e Rose pelo apoio, paciência, amizade, dedicação e momentos de descontração.

À Irene, Suzana e Catarina, pelos poucos momentos de alegria, mas de grande valor.

Aos tios Arlindo, Teresa, Iolanda, Maria e Laura pelo grande incentivo e ensinamentos compartilhados.

À todos que encontrei pelo caminho e que entraram na minha história e me ensinaram a crescer.

À Deus, fonte eterna de luz, amor, fé e força. Por estar sempre comigo e por sempre me iluminar.

“ A felicidade não está no fim da jornada,
mas sim em cada curva do caminho
que percorremos para encontrá-la.”

Autor desconhecido

Sumário

Resumo

Abstract

Abreviaturas

Introdução _____	1
1.1. Ciclo Biológico _____	2
1.2. Formas clínicas da leishmaniose _____	3
1.3. Epidemiologia da leishmaniose _____	4
1.4. Tratamento da leishmaniose _____	4
1.5. Mecanismos de resistência _____	7
1.6. Metabolismo de purinas _____	11
Objetivos _____	17
Métodos _____	20
1. Organismos _____	20
2. Animais _____	20
3. Soluções e tampões _____	20
4. Meios de cultura _____	21
5. Compostos _____	21
6. Vetores _____	22
7. Cultivo de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. _____	22
8. Purificação de formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> _____	23

9. Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> _____	24
10. Efeito da associação TUB-NBMPR na evolução da lesão de leishmaniose cutânea em camundongo BALB/c _____	25
11. Mapeamento dos insertos dos cosmídios que conferem resistência a TUB _____	26
11.1. Transformação em bactérias competentes _____	26
11.2. Extração de DNA do cosmídio da cultura de <i>E. coli</i> _____	26
11.3. Digestão com enzimas de restrição _____	27
11.4. Eletroforese em gel de agarose _____	28
11.5. Obtenção das diferentes deleções dos cosmídios resistentes por digestão parcial e total _____	29
12. Análise funcional da ação dos fragmentos isolados _____	29
12.1. Transfecção por eletroporação em <i>L. (L.) major</i> _____	29
12.2. Análise das deleções dos cosmídios transfectados em presença dos compostos _____	30
12.3. Extração de DNA de cada cosmídio de <i>L. (L.) major</i> _____	31
13. Seqüenciamento de nucleotídeos do DNA dos insertos relacionados com resistência a TUB _____	32
Resultados _____	35
I. Identificação de dois <i>loci</i> de <i>L. (L.) major</i> relacionados com resistência a tubercidina _____	35

1. Identificação e caracterização do gene relacionado com resistência a TUB localizado no inserto cosTUB1 _____	35
1.1. Mapeamento do DNA do inserto cosTUB1 _____	35
1.2. Análise funcional do inserto cosTUB1 _____	38
1.3. Identificação e localização do inserto cosTUB1 no genoma de <i>L. (L.) major</i> _____	41
2. Identificação e caracterização do gene relacionado com resistência a TUB localizado com inserto cosTUB2 _____	44
2.1. Mapeamento do DNA do inserto cosTUB2 _____	45
2.2. Análise funcional do inserto cosTUB2 _____	47
2.3. Identificação e localização do inserto cosTUB2 no genoma de <i>L. (L.) major</i> _____	49
2.4. Papel da proteína hipotética '1' do cosTUB2 na relação com resistência a TUB _____	51
II. Eficácia de tubercidina com um inibidor do transporte de nucleosídeos de mamíferos em <i>Leishmania</i> spp. _____	55
1. Efeito de tubercidina e nitrobenziltioinosina em culturas de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. _____	56
2. Efeito da associação TUB-NBMPR em culturas de formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> _____	61
3. Efeito da associação TUB-NBMPR em interações macrófago – <i>L. (L.) amazonensis</i> _____	62

4. Efeito da associação TUB-NBMPR na evolução de leishmaniose cutânea em camundongo BALB/c _____	66
Discussão _____	70
Conclusões _____	84
Referências Bibliográficas _____	86
Anexo I _____	98
Anexo II _____	116

Resumo

Aoki J.I. Ação do análogo de purina tóxico tubercidina em *Leishmania* spp. (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.

A identificação de genes relacionados com resistência a compostos antiparasitários tem contribuído para um melhor entendimento do mecanismo de ação de alguns desses compostos. Utilizando a estratégia que permite a indução de super-expressão após transfecção gênica, isolamos dois *loci* relacionados com resistência ao análogo tóxico de purina, tubercidina (TUB). Em um desses *locus* identificamos um ortólogo do gene TOR (TOxic nucleoside Resistance) em *L. (L.) major* (*TOR-Lm*), capaz de conferir altos níveis de resistência a TUB. A identificação e localização cromossomal do segundo *locus* foi obtida, mas os testes funcionais em presença de TUB não foram tão significativos quanto os obtidos após a transfecção do *TOR-Lm*. Na segunda parte desta dissertação avaliamos a eficácia da associação de TUB com um inibidor específico do transporte de nucleosídeos em mamíferos, nitrobenziltioinosina (NBMPR), visando reverter a toxicidade de TUB apenas no hospedeiro. Demonstramos que TUB tem uma potente ação anti-parasitária em culturas de *Leishmania* spp., e que o inibidor NBMPR é capaz de proteger células mamíferas de camundongos infectados da ação tóxica de TUB.

Descritores: 1.*Leishmania* 2.Tubercidina 3.Transfecção 4.Nucleosídeos de purina

Abstract

Aoki J.I. Action of tubercidin a toxic purine analogue in *Leishmania* spp. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2008.

Gene identification associated with drug resistance has contributed to a better understanding of the mechanism of action of anti parasitic compounds. Using transfection and over-expression selection strategy we isolated two *loci* related with the resistance of tubercidin (TUB), a toxic analog purine. In the first *locus* we identified an ortholog of the *TOR* gene (TOxic nucleoside Resistance) in *L. (L.) major* (*TOR-Lm*), capable to render wild cells resistance to TUB after transfection and over-expression. Chromosomal location and identification of the second *locus* was done, but functional tests in the presence of TUB were not as significant as those obtained after *TOR-Lm* transfection. In the second part of this work, we evaluate the effectiveness of the association of TUB with an inhibitor specific to the mammals nucleoside transport, as nitrobenzylthioinosine (NBMPR), aimed at reversing the TUB toxicity only on the host. We first demonstrate that TUB has a potent anti-parasitic action in cultures of *Leishmania* spp. Then, we discuss the capacity of the NBMPR inhibitor to protect infected macrophages from the toxic effects of TUB.

Descriptors: 1. *Leishmania* 2. Tubercidin 3. Transfection 4. Purine nucleoside

Abreviaturas

ATP	adenosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EPB	tampão de eletroporação
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2- ácido etanosulfônico
IC ₅₀	concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%
kb	10 ³ pares de base
kDa	kilodalton
KV	kilovolt
L	litro
LB	Luria Bertani
LBA	LB acrescido de ampicilina
m	massa
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
NBMPR	nitrobenziltioinosina
pb	par de base
PEG	polietilenoglicol
PEN	pentamidina

RNase	ribonuclease
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
TEG	tampão Tris-EDTA-glicose
TOR	toxic nucleoside resistance
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TSB	tampão de transformação
TUB	tubercidina
U	unidade
UV	luz ultravioleta
v	volume
V	volt
μ F	microFaraday
μ L	microlitro
μ M	micromolar

Introdução

1. Introdução

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida (Rey, 2001). As principais características desta ordem são: presença de um ou dois flagelos que se originam de uma bolsa flagelar e presença de uma única mitocôndria contendo o cinetoplasto. O cinetoplasto é uma organela autoreplicável que contém DNA extranuclear e está localizado próximo ao flagelo. Os organismos da família Trypanosomatidae se reproduzem por divisão binária simples e podem ser monoxênicos, parasitando hospedeiros invertebrados, ou heteroxênicos, alternando seu ciclo de vida entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os hospedeiros invertebrados são os insetos flebotomíneos que pertencem ao gênero *Phlebotomus*, encontrados na África, Ásia e Europa; e ao gênero *Lutzomyia*, encontrado nas Américas (Rey, 2001).

Os protozoários causadores das leishmanioses caracterizam-se por apresentar duas formas morfológicamente distintas: amastigotas, quando os parasitas estão presentes no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado mamífero; e promastigotas quando se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota tem corpo circular, achatado, núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico. O cinetoplasto tem forma discóide e o flagelo encontra-se na invaginação da membrana, o bolso flagelar. A forma promastigota tem núcleo central e o cinetoplasto está

localizado na região anterior de onde também emerge o longo flagelo (Rey, 2001).

1.1. Ciclo Biológico

O ciclo biológico do parasita inicia-se quando insetos vetores picam um hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo assim formas amastigotas do parasita. No intestino médio do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, que ficam aderidas às microvilosidades do intestino do vetor para sua multiplicação. Após quatro a sete dias essas formas sofrem várias transformações, se desligam das microvilosidades e migram para o esôfago do inseto, onde então ocorre a transformação das promastigotas procíclicas para promastigotas metacíclicas. Na próxima picada, as formas promastigotas metacíclicas são então inoculadas no hospedeiro vertebrado. Estas sobrevivem aos mecanismos de defesa e infectam macrófagos. Nos macrófagos infectados, ocorre a formação do fagolisossomo, onde as promastigotas metacíclicas sobrevivem e diferenciam-se em formas amastigotas. Após a diferenciação, as amastigotas se multiplicam, rompem a membrana dos macrófagos e infectam novos macrófagos (Bates, 1994).

1.2. Formas clínicas da leishmaniose

As leishmanioses provocam lesões cutâneas, viscerais e nas mucosas devido ao acometimento do sistema fagocítico mononuclear. No homem, as formas de progressão da doença estão relacionadas com a espécie do parasita infectante e a susceptibilidade do hospedeiro, sendo atribuídas em quatro formas clínicas principais (Ashford, 2000; Rey, 2001; Singh, 2006):

- leishmaniose cutânea: produz lesões cutâneas, ulcerosas ou não. Geralmente é causada por *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* ou *L. (V.) shawi*;
- leishmaniose cutâneo-difusa: produz lesões cutâneas disseminadas, não ulcerativas, sendo causada por *L. (L.) aethiopica* ou *L. (L.) amazonensis*;
- leishmaniose mucosa: produz lesões ulcerosas destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe, sendo geralmente causada por *L. (V.) braziliensis*;
- leishmaniose visceral: caracteriza-se por infecção generalizada do sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides, podendo levar à morte se não tratado. É causada por *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* ou *L. (L.) chagasi*.

1.3. Epidemiologia da leishmaniose

Antigamente, as leishmanioses eram de caráter rural. Nos dias de hoje sua incidência em áreas urbanas tem aumentado, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos mais importantes problemas de saúde pública. As diferentes formas clínicas da leishmaniose estão distribuídas por todo o mundo, onde o número estimado de pessoas infectadas chega a 12 milhões. Além disso, cerca de 350 milhões de pessoas correm o risco de infecção. A incidência anual é estimada em 1-1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>).

Os casos de leishmanioses associados à infecção pelo HIV têm aumentado significativamente nos últimos anos. Na Europa, 25 a 70% dos casos de leishmaniose visceral estão relacionados com a AIDS. A maioria dos casos de co-infecção da América do Sul ocorre no Brasil, com cerca de doze casos a cada 100.000 habitantes (Cruz et al., 2006).

1.4. Tratamento da leishmaniose

O principal tratamento das infecções causadas por este parasita foi desenvolvido há mais de 50 anos, baseado principalmente no uso de antimoniais trivalentes (SbIII). O uso de SbIII foi substituído pelo emprego dos antimoniais pentavalentes (SbV), mais eficientes e menos tóxicos ao paciente (Steck, 1974). As formulações dos SbV mais utilizadas são

antimoniato de meglumine (glucantime®) e estibogluconato de sódio (pentostan®), que até hoje representam as drogas de primeira escolha na terapêutica para a leishmaniose (Rey, 2001; Murray et al., 2005). Estes compostos apresentam uma série de efeitos colaterais, seu tratamento é longo e são administrados via intramuscular ou intravenosa (Murray et al., 2005). O alto grau de toxicidade destes compostos deve-se a altas concentrações utilizadas no tratamento atual (cerca de 4 vezes maiores que há 20 anos atrás), decorrentes de casos de resistência adquirido pelo parasita como resultado de exposição descontínua à droga e dosagens inadequadas.

O mecanismo de ação dos compostos antimoniais ainda não está bem estabelecido. Alguns estudos mostraram que SbIII está relacionado com a alteração do potencial redox de tióis do parasita. Esta alteração ocorreria por indução do efluxo de tióis e por inibição da enzima tripanotiona redutase (Wyllie et al., 2004). Para atuar contra a forma amastigota do parasita, o SbV deve entrar na célula hospedeira e atravessar a membrana do fagolisossomo. Além disso, se faz necessário que o SbV seja convertido para forma trivalente para ser ativo contra o parasita. O mecanismo e o local exato desta conversão ainda não estão claros (Ouellette et al., 2004).

Devido ao aparecimento de parasitas resistentes à terapêutica antimonial, outros compostos vêm sendo utilizados como segunda linha de tratamento para a leishmaniose, como a anfotericina B e a pentamidina (Ashford, 2000). Porém, o tratamento com estes fármacos também apresenta efeitos colaterais, muitas vezes, restringindo sua utilização (Freire

et al., 1997; Aggarwal et al., 1999). O mecanismo de ação da anfotericina B se dá pela interação com a molécula de ergosterol, formando poros na membrana plasmática, alterando o equilíbrio iônico e conseqüentemente induzindo a morte da célula (Roberts et al., 2003).

A pentamidina (PEN), uma diamidina aromática, é utilizada principalmente no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea, geralmente em casos refratários ao tratamento com SbV (Olliaro e Bryceson, 1993; Croft et al., 2006). O mecanismo de ação da droga é pouco conhecido. A entrada de PEN na célula ocorre através de um transportador de PEN de alta afinidade, cuja entrada não é inibida por metabólitos como poliaminas, aminoácidos, nucleosídeos e nucleobases, dentre outros (Basselin et al., 2002; Bray et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que a mitocôndria é um importante alvo de ação da PEN em *Leishmania*, ocorrendo alterações no potencial de membrana mitocondrial em mutantes resistentes à droga (Basselin et al., 2002; Mukherjee et al., 2006).

Um novo composto como droga de uso oral, tornou-se recentemente uma alternativa interessante para o tratamento da leishmaniose visceral, a miltefosine, uma alquilfosfocolina originalmente desenvolvida como droga anticâncer (Sundar et al., 2006; Croft et al., 2003). Estudos demonstraram que na Índia, mais de 95% dos pacientes com leishmaniose visceral foram curados após o tratamento com miltefosine. Na Colômbia, o tratamento de leishmaniose cutânea resultou em 91% de cura. Já na Guatemala, somente 53% dos pacientes tratados com miltefosine tiveram cura da lesão. Esta variação possivelmente é devido às diferenças entre as espécies, sendo que

na Colômbia a principal espécie é *L. (L.) panamensis*, na Guatemala *L. (V.) braziliensis* e na Índia *L. (L.) donovani* (Soto et al., 2004; Soto e Soto, 2006). Minodier et al. (2005) indicam que o uso de miltefosine por via oral é bastante promissor na Índia, mas não parece eficaz para o tratamento das leishmanioses da América do Sul. O mecanismo de ação deste composto em *Leishmania* ainda não está bem determinado, mas parece estar relacionado à inibição da síntese de fosfatidilcolina, à interferência na transdução de sinal e na homeostase de cálcio (Croft e Coombs, 2003).

Os dados apresentados demonstram a necessidade de se buscar melhorias nas formas de tratamento das leishmanioses. Muitas das drogas utilizadas foram descobertas de forma empírica, ou seja, sem a compreensão exata do mecanismo de ação, bem como dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelo parasita. Diante destes fatos surge a necessidade de se pesquisar novas abordagens terapêuticas. O estudo dos aspectos moleculares e bioquímicos relacionados com resistência às drogas é um campo promissor para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação de muitos compostos (Croft, 2001; Ouellette, 2001).

1.5. Mecanismos de resistência

Os protozoários são capazes de desenvolver resistência às drogas utilizadas contra eles. A resistência a uma droga pode ser mediada por: inibição do influxo da droga, aumento do efluxo, sua inativação, mecanismos de competição pelo substrato, alteração do alvo ou aumento do reparo de

danos causados. A resistência pode ainda estar relacionada com a adaptabilidade genética destes organismos de amplificação gênica e a conseqüente super-expressão do produto codificado, ou ainda de amplificação de um gene que codifica uma proteína capaz de transportar a droga (Borst e Ouellette, 1995).

Em *Leishmania*, a amplificação gênica constitui um importante mecanismo relacionado com células resistentes às drogas (Beverley, 1991; Ouellette e Borst, 1991; Segovia, 1994; Borst, Ouellette, 1995). Os produtos oriundos da amplificação de DNA apresentam-se em múltiplas cópias de DNAs extra-cromossomais lineares e/ou circulares, que constituem 5 a 10% do DNA genômico total (Coderre et al., 1983; Beverley et al., 1984; Olmo et al., 1995). Entre as amplificações pela presença de drogas específicas podemos citar as regiões R e H de *L. (L.) major*. A região R contém, entre outros, o gene da Dihidrofolato Redutase Timidilato Sintetase (DHFRTS) (Beverley et al., 1984). Já a região H contém o gene da Pteridina Redutase (PTR1), que foi caracterizado utilizando técnicas de transfecção gênica (Callahan e Beverley, 1992; Bello et al., 1994). Ambos os genes são capazes de conferir resistência ao metotrexato quando amplificados seu número de cópias e super-expressos.

A genética reversa em *Leishmania* spp. está bem estabelecida e caracteriza-se principalmente por um protocolo de transfecção (Kapler et al., 1990; Cruz e Beverley, 1990). Este estudo é possível através do uso de técnicas moleculares de transfecção gênica que utilizam vetores capazes de se propagar tanto no parasita, quanto em prófagos (shuttle vectors). Um

exemplo de 'shuttle vector' é o cLHYG que aceita fragmentos clonados de DNA genômico de *Leishmania* de até 40 kb e que se replica extracromossomalmente após transfecção gênica, além de poder ser induzido a amplificar seu número de cópias (Le Bowitz et al., 1990; Ryan et al., 1993; Descoteaux et al., 1994).

Utilizando esta abordagem, Cotrim et al. (1999) demonstraram que ao transfectar uma genoteca de DNA de *L. (L.) major* construída neste vetor, poderia ser isolado um cosmídio que contém um gene que codifica para uma proteína cuja super-expressão confere resistência a um determinado composto anti-parasitário. A seleção de cosmídios foi feita plaqueando-se parasitas transfectados com a genoteca em presença de altas concentrações do composto em estudo. Em seguida, o parasita isolado contendo o cosmídio que confere resistência foi testado. A construção da genoteca descrita neste trabalho foi constituída por DNA genômico de *L. (L.) major* da cepa Friedlin V1 (virulenta) transfectado em parasitas selvagens da cepa A1 (avirulenta) (Descoteaux et al., 1994 e Ryan et al., 1993). Foram obtidos 17.900 recombinantes com cerca de 40 kb de inserto cada um. A amplificação do seu número de cópias foi feita através de sucessivas passagens em concentrações crescentes do marcador seletivo higromicina B (HYG), que induz à amplificação da região que confere resistência à HYG e conseqüentemente à amplificação da região que confere resistência à droga em estudo. E, por conseguinte, uma super-expressão de determinada proteína que confere resistência a um determinado composto antiparasitário.

A viabilidade deste protocolo foi confirmada isolando cosmídios que contenham genes sabidamente conhecidos e que geram resistência via amplificação gênica. Um exemplo é o gene *TOR* (TOxic nucleoside Resistance) de DNA amplificado de *L. (L.) amazonensis* resistente ao análogo purínico, tubercidina (TUB), que reduz a capacidade de transporte de purinas (Detke, 1997). A resistência a TUB ocorreu pelo redirecionamento da permease adenosina da membrana plasmática para o túbulo multivesicular. Assim, as células tornaram-se resistente a TUB pela perda da capacidade de captar e acumular esta purina tóxica (Detke, 2007).

Além do gene *TOR*, mutações no gene de um transportador de nucleosídeos também conferem resistência a TUB (Vansudevan et al., 2001). Uma mutação no transportador de *L. donovani* (LdNT1) alterou o transporte de adenosina e pirimidina. Já uma mutação no transportador LdNT2 alterou o transporte de inosina e guanina. Desde que os transportadores de purinas mediam a captação de várias drogas antiparasitárias, a alteração ou perda da função transportadora pode induzir resistência a estes agentes terapêuticos.

Acreditamos que, estudos com cosmídios resistentes a TUB, poderão contribuir para um melhor entendimento da biossíntese de purinas do parasita. Assim, na primeira parte dessa dissertação, pretendemos identificar os dois *loci* de *L. (L.) major* capazes de conferir resistência ao análogo de purina, tubercidina.

1.6. Metabolismo de purinas

Uma abordagem racional de desenvolvimento de drogas baseia-se na identificação de vias metabólicas indispensáveis à sobrevivência do parasita. Talvez a diferença metabólica mais marcante entre o parasita e seu hospedeiro mamífero esteja na cadeia de síntese de purino-nucleotídeos (Hochstadt, 1978). Em células de mamíferos, purino e pirimidino-nucleotídeos podem ser sintetizados a partir de duas vias. A via *de novo* (Fig. 1) envolve reações enzimáticas a partir de precursores mononucleotídeos. Estas reações resultam na síntese do anel purínico e a formação de inosina monofosfato (IMP), que por sua vez, é convertido em adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP).

Estas reações são catalisadas em mamíferos por enzimas distintas: adenina-fosforribosil-transferase (APRT), hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) e xantina-fosforribosil-transferase (XPRT).

Os parasitas são auxotróficos para purino-nucleotídeos. Em consequência, cada gênero desenvolveu um conjunto específico de enzimas (Fig. 2) que o permite utilizar purinas pré-formadas adquiridas do hospedeiro. Características únicas que constituem a base para a susceptibilidade destes parasitas frente aos análogos purino-nucleotídeos (Hochstadt, 1978; Ullman e Carter, 1995).

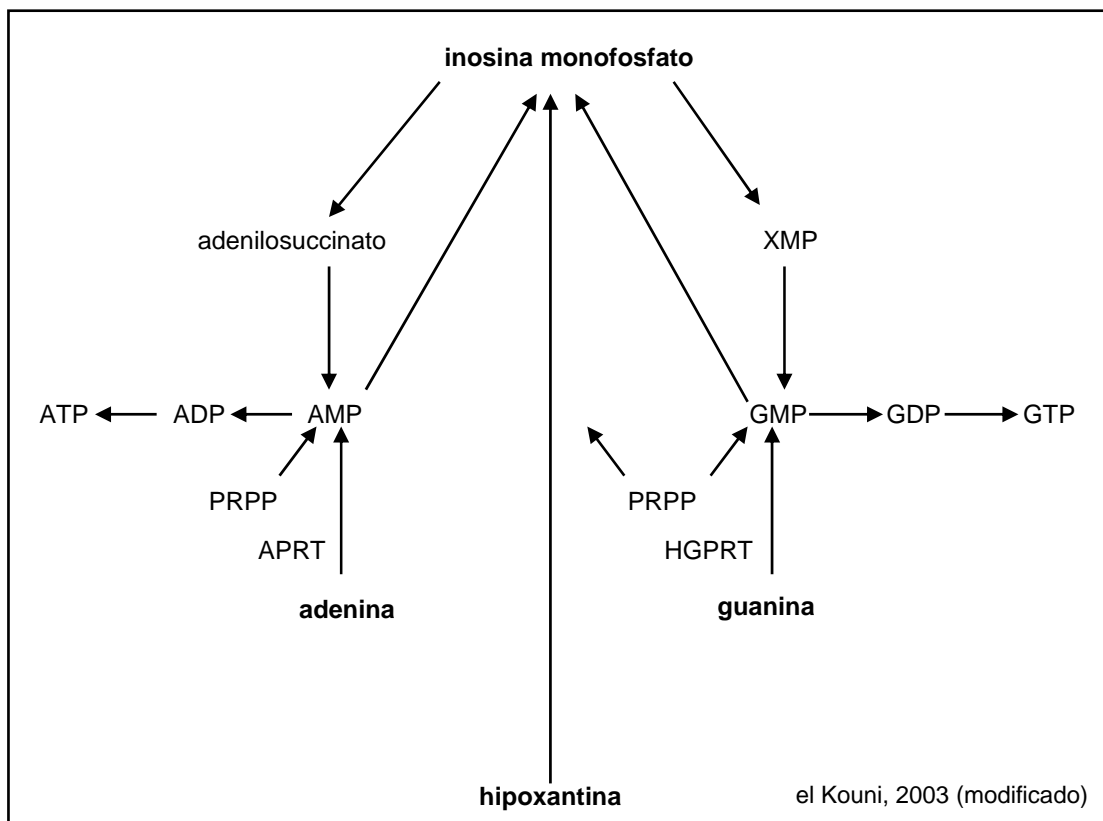


Figura 1. Resumo da via *de novo* em células mamíferas. (AMP) adenina-monofosfato, (GMP) guanina-monofosfato, (APRT) adenina-foforribosil-transferase, (HGPRT) hipoxantina-guanina-foforribosil-transferase, (PRPP) 5'-foforribosil-transferase-1-pirofosfato.

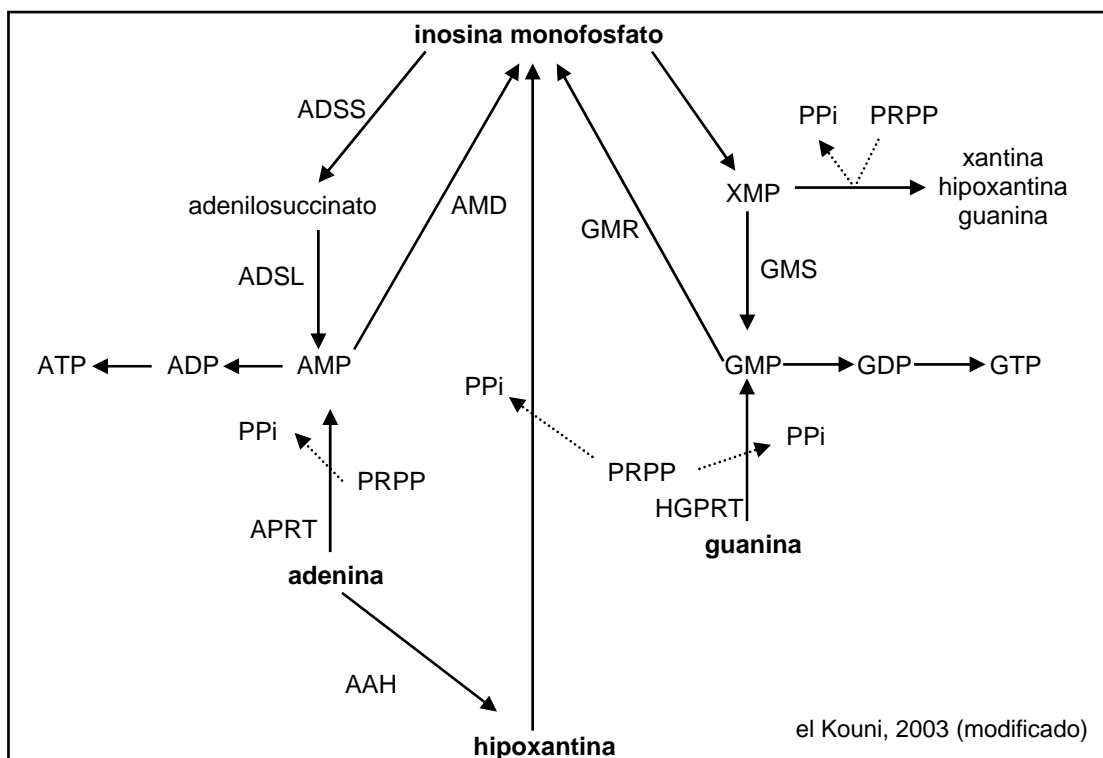


Figura 2. Resumo da via *salvage* em células de Kinetoplastida. (AMP) adenina-monofosfato, (GMP) guanina-monofosfato, (XMP) xantina monofosfato, (APRT) adenina-foforribosil-transferase, (HGPRT) hipoxantina-guanina-foforribosil-transferase, (PRPP) 5'-foforribosil-transferase-1-pirofosfato, (ADSS) adenilossuccinato-sintetase, (ADSL) adenilossuccinato-liase, (AAH) adenina-deaminase, (PPi) pirofosfato, (GMS) guanina-monofosfato-sintetase, (GMR) guanina-monofosfato-dehidrogenase.

A aquisição de purinas pelo parasita é iniciada pela translocação de purinas extracelulares através de membranas de superfície do parasita, um processo que é mediado pelos transportadores de nucleotídeos. Os transportadores de nucleotídeos estão localizados na membrana plasmática e são regulados durante o crescimento celular e pelos substratos das permeases. A regulação destes transportadores ocorre via *salvage*, já que os parasitas da família Kinetoplastidae não sintetizam purinas pelo metabolismo *de novo* (Landfear et al., 2004).

Primeiramente foram descritos os transportadores de nucleosídeos de *L. donovani*, LdNT1.1 e LdNT1.2 (Vasudevan et al., 2001). Ambos mediam a captação de adenosina e pirimidina, apresentam-se como membros da família de transportadores equilibrados de nucleosídeos (ENTs) e com aproximadamente 30% de identidade com ENTs de mamíferos (Landfear, 2004). Esta baixa porcentagem de identidade demonstra a divergência entre a família ENT na distribuição filogenética dos organismos (Griffiths et al., 1997). Mais tarde foi descrito LmaNT3, um transportador de nucleosídeos de *L. major* com 33% de similaridade na seqüência com LdNT1.1. Estudos funcionais com LmaNT3 revelaram que este transporta hipoxantina, xantina, adenina e guanina (Sanchez et al., 2004). Estes dados concluem que entre a família de transportadores equilibrados de nucleosídeos os substratos transportados são diferentes e seletivos (Sanchez et al., 2004).

Hyde et al. (2001) sustenta a idéia que dentre as grande e importantes diferenças entre ENTs de *Leishmania* e seus homólogos de mamíferos devem-se a alta afinidade competitiva com inibidores de nucleosídeos de

mamíferos e não com inibidores de protozoários. A seletividade de inibidores de transporte de nucleosídeos de mamíferos já foi descrito em *Shistosoma* e *Trypanosoma gambiensi*. Um exemplo de inibidor é a nitrobenziltioinosina (NBMPR). A co-administração de NBMPR com um análogo de purina tóxico (tubercidina – TUB) causou seletividade apenas para *Schistosoma* (el Kouni et al, 1987) e para *Trypanosoma gambiensi* (Ogbunude e Ikediobi, 1982).

TUB é de estrutura muito similar a da adenosina (Zimmerman et al., 1978), o que possibilita sua incorporação no ácido nucléico de microrganismos e células mamíferas. Porém é responsável por vários efeitos citotóxicos, como inibição da síntese de DNA, inibição do reparo de DNA e acúmulo na fita de DNA (Robak et al., 2005).

TUB já foi descrito como o melhor análogo purínico contra a esquistossomose pelos seus efeitos na separação dos pares de vermes adultos e diminuição da ovogênese do parasita (el Kouni et al., 1983). Apesar destes resultados poucos análogos purínicos têm sido usados como terapia devida sua alta toxicidade para o hospedeiro. Para diminuir a toxicidade deste composto, Kouni et al. (1985 e 1991) propuseram a associação de TUB com o NBMPR. Este inibidor liga-se, de maneira reversível, apenas aos sítios de transporte de nucleosídeos de células mamíferas, protegendo-as assim da ação tóxica de TUB e, portanto, não interferindo na ação antiparasitária de TUB. Ogbunude e Ikediobi (1982) também demonstraram a eficiência desta associação em *Trypanosoma gambiense*. A combinação dos dois compostos protegeu os camundongos

dos efeitos tóxicos de TUB e inibiu o crescimento dos parasitas no sangue de camundongos infectados.

Ainda não se tem nada descrito em relação à combinação destes dois compostos contra parasitas intracelulares, como *Leishmania*. Assim, em uma segunda parte dessa dissertação, pretendemos demonstrar a eficácia da associação TUB-NBMPR em *Leishmania*.

Objetivos

Estamos propondo para essa dissertação, a identificação e caracterização de dois *loci* que estão relacionados com resistência ao análogo de purina, tubercidina (TUB), em promastigotas de *L. (L.) major*, visando um melhor entendimento do mecanismo de ação de purinas no parasita. E em uma segunda parte dessa dissertação, também avaliar a eficácia da ação antiparasitária de TUB em associação com um inibidor do transporte de nucleosídeos de mamíferos, nitrobenziltionosina (NBMPR), em experimentos *in vitro* e em infecções *in vivo*.

Objetivos específicos:

- 1 – Mapeamento dos insertos de *L. (L.) major* presentes nos dois cosmídios relacionados com resistência a TUB;
- 2 – Obtenção de diferentes deleções a partir dos insertos dos cosmídios resistentes a TUB;
- 3 – Análise do papel das deleções obtidas na resistência a TUB após transfecção em parasitas selvagens de *L. (L.) major* na presença de TUB;
- 4 – Subclonagem, seqüenciamento de nucleotídeos e identificação dos *loci* / genes relacionados com a resistência a TUB;
- 5 – Análise da associação TUB-NBMPR em culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major*;
- 6 – Análise da associação TUB-NBMPR em culturas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*;

7 – Análise da associação TUB-NBMPR em interações macrófagos – *L. (L.) amazonensis*;

8 – Análise da associação TUB-NBMPR na evolução da lesão de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c.

Métodos

1. Organismos

Leishmania (Leishmania) amazonensis (WHO/BR/00/LT0016)

Leishmania (Viannia) braziliensis (MHO/BR/75/M2903)

Leishmania (Leishmania) chagasi (MHOM/BR/72/strain46)

Leishmania (Leishmania) major (MHOM/1L/80/Friedlin)

Escherichia coli (DH5 α)

2. Animais

Camundongos da linhagem BALB/c com 45 a 60 dias de idade, de ambos os sexos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em gaiolas, recebendo água à vontade e ração *Purina*. Os protocolos para uso de animais deste trabalho estão sob aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. Soluções, tampões

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

Tris acetato 40 mM; EDTA 2 mM (TAE 1X).

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

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

4. Meios de cultura

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

LBA: LB acrescido de ampicilina 100 µg/mL.

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

M199 (GIBCO) suplementado: com adição de 10% de soro fetal bovino, previamente inativado a 56°C por uma hora; 2% de urina humana (Singh et al., 2000); adenina 100 µM; HEPES 40 mM (pH 7,4); hemina 10 µg/mL; penicilina 50 U/mL; estreptomicina 50 µg/mL; biotina 4 µM. Esterilizado por filtração.

5. Compostos

Tubercidina (TUB) - Sigma-Aldrich (St Louis, Mo - EUA).

Nitrobenziltioinosina (NBMPR) - Sigma-Aldrich (St Louis, Mo – EUA).

Glucantime – cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Ângelo Lauletta Lindoso.

6. Vetores

Os vetores utilizados foram os “shuttle vectors”, cLHYG e pSNBR, que permitem o crescimento tanto em *Leishmania ssp.*, como em *Escherichia coli* (Ryan et al., 1993). Estes dois vetores possuem como marcadores seletivos os genes que conferem resistência a higromicina B (HYG) e neomicina/G-418 (NEO), respectivamente. Além disso, são capazes de replicar-se extracromossalmente no parasita após transfecção, e ainda possuem a capacidade de serem induzidos artificialmente a amplificar o número de cópias de seu DNA através de passagens sucessivas em meio seletivo contendo concentrações crescentes (25 a 500 µg/mL) do respectivo antibiótico (Kapler et al., 1990; LeBowitz et al., 1990 e Ryan et al., 1993). Ambos os vetores contêm uma origem de replicação e um gene marcador de resistência a ampicilina para propagação em *E. coli*.

7. Cultivo de promastigotas de *Leishmania spp.*

Todas as espécies foram cultivadas *in vitro* em meio M199 (GIBCO) suplementado e incubadas em estufa B.O.D a 26°C até atingirem o início da fase estacionária (cerca de três dias), quando então, foram repicadas através de passagem em meio novo, na diluição 1:100.

A análise da inibição de crescimento dos parasitas foi realizada com a determinação do número de células viáveis, onde cerca de 1×10^6 células mantidas em cultura, conforme já descrito anteriormente, foram incubadas

separadamente em placas de 24 poços (Costar – Corning) em presença de concentrações crescentes de TUB (0 a 1,88 μM) e NBMPR (0 a 4 μM) em estufa B.O.D. a 26°C. Após o período de incubação (72 horas), retirou-se uma alíquota da cultura (135 μL) e esta foi contada em câmara de Neubauer ou no contador de células Coulter T890, adaptado a quantificar formas promastigotas de *Leishmania*.

8. Purificação de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Formas amastigotas foram obtidas a partir de lesão de patas de camundongos infectados com 1×10^7 amastigotas purificadas de *L. (L.) amazonensis*. Após cerca de quatro semanas de infecção os animais foram sacrificados para retirada da pata com lesão. A pele foi removida e o tecido remanescente foi homogenizado em meio M199 contendo 10% de soro fetal bovino. A suspensão foi centrifugada a 3077xg por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante restaram-se apenas as amastigotas purificadas - livres de contaminação por outras células (Pereira et al., 2005; Barbieri et al., 1993). A análise do efeito antiparasitário foi realizada em condições onde estas amastigotas purificadas fossem capazes de se diferenciarem em formas promastigotas (Kayser, 2000). A contagem foi feita em câmara de Neubauer e o IC_{50} foi calculado como descrito anteriormente.

9. Cultura de macrófagos peritoneais de camundongo infectados com *L. (L.) amazonensis*

Camundongos BALB/c foram sacrificados para a retirada de macrófagos de seu peritônio. Cerca de 5 mL de meio RPMI 1640 gelado foi injetado no peritônio e em seguida aspirado. A viabilidade celular foi avaliada com o corante vital Trypan Blue na diluição 1:1.

Cerca de 5×10^5 macrófagos foram incubados em lamínulas estéreis de 13mm de diâmetro dentro de placas de 24 poços (Costar-Corning) e incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂ para aderência. Após a retirada de células não aderentes a cultura foi infectada com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, na concentração de 5 parasitas para cada macrófago e então incubada por mais 24 horas (Berman, 1983), em estufa a 32°C com 5% de CO₂. Após a confirmação da infecção foram feitos os ensaios com concentrações crescentes de TUB e NBMPR individualmente (1 a 8 µM) e em associação TUB-NBMPR (1 a 8 µM e 2 a 16 µM, respectivamente).

A avaliação deste experimento foi determinada por contagem de 200 células coradas com Giemsa, em experimentos em triplicata. A porcentagem de macrófagos infectados foi calculada em relação ao número de macrófagos infectados pelo total de macrófagos (x100). O número de parasitas por macrófago foi determinado em relação ao número de parasitas pelo número total de macrófagos infectados. E o índice de associação foi

determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitas por células infectadas (Rosa et al., 2003).

10. Efeito da associação TUB-NBMPR na evolução da lesão de leishmaniose cutânea em camundongo BALB/c

Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^7 formas amastigotas purificadas de *L. (L.) amazonensis* em 100 μ L de M199 na pata traseira direita e o mesmo volume de apenas M199 foi inoculado na pata traseira esquerda. Ficaram em observação por 30 dias para progressão da doença. Após este período, os animais foram divididos em quatro grupos para o início do tratamento de sete doses intraperitoneais diárias. O primeiro grupo recebeu (controle) recebeu doses de solução salina, o segundo grupo recebeu doses de TUB (5mg/kg), o terceiro grupo recebeu doses de NBMPR (15mg/kg), e por fim o quarto grupo recebeu doses de TUB (5mg/kg) em associação de NBMPR (15mg/kg). A evolução da lesão foi monitorada no primeiro e no sétimo dia de tratamento com a medição da espessura da pata com o paquímetro (Mitutoyo-Japão). Os resultados foram expressos como aumento da pata após o tratamento em comparação com o volume inicial. O resultado final foi obtido pela subtração da espessura da pata com inoculação de parasitas da espessura da pata controle (M199) (Pereira et al., 2004).

11. Mapeamento dos insertos dos cosmídios que conferem resistência a TUB

11.1. Transformação em bactérias competentes

O processo utilizado foi baseado no protocolo descrito por Chung e Miler (1988) com algumas modificações. A bactéria utilizada foi a *E. coli* (DH5 α). A partir de um pré-inóculo de uma colônia da bactéria em 5 mL de meio LB, incubada a 37°C sob agitação constante por cerca de 12 horas, a cultura foi diluída 1/100 em LB. Após mais 2 horas de incubação nas mesmas condições, esta nova cultura foi centrifugada a 1202xg por 10 minutos a 4°C e ressuspensa em 1/10 do volume total com TSB gelado. Cerca de 100 μ L desta suspensão bacteriana foi adicionada a cerca de 10 ng do DNA a ser transformado e mantida no gelo por um período de 30 minutos. Depois foi adicionado 900 μ L de TSB glicose e incubando por 2 horas a 37°C sob agitação constante. Após a centrifugação da cultura a 2655xg por 1 minuto, esta foi plaqueada em placa de petri contendo LBA sólido e incubada por cerca de 12 horas em estufa 37°C.

11.2. Extração de DNA do cosmídio da cultura de *E. coli*

Após a transformação, algumas colônias contendo a construção de interesse foram isoladas e transferidas para 3,5 mL de meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina. Após incubação de 12 horas a 37°C sob

agitação constante o DNA do cosmídio foi isolado através de uma variação do método alcalino/SDS descrito por Birboium e Doly (1979). Após centrifugação a 3077xg por 10 minutos, as células foram ressuspensas em 100 µL de solução Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM (pH 8,0) e glicose 50 mM para quebrar a parede bacteriana e liberar as moléculas de DNA. Para completar a lise e separar o DNA cromossomal bacteriano das moléculas de ácido nucléicos menores, foi adicionado 200 µL de NaOH 0,2 M e SDS 1%. O DNA cromossomal foi precipitado após tratamento com 200 µL de ácido acético glacial 6M e acetato de potássio 3 M por 25 minutos no gelo seguido de centrifugação (17949xg à 13°C por 10 minutos). O DNA precipitado foi lavado com 300 µL de isopropanol seguido de nova centrifugação, lavado novamente com 500 µL de etanol 70% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi removido e o DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente. Após este período, o DNA foi finalmente ressuspenso em 40 µL de TE RNase para a eliminação do RNA bacteriano.

11.3. Digestão com enzimas de restrição

Uma vez isolados, os DNAs dos cosmídios foram submetidos a digestões com uma série de enzimas de restrição para verificar qual a melhor deleção que se adapta ao inserto. Essas enzimas tem que ter, de preferência, sítios no interior do inserto e não no DNA do vetor cLHYG, ou que apresente apenas um sítio no interior do DNA do vetor localizado em

regiões que mantenham a sua viabilidade, como: *Apal*, *EcoRV*, *SmaI*, *XbaI*, *KpnI*, *SpeI*, *HindIII*, *BamHI*.

Para cada enzima, foi utilizado o DNA do cosmídio com o respectivo inserto diluído em tampão específico para cada enzima e incubado a sua respectiva temperatura por um período de 4 horas. Digestões duplas foram processadas nas mesmas condições descritas acima, porém foi utilizado um tampão compatível para as duas enzimas selecionadas. Os DNAs digeridos com as enzimas selecionadas foram analisados através de uma eletroforese em gel de agarose.

11.4. Eletroforese em gel de agarose

Utilizamos agarose 0,8% dissolvida em tampão de corrida TAE 1X. À todas as amostras foi adicionado tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e glicerol 20%). O padrão de peso molecular utilizado foi o DNA do fago λ digerido com *HindIII*, apresentando os seguintes fragmentos de DNA em quilobase (kb): 23 – 9,4 – 6,5 – 4,4 – 2,3 – 2,0 – 0,5. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem e tempo de acordo com o produto a ser analisado. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) durante 15 minutos ao abrigo da luz. O padrão de bandas obtido foi analisado em transiluminador sob fonte de luz ultravioleta (UV).

11.5. Obtenção das diferentes deleções dos cosmídios resistentes por digestão parcial e total

Depois de determinada a enzima de restrição que melhor se adaptou a cada um dos insertos selecionados, foram realizadas digestões parciais, onde cada DNA foi digerido parcialmente em diferentes tempos (0; 1; 2,5; 5; 10; 20 e 30 minutos) com a enzima escolhida .

A amostra correspondente ao melhor intervalo de tempo foi usada para reação de ligação dos fragmentos em presença de enzima T4 DNA Ligase para a obtenção das mais variadas formas de ligantes. Após a reação, realizamos a transformação do produto de ligação, conforme descrito anteriormente.

12. Análise funcional da ação dos fragmentos isolados

12.1. Transfecção por eletroporação em *L. (L.) major*

Os parasitas na forma promastigota de *L. (L.) major* foram submetidos a eletroporação, segundo protocolo descrito por Beverley e Clayton, 1979; Kapler et al., 1990 e Descoteaux et al., 1994. Para cada transfecção gênica foram utilizadas 4×10^7 células em fase logarítmica de crescimento, e 10-20 µg de DNA a ser transfectado. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1202xg e o sedimento celular ressuspenso em 10 mL de EPB. A centrifugação foi repetida e o sedimento celular ressuspenso novamente

com EPB. Desta suspensão celular foram transferidos 0,8 mL para cada cubeta de transfecção (0,8 cm³ - BioRad) já contendo o DNA a ser transfectado. Os parasitas foram submetidos a eletroporação com regulagem para voltagem e capacitância de 500 KV/cm e 500 µF, respectivamente (Gene Pulser II, BioRad). Após 10 minutos de incubação no gelo, os parasitas foram transferidos para um frasco de cultura de células contendo 10mL de meio M199 e incubados por 24 horas a 26°C. Após este período de incubação, os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 1202xg. O sobrenadante descartado e o sedimento celular foi ressuspensão com o sobrenadante residual. As células ressuspensas foram transferidas para 10 mL de meio M199 contendo a droga de seleção (25 µg/mL), de acordo com o vetor utilizado.

12.2. Análise das deleções dos cosmídios transfectados em presença dos compostos

Após o isolamento das células transfectadas, as linhagens celulares obtidas foram incubadas em presença de concentrações crescentes de TUB e de NBMPR (0,1 a 1,8 µM) para avaliar se as deleções em questão apresentam níveis significantes de resistência à droga em estudo. Para a análise da associação de TUB-NBMPR, foram utilizadas concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 µM) mais concentração constante de NBMPR (4 µM).

Para estes experimentos as culturas foram preparadas conforme já descritas anteriormente no item 7.

Os valores de IC₅₀ (concentração de droga necessária para inibir 50% do crescimento celular) foram determinados a partir do gráfico de inibição do crescimento obtido em cada cultura realizada. O cálculo foi feito diretamente na curva obtida, relacionando o ponto correspondente a 50% do total de células (eixo Y) com a concentração da droga correspondente (eixo X).

12.3. Extração de DNA de cada cosmídio de *L. (L.) major*

Para a confirmação do DNA transfetado em células selvagens, este foi extraído segundo protocolo descrito por Ryan et al., 1993; Descoteaux et al., 1994.

Cerca de 2×10^8 células foi centrifugada por 10 minutos a 3077xg a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular transferido para um tubo de microcentrífuga para nova centrifugação a fim de retirar qualquer resíduo de meio de cultura. Foi ressuspenso em 100 μ L de TrisHCl 25 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM (pH 8,0) e glicose 50 mM por 5 minutos, e em 200 μ L de NaOH 0,2 M; SDS 1% por 30 minutos no gelo. A seguir, 150 μ L de solução de acetato de sódio 3 M (pH 4,8) foi adicionado, incubando-se no gelo por mais 5 minutos. Esta solução foi centrifugada a 17949xg a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA do cosmídio foi transferido para um novo tubo com 400 μ L de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado a 17949xg por 5

minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo contendo 500 µL de etanol 100% e incubada a -20°C por 30 minutos. A seguir, esta solução foi centrifugada por 10 minutos a 17949xg a 4°C. O sobrenadante foi removido e o DNA precipitado foi seco em estufa a 42°C. Após a secagem, foi ressuspenso em 40 µL de TE RNase e incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 50 µL de NaCl 0,8 M; PEG (PM 8000) 13% (m/v) e incubado no gelo por 2 horas. Após a incubação foi submetido à centrifugação a 17949xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 500 µL de etanol 70%. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente. E, por fim, ressuspenso em 20 µL de TE.

13. Seqüenciamento de nucleotídeos do DNA dos insertos relacionados com a resistência a TUB

O seqüenciamento foi processado em seqüenciador automático modelo Mega BACE 1000 em conjunto com o kit DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare), que utiliza processos de química fluorescente para a leitura dos resultados. As condições de reação foram fornecidas pelo fabricante e o método de seqüenciamento segue o processo clássico dos dideoxirribonucleotídeos (ddNTP) descrito originalmente por Sanger et al., 1977.

A análise das seqüências foi feita utilizando os programas DNASTar e Clone Manager 6TM em associação com análises comparativas no GenBank

através do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), bem como no GenDB - Sanger Institute (<http://www.genedb.org>).

Resultados

I. Identificação de dois *loci* de *L. (L.) major* relacionados com resistência a tubercidina

Utilizando técnicas de clonagem funcional foi construída uma genoteca no vetor-cosmídio cLHYG e isolada uma série de cosmídios relacionados com resistência a agentes antiparasitários (Cotrim et al., 1999). Dois desses cosmídios (cosTUB1 e cosTUB2) eram capazes de conferir resistência a tubercidina (TUB) após transfecção e super-expressão em células selvagens do parasita.

1. Identificação e caracterização do gene relacionado com resistência a TUB presente no inserto cosTUB1

O primeiro dos cosmídios relacionados com resistência a TUB (denominado cosTUB1), continha um inserto de aproximadamente 30 kb, e foi selecionado em presença de concentrações altas de TUB, após experimentos de super-expressão induzida com higromicina B (HYG).

1.1. Mapeamento do DNA do inserto cosTUB1

Visando identificar o gene relacionado com resistência a TUB presente nesse inserto, foi realizada primeiramente uma série de digestões do DNA do cosmídio (cosTUB1) utilizando enzimas de restrição que atuem preferencialmente no DNA do inserto, como por exemplo: *Apal*, *EcoRV*,

*Sma*I, *Xba*I e *Kpn*I, ou ainda *Spe*I, *Hind*III e *Bam*HI. Nosso objetivo era obter um padrão de digestão com vários fragmentos do inserto para gerarmos o maior número possível de deleções do *cosTUB1*. A manutenção da integridade do DNA do vetor é importante para os testes funcionais que exigem a viabilidade funcional do vetor.

Podemos verificar na figura 1 que a digestão total com algumas dessas enzimas indicou que o padrão de digestão com *Kpn*I (Fig. 1, linha 5) apresentava um maior número de fragmentos.

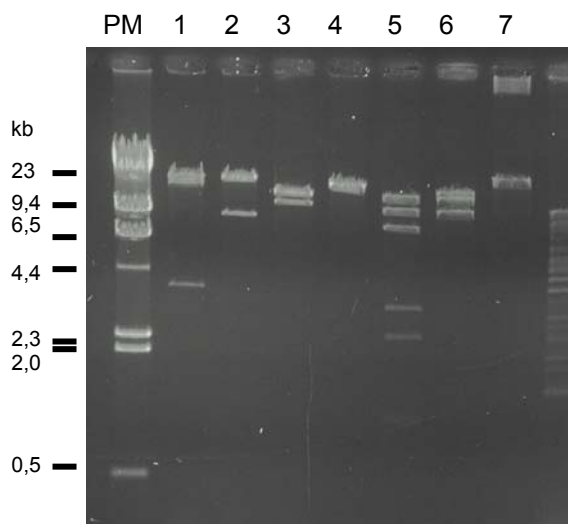


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo os produtos de digestão do DNA do *cosTUB1* com diferentes enzimas de restrição: (1) *Apal*; (2) *EcoRV*; (3) *Sma*I; (4) *Xba*I; (5) *Kpn*I; (6) *Spe*I e (7) *Hind*III. PM: padrão de peso molecular em kb representado pelo DNA do fago λ digerido com *Hind*III.

Dessa forma, o DNA do *cosTUB1* foi submetido à digestão parcial com *Kpn*I, seguido de ligação com a enzima *T4 DNA ligase*, também em condições parciais. Essa técnica propicia a obtenção de diferentes populações de deleções do inserto. As construções obtidas foram transformadas em *E. coli*, e após expansão e plaqueamento, o DNA de uma

série de colônias foi extraído e submetido novamente à digestão total com *KpnI*. De acordo com a figura 2, podemos verificar a presença de quatro diferentes deleções do inserto *costUB1*, denominadas: *costUB1-ΔKpnI-I*, *costUB1-ΔKpnI-II*, *costUB1-ΔKpnI-III* e *costUB1-ΔKpnI-IV*, sendo que a deleção *costUB1-ΔKpnI-I* (Fig. 2, linha 2) era o produto da digestão total do DNA do *costUB1* com *KpnI*.

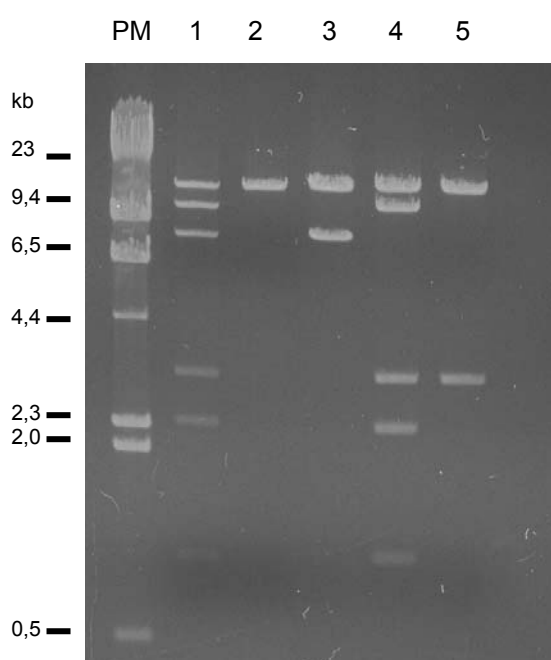


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo os produtos de digestão total com a enzima restrição *KpnI* dos seguintes DNAs: (1) *costUB1*; (2) *costUB1-ΔKpnI-I*; (3) *costUB1-ΔKpnI-II*; (4) *costUB1-ΔKpnI-III* e (5) *costUB1-ΔKpnI-IV*. PM: padrão de peso molecular em kb representado pelo DNA do fago λ digerido com *HindIII*.

Com base no padrão de digestão total dos DNAs das deleções obtidas, deduzimos um provável mapa para o inserto *costUB1* (Fig. 3). Para essa dedução, partimos da suposição que as deleções contendo apenas um fragmento *KpnI* do inserto (Fig. 2, linhas 3 e 5), devem ter esse fragmento diretamente ligado ao fragmento contendo o DNA do vetor (o DNA do vetor

cLHYG tem cerca de 11 kb de extensão), e assim por diante. Dessa forma, representamos na figura 3 os mapas prováveis das quatro deleções obtidas (contendo insertos com cerca de 6, 14, 22 e 9 kb, respectivamente), bem como do inserto cosTUB1 original de aproximadamente 30 kb. O tamanho dos dois fragmentos do inserto ligados às extremidades do DNA do vetor foram estimados com base nos produtos de digestão dupla do DNA da deleção cosTUB1- Δ KpnI com *KpnI-HindIII* (3,3 kb) e *KpnI-XhoI* (3,0 kb).

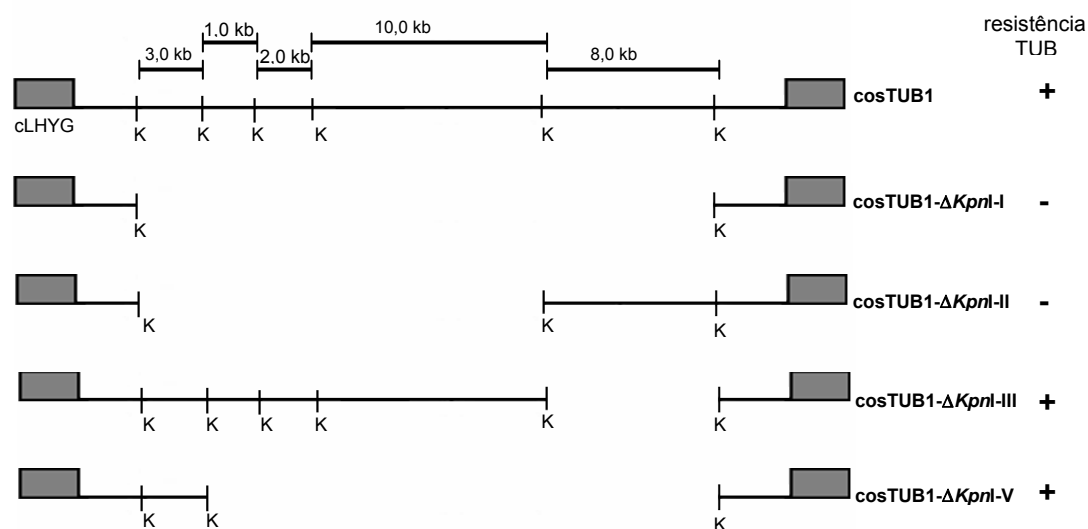


Figura 3. Representação gráfica linear dos prováveis mapas genômicos das construções indicadas. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG; 'K' representa os sítios para a enzima de restrição *KpnI* presentes no inserto cosTUB1; os sinais à direita (+) e (-) correspondem a capacidade ou não da construção conferir resistência a TUB após transfecção em células selvagem do parasita.

1.2. Análise funcional do inserto cosTUB1

Após a obtenção de quatro deleções do inserto cosTUB1, seus respectivos DNAs foram individualmente transfectados em células selvagens de *L. (L.) major* da cepa Friedlin A1 (LmA1) e em seguida submetidos à amplificação de seus números de cópias, através de passagens sucessivas

em concentrações crescentes de HYG (25 a 500 $\mu\text{g/mL}$), conforme descrito em Métodos. As células transfectadas e induzidas à super-expressarem seu conteúdo gênico foram submetidas à análise funcional em presença de concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μM).

Podemos verificar na figura 4, as curvas de inibição de crescimento obtidas nessa análise funcional, mostrando que a curva relativa às células transfectadas com o DNA da deleção *cosTUB1- $\Delta KpnI$ -IV* (\bullet), apresentou um padrão de resistência a TUB bem maior do que os obtidos com as células controle LmA1 e LmA1 transfectada com o DNA do vetor cLHYG vazio (\blacklozenge e \times). A utilização desse último controle é importante para confirmar que o procedimento de transfecção não tem influência no resultado da análise.

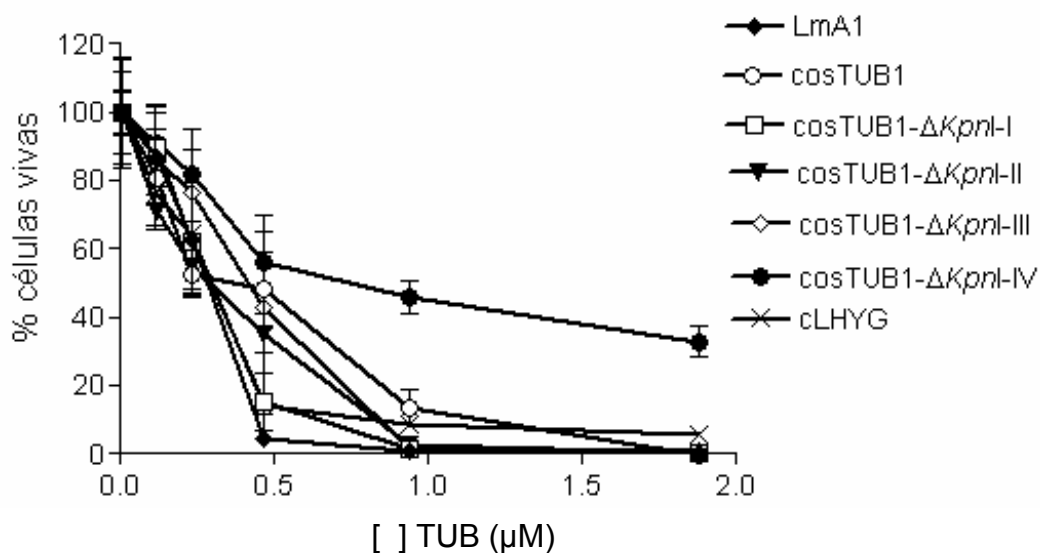


Figura 4. Representação gráfica das curvas médias de inibição de crescimento em presença de concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μM) com as formas promastigotas de *L. (L.) major* transfectadas ou não com as construções indicadas. A porcentagem de células vivas está indicada em função da concentração crescente de TUB. Cada experimento foi realizado no mínimo em triplicata.

A análise quantitativa desses testes funcionais mostrou ainda que o padrão de resistência apresentado pelas células transfectadas com os DNAs do cosTUB1 original (o), e da deleção cosTUB1- $\Delta KpnI$ -III (\diamond), também poderiam ser considerados significativamente diferentes aos padrões de resistência verificados para as células controles (Tab. 1).

Os dados da tabela 1 representam os valores de IC_{50} calculados para cada experimento, e mostram que as células transfectadas com os DNAs do cosTUB1 original e das deleções cosTUB1- $\Delta KpnI$ -III e cosTUB1- $\Delta KpnI$ -IV (representados em cinza na tabela) apresentavam, respectivamente, a razão de resistência de 2,08; 2,04 e 2,82 vezes mais resistentes que as células controle (LmA1 e LmA1 transfectada com cLHYG vazio).

Comparando estes dados com o mapa genômico proposto na figura 3 podemos supor que o gene relacionado com resistência a TUB deve estar contido no fragmento *KpnI* de 3 kb. Esse é o único fragmento comum aos DNAs dos insertos do cosTUB1 original, e das deleções cosTUB1- $\Delta KpnI$ -III e cosTUB1- $\Delta KpnI$ -IV, que foram as únicas construções a conferir níveis significantes de resistência a TUB após transfecção e super-expressão gênica (sinal \dagger na Fig. 3 e na Tab. 1).

Tabela 1. Quantificação da análise funcional do inserto cosTUB1 em presença de TUB.

linhagem celular	IC ₅₀ *	razão de resistência **	(p) ***	(n)	fenótipo
LmA1	0,23 ± 0,09		-	15	-
cLHYG	0,23 ± 0,04	1,00	ns	3	-
cosTUB1	0,45 ± 0,05	1,95	6x10 ⁻⁴	4	+
cosTUB1-Δ <i>KpnI</i> -I	0,27 ± 0,03	1,17	ns	4	-
cosTUB1-Δ <i>KpnI</i> -II	0,30 ± 0,02	1,34	ns	4	-
cosTUB1-Δ <i>KpnI</i> -III	0,47 ± 0,02	2,04	6x10 ⁻⁴	4	+
cosTUB1-Δ <i>KpnI</i> -IV	0,65 ± 0,07	2,82	2x10 ⁻⁶	4	+

* A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes para cada linhagem celular indicada.

** A razão de resistência foi calculada dividindo-se o valor de IC₅₀ das células transfectadas pelo valor de IC₅₀ das células selvagens (LmA1).

*** Os valores de (p) foram calculados com base no teste *t* de Student, considerando valores não significantes (ns) $p > 0,05$.

1.3. Identificação e localização do inserto cosTUB1 no genoma de

L. (L.) major

A estratégia utilizada para a identificação do inserto cosTUB1 no genoma de *L. (L.) major* consistiu em subclonar um pequeno fragmento do inserto cosTUB1 para o seqüenciamento de nucleotídeos e posterior comparação com os dados disponibilizados no banco de dados genômico (GenBank). Assim, verificamos que a digestão total do DNA do inserto cosTUB1 com a enzima de restrição *Bam*HI gerou, entre outros, um

fragmento de 3 kb que foi purificado, subclonado no vetor pSNBR (Fig. 5) e submetido ao seqüenciamento de nucleotídeos.

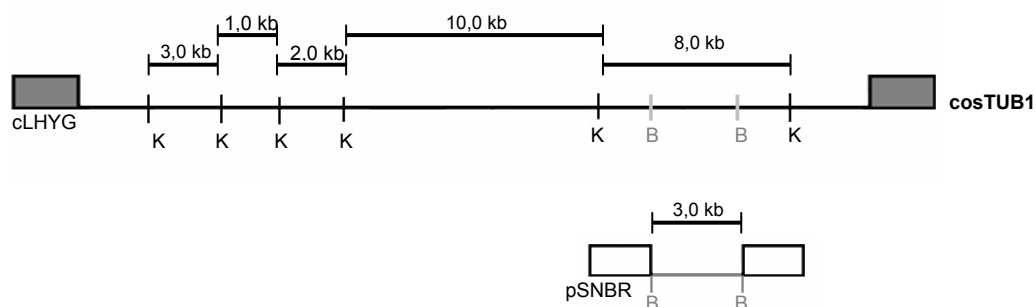


Figura 5. Representação gráfica linear dos prováveis mapas genômicos. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG, os retângulos em branco representam o vetor pSNBR. 'K' - *KpnI*, 'B' - *BamHI*.

A análise comparativa da seqüência de nucleotídeos do fragmento *BamHI* de 3 kb com os dados disponibilizados no GenBank, permitiu localizar o inserto cosTUB1 no interior do cromossomo 31 do genoma de *L. (L.) major*. Verificamos ainda que o inserto total de cosTUB1 possui aproximadamente 30.500 pb e que o mapa de restrição previsto anteriormente com base apenas no perfil de digestão com a enzima *KpnI* (Fig. 3), estava correto, não só sob o ponto de vista de localização dos fragmentos no inserto, como também na estimativa do tamanho dos mesmos. De posse desses dados podemos representar o mapa genômico do inserto cosTUB1 com maior precisão, apresentando o tamanho de cada fragmento *KpnI* de acordo com os dados do banco genômico (Fig. 6).

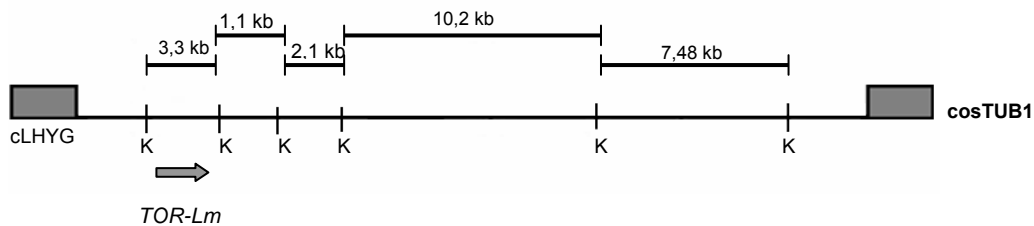


Figura 6. Representação gráfica linear do mapa genômico do inserto cosTUB1 mostrando a posição da fase de leitura aberta correspondente ao gene *TOR-Lm* descrito no texto. O tamanho em kb de cada fragmento *KpnI* está representado de acordo com os dados do banco de dados do genoma de *L. (L.) major*. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. 'K' – *KpnI*.

Com base na seqüência de nucleotídeos do inserto cosTUB1 (obtida 'in silico'), deduzimos a seqüência de aminoácidos do inserto cosTUB1, verificando a presença de pelo menos cinco fases de leitura aberta ("Open Reading Frames" - ORF) majoritárias em toda a extensão do inserto (dados não mostrados). Destas, apenas uma estava localizada no interior do fragmento *KpnI* de 3 kb que contém o *locus* relacionado com resistência a TUB (Fig. 3 e Tab. 1), e que na verdade definimos agora como tendo 3,3 kb, de acordo com os dados do banco genômico (Fig. 6).

Esta ORF de 1.455 nucleotídeos codifica uma proteína de 485 aminoácidos que apresenta grande similaridade (77%) com uma proteína descrita por Kerby e Detke (1993), como responsável pela resistência a TUB em *L. mexicana amazonensis* (atualmente *L. (L.) amazonensis*), e denominada na ocasião de TOR (TOxic nucleoside Resistance). A seqüência de nucleotídeos da TOR de *L. (L.) amazonensis* (TOR-La) está disponível no GenBank (AAC38851), apresentando uma alta similaridade com a TOR de *L. (L.) major* (TOR-Lm), descrita nesse trabalho (Fig. 7).

Recentemente TOR-Lm foi anotada no genoma de *L. (L.) major* como uma “transcription like protein” - *nupM1* (Lmj31.1940).

TOR-Lm	MHLSATAAALLCVVSAAALGFGIIFALFALMYFGCLRIPDGGVANGNRRWLRERNAPEQL	60
TOR-La	MHLSATTTALLCVAIAAALGFGIVCALFVLMYFGCLKMSNGRVANGNRRWLREGDTPERL	60
TOR-Lm	GSSSSGEAAVERQWKGIPLNSRPPRLTPEQEILREKAMEKYKRRRAREERRRAHQERRS	120
TOR-La	DSSSNGEAAVESQRKGIPLNSRPPRLTPEQEILREKAMEKYKRRQARQERR-----S	113
TOR-Lm	QYQAAREARMASVREGAREGAVSEDEFAGDSSDTSQTTLTSGATTVRTTSTVAYGRSSYL	180
TOR-La	QRQAAREARLANVREGAREGTVSEDEFAGDSSDTSRTTLTSTVATTVRTTSTVAYGRSSYL	173
TOR-Lm	RPPSGDCTVHVDEHDDNDRSSRSRSGSSRSRGSARSRASQGTVATIKSYLRHRQHQRRLR	240
TOR-La	RPPSGDCTVHIDEYDDNDRSHSSHNDGSRSSRGSASRSASQGVVATIKSHLRHRQHQRRLR	233
TOR-Lm	RREEQQQLELQFNQWTYAQMVSSELSSSSKSVSASSQHDGERSATGGGARHRTRTACGSR	300
TOR-La	RREEQQQLELLDQWAYAQMVSSELSSSSKDVSAASSQHDEEGSTTGGDTRHRTRTAGGSR	293
TOR-Lm	SCNHAHSGRTASVASSAPRPLEDVLGTDCEYSPFLVNVERGNLEGFRVDTQRPSTLHQSAAP	360
TOR-La	SFNHVHPNRSASVASSAPRPLEEVLGADCAYPFLMNVHEHGNLEGFSVDNQRPSPHQAAAL	353
TOR-Lm	TANTS-RCDTV-FPGAFTSSKGTGTGATSPHVASAEHVEYAGRGESEGMHAGEHVDHRQPRR	418
TOR-La	TAHASGR-DTASF-GPFTYSNGTTDAPSPHVAPAEHVEYAGHGSGVPTGEHVDRQQPRR	411
TOR-Lm	HKRTWKDVEHNVALSGFFNTSTNNNMAVSDTASRSHYNDGEAPAPSLSAPEEFPVDRSLGL	478
TOR-La	HKRTRKNVEHNAALSGFFSTPTNNNMTSLDTAFRPHHNNREAPAPSVSTPGEPMHTSLGL	471
TOR-Lm	HEPICHE	485
TOR-La	HEPISHE	478

Figura 7. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas relacionadas com a resistência a TUB (TOR) em *L. (L.) major* (TOR-Lm), e em *L. (L.) amazonensis* (TOR-La). Os aminoácidos idênticos estão destacados (em cinza). A numeração à direita corresponde ao número de aminoácidos na seqüência. O alinhamento foi realizado pelo programa blastp, matrix PAM30 do BLAST-NCBI.

2. Identificação e caracterização do locus relacionado com resistência a TUB presente no inserto cosTUB2

O segundo cosmídio que confere resistência a TUB após transfecção em células de *Leishmania* (denominado cosTUB2), continha um inserto de aproximadamente 31 kb, e como o cosmídio anterior cosTUB1, também foi selecionado em presença de concentrações altas de TUB, após experimentos de super-expressão induzida com HYG.

2.1. Mapeamento do DNA do inserto *costUB2*

A mesma estratégia utilizada para identificar o gene *TOR* no inserto do *costUB1* foi utilizada para identificar o *locus* relacionado com resistência a TUB presente nesse segundo cosmídio. Inicialmente, o DNA do *costUB2* foi digerido com as mesmas enzimas de restrição capazes de manter a viabilidade funcional do vetor e utilizadas no mapeamento anterior.

Podemos verificar na figura 8 que a digestão total com algumas dessas enzimas indicou que o padrão de digestão com *ApaI* (Fig. 8, linha 1) apresentava um maior número de fragmentos.

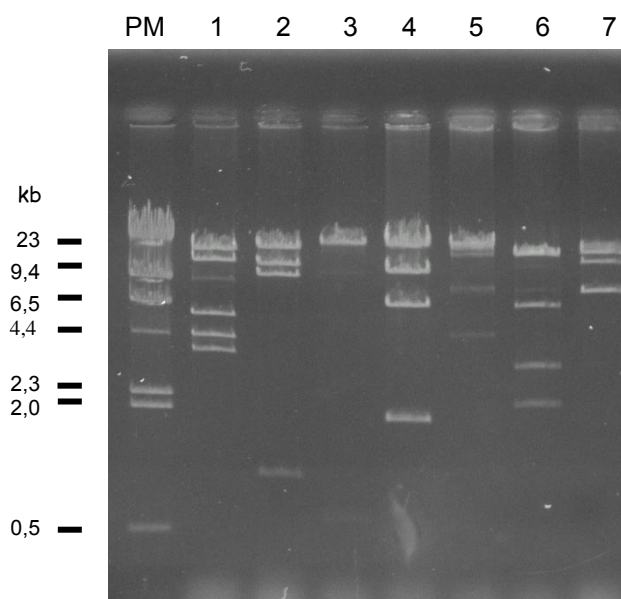


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio contendo os produtos de digestão do DNA do *costUB2* com diferentes enzimas de restrição: (1) *ApaI*; (2) *EcoRV*; (3) *SmaI*; (4) *XbaI*; (5) *KpnI*; (6) *SpeI*; (7) *HindIII*. PM: padrão de peso molecular em kb representado pelo DNA do fago λ digerido com *HindIII*.

Visando a obtenção de diferentes populações de deleções desse inserto, o DNA do *cosTUB2* foi submetido à digestão parcial com *Apal*, seguido de ligação com a enzima *T4 DNA ligase*, também em condições parciais. As construções obtidas foram transformadas em *E. coli* e após expansão e plaqueamento, o DNA de uma série de colônias foi extraído e submetido novamente à digestão total com *Apal*, permitindo assim a dedução dos mapas prováveis para o inserto *cosTUB2* e suas deleções (Fig. 9). Podemos verificar nos mapas representados na figura 9 a presença de quatro diferentes deleções do inserto *cosTUB2*, denominadas: *cosTUB2-ΔApal-I*, *cosTUB2-ΔApal-II*, *cosTUB2-ΔApal-III* e *cosTUB2-ΔApal-IV*, com cerca de 3,5; 8,0; 27 e 17 kb de extensão, respectivamente. Da mesma maneira que para o *cosTUB1*, o tamanho dos fragmentos do inserto ligados às extremidades do vetor foram estimados com base na digestão da deleção *cosTUB2-ΔApal-I* com *Apal-HindIII* (1,9 kb) e *Apal-XhoI* (1,8 kb).

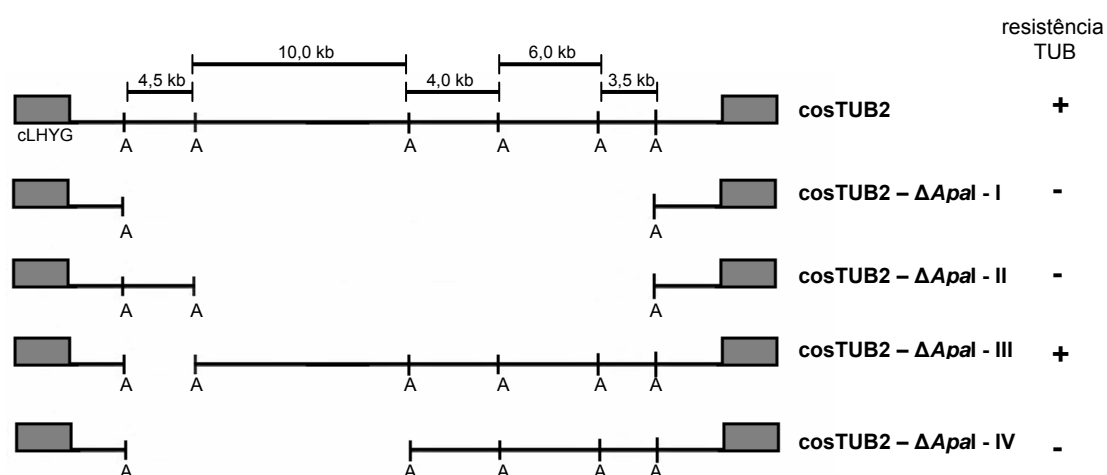


Figura 9. Representação gráfica linear dos prováveis mapas genômicos das construções indicadas. O tamanho estimado em kb de cada fragmento *Apal* está representado. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. 'A' representa os sítios para a enzima de restrição *Apal* presentes no inserto *cosTUB2*; os sinais a direita (+) e (-) correspondem a uma capacidade ou não da construção conferir resistência a TUB após transfeção em células selvagem do parasita.

2.2. Análise funcional do inserto cosTUB2

Após a obtenção das quatro deleções do inserto cosTUB2, seus respectivos DNAs foram individualmente transfectados em células selvagens LmA1 e em seguida as células transfectadas foram submetidas à amplificação gênica, conforme descrito para cosTUB1. Cada população de células transfectadas com os DNAs das deleções foi submetida a análise funcional em presença de concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μM). Entretanto, diferentemente do observado para o cosTUB1, onde uma das deleções era claramente mais resistente que os controles não resistentes, podemos verificar na figura 10, que a curva referente ao cosmídio original (o) apresentou-se mais resistente que a deleção cosTUB2- Δ Apal-III (\diamond).

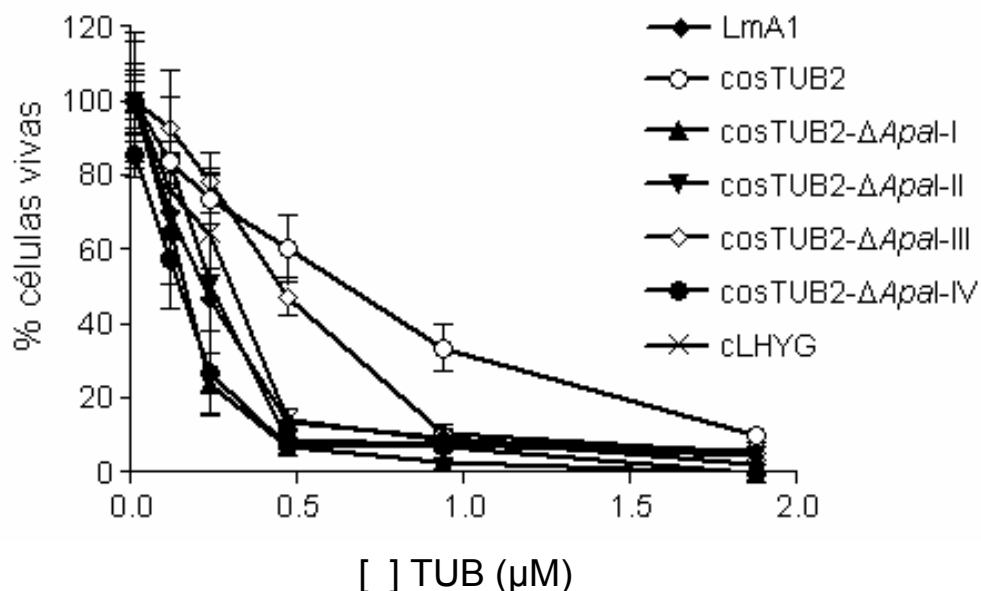


Figura 10. Representação gráfica das curvas médias de inibição de crescimento em presença de concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μM), com as formas promastigotas de *L. (L.) major* transfectadas ou não com as construções indicadas. A porcentagem de células vivas está indicada em função da concentração crescente de TUB. Cada experimento foi realizado no mínimo em triplicata.

Por outro lado, fazendo os cálculos e análises comparativas dos valores de IC₅₀ desses testes funcionais, verificamos que o padrão de resistência apresentado pelas células transfectadas com o DNA da deleção *cosTUB2-ΔA_{pal}-III* (◇), poderia ser considerado significativamente diferente aos padrões de resistência verificados para as células controles (Tab. 2). Assim, analisando esses dados verificamos que tanto o DNA do *cosTUB2* original, como o DNA da deleção *cosTUB2-ΔA_{pal}-III* foram capazes de conferir níveis de resistência a TUB (3,78 e 2,0 vezes, respectivamente, de acordo com Tab. 2), após transfecção em células selvagens do parasita.

Tabela 2. Quantificação da análise funcional do inserto *cosTUB2* em presença de TUB

linhagem celular	IC ₅₀ *	razão de resistência **	(p) ***	(n)	fenótipo
LmA1	0,23 ± 0,09	-	-	15	-
cLHYG	0,26 ± 0,06	1,13	ns	3	-
<i>cosTUB2</i>	0,87 ± 0,34	3,78	2x10 ⁻⁶	7	+
<i>cosTUB2-ΔA_{pal}-I</i>	0,27 ± 0,05	1,17	ns	5	-
<i>cosTUB2-ΔA_{pal}-II</i>	0,21 ± 0,07	0,91	ns	6	-
<i>cosTUB2-ΔA_{pal}-III</i>	0,46 ± 0,05	2,00	2x10 ⁻⁵	13	+
<i>cosTUB2-ΔA_{pal}-IV</i>	0,26 ± 0,09	1,13	ns	7	-

* A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes para cada linhagem celular indicada.

** A razão de resistência foi calculada dividindo-se o valor de IC₅₀ das células transfectadas pelo valor de IC₅₀ das células selvagens (LmA1).

*** Os valores de (p) foram calculados com base no teste *t* de Student, considerando valores não significantes (ns) p > 0,05.

Comparando os dados quantitativos da tabela 2 com o mapa genômico previsto (Fig. 9), poderíamos inferir que o fragmento *Apal* de 10 kb presente, tanto no inserto *cosTUB2* original, como no inserto da deleção *cosTUB2-ΔApal-III*, deve conter um *locus* gênico relacionado com resistência a TUB para a *Leishmania*.

2.3. Identificação e localização do inserto *cosTUB2* no genoma de *L. (L.) major*

Utilizando a mesma estratégia descrita para a identificação do inserto *cosTUB1* no genoma de *L. (L.) major*, verificamos que a digestão total do DNA do inserto *cosTUB2* com a enzima de restrição *EcoRV*, gerou, entre outros, um fragmento de 1 kb, que foi purificado, subclonado no vetor *pUC-π* e submetido ao seqüenciamento de nucleotídeos (Fig. 11).

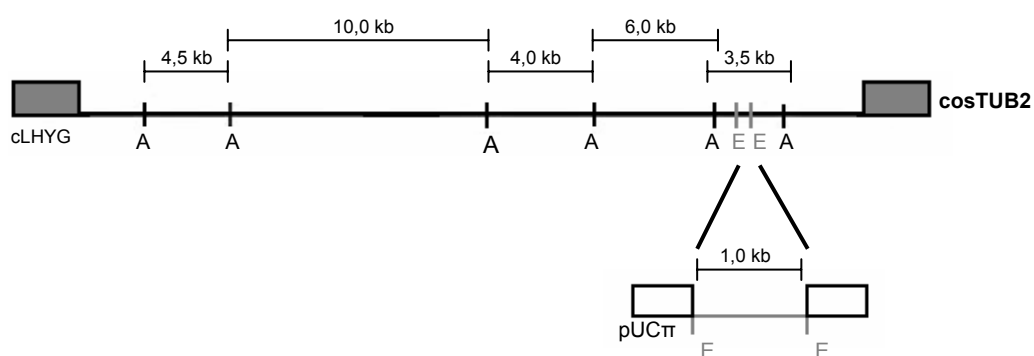


Figura 11. Mapa genômico do *cosTUB2* representado linearmente. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor *cLHYG*, os retângulos em branco representam o vetor *pUCπ*. 'A' representa a enzima *Apal*, 'E' representa a enzima *EcoRV*.

A análise comparativa da seqüência de nucleotídeos obtida com os dados disponibilizados no GenBank, permitiu localizar o inserto *cosTUB2*, coincidentemente, também no interior do cromossomo 31 do genoma de *L. (L.) major*. Verificamos ainda que o inserto total de *cosTUB2* possui cerca de 31.200 pb, e que o mapa de restrição previsto anteriormente (Fig. 9), também estava correto com relação ao tamanho e localização dos fragmentos no inserto. Da mesma forma, passamos a representar o mapa genômico do inserto *cosTUB2* com o tamanho dos fragmentos *Apal* de acordo com os dados do banco genômico (Fig. 12).

Com base na seqüência de nucleotídeos de toda a extensão do inserto *cosTUB2* disponibilizada no banco genômico, deduzimos a seqüência de aminoácidos do inserto *cosTUB2*, verificando a presença de seis ORFs majoritárias. Quatro destas ORFs ainda não estão caracterizadas funcionalmente, descritas apenas como prováveis proteínas devido a sua conformação estrutural. Outras duas ORFs estão identificadas como gp63-like e succinil-diaminopimelato-desuccinilase-like, SDD-like (Fig. 12). Destas seis ORFs, apenas três tem relação com o fragmento de 9,6 kb presente no inserto da deleção *cosTUB2-ΔApal-III*, e que hipoteticamente definimos como provável *locus* de um gene capaz de codificar um proteína relacionada com a resistência a TUB no parasita.

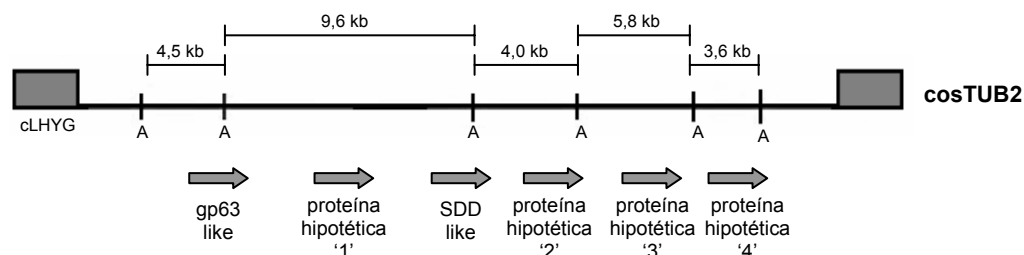


Figura 12. Representação gráfica linear do mapa genômico do inserto cosTUB2 mostrando a posição das 6 fases de leitura aberta majoritárias descritas no texto. O tamanho em kb de cada fragmento *Apal* está representado. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG. 'A' – *Apal*.

2.4. Papel da proteína hipotética '1' do cosTUB2 na relação com resistência a TUB

Considerando que tanto a gp63-like, como a SDD-like, representadas na figura 12, estão contidas apenas parcialmente no interior do fragmento 9,6 kb do inserto da deleção cosTUB2- Δ *Apal*-III, decidimos inicialmente analisar o papel da proteína hipotética '1' na resistência a TUB com o intuito de determinar a região exata desse inserto capaz de conferir resistência a TUB.

Baseado na seqüência de nucleotídeos do inserto cosTUB2, produzimos duas novas construções contendo a região codante dessa proteína hipotética '1'. Inicialmente isolamos e purificamos (GeneClean) um fragmento *Clal*-*Hind*III de 6,8 kb, produto da digestão dupla do DNA do inserto cosTUB2 com as enzimas de restrição *Clal* e *Hind*III. Este fragmento *Clal*-*Hind*III de 6,8 kb foi subclonado no vetor pSNBR, digerido previamente com as mesmas enzimas, que após transformação e extração do DNA gerou a construção denominada pSNBR/6,8kb *Clal*-*Hind*III (Fig. 13-A). Com o objetivo de obter um fragmento menor contendo a região codante da

proteína hipotética '1' íntegra, realizamos ainda uma digestão total do DNA da construção pSNBR/6,8kb *Clal-HindIII* com a enzima de restrição *EcoRI*. O produto desta digestão seguida de ligação com a enzima *T4 DNA ligase* produziu a construção pSNBR/3kb *Clal-EcoRI* (Fig. 13-B).

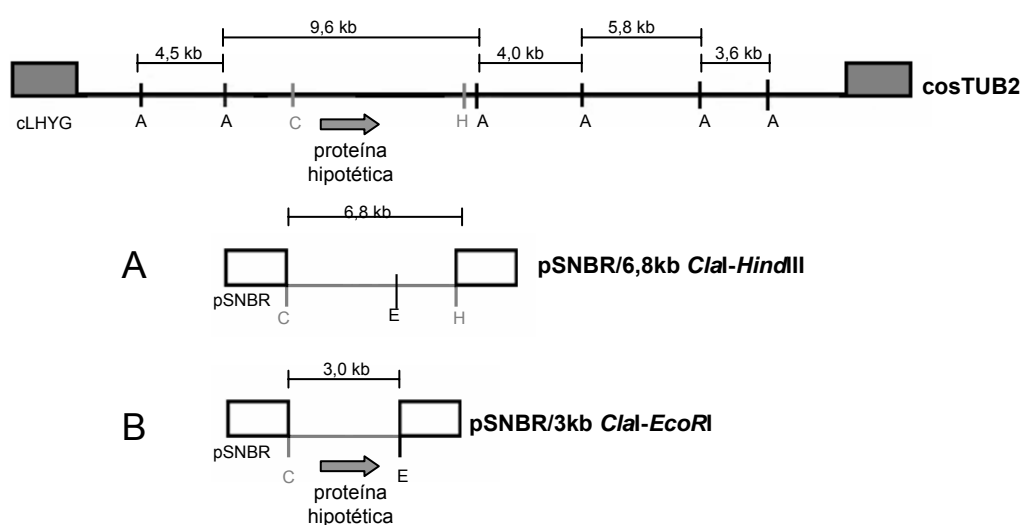


Figura 13. Representação gráfica linear do mapa genômico do inserto cosTUB2 e de duas construções derivadas (A e B). A representa a construção pSNBR/6,8kb *Clal-HindIII* e B representa a construção pSNBR/3kb *Clal-EcoRI*. A seta representa a localização da região codante da proteína hipotética '1'. Os retângulos em cinza representam o DNA do vetor cLHYG e os retângulos brancos o DNA do vetor pSNBR. 'A' – *ApaI*; 'C' – *Clal*; 'E' – *EcoRI* e 'H' – *HindIII*.

Os DNAs das duas construções obtidas (Figs. 13-A e 13-B), foram individualmente transfectados em promastigotas selvagens de LmA1 e as células induzidas à amplificação do número de cópias do DNA transfectado, após sucessivas passagens em neomicina (NEO) - já que o vetor utilizado nessa etapa foi o pSNBR, e não o cLHYG. Em seguida, as células foram submetidas à análise funcional em presença de concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μM) e o resultado representado por curvas de inibição de crescimento (Fig. 14). Primeiramente, podemos notar na figura 14, que

nenhuma das células testadas (exceto costTUB2) apresentou um claro padrão de resistência quando comparadas com as linhagens controles não resistentes, LmA1 e pSNBR (respectivamente, células LmA1 selvagens e LmA1 transfectadas com o DNA do vetor pSNBR sem inserto). Notamos ainda, que a curva de inibição de crescimento do inserto costTUB2 (de 31,2 kb) apresentou um perfil de resistência ligeiramente maior que os insertos da deleção costTUB2- Δ Apal-III, e das construções pSNBR/6,8kb *Cla*I-*Hind*III e pSNBR/3kb *Cla*I-*Eco*RI, respectivamente, com 20; 6,8 e 3 kb (Fig. 14, curvas \diamond ; \square ; \bullet).

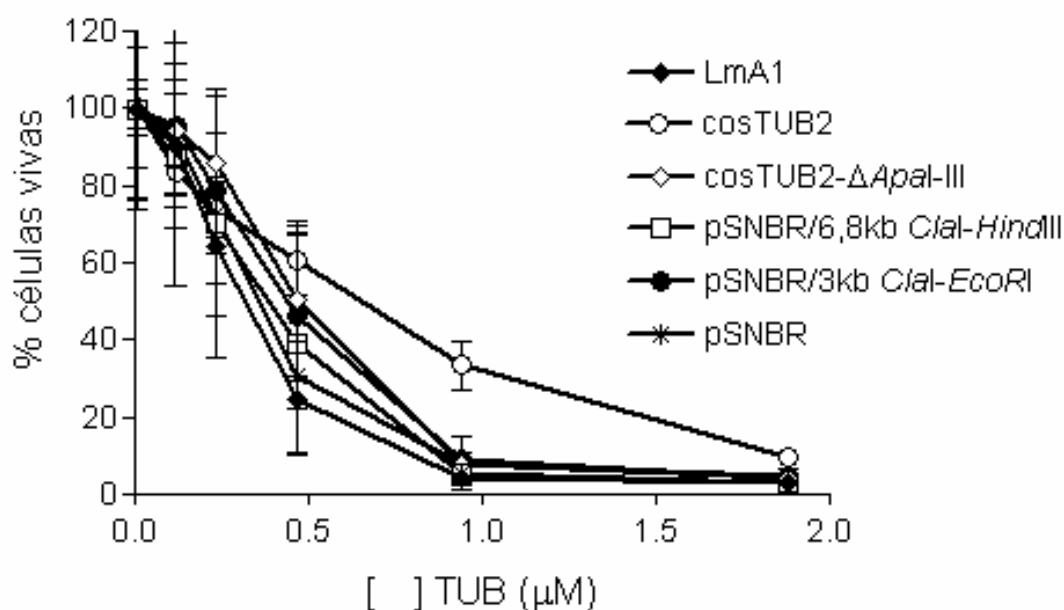


Figura 14. Representação gráfica das curvas médias de inibição de crescimento em presença de concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μ M), com as formas promastigotas de *L. (L.) major* transfectadas ou não com as construções indicadas. A porcentagem de células vivas está indicada em função da concentração crescente de TUB. Cada experimento foi realizado no mínimo em triplicata.

Confirmando os dados anteriores, as análises comparativas dos valores de IC₅₀ desses testes funcionais (Tab. 3), mostram que a razão de resistência calculada para as células transfectadas com os DNAs do inserto

cosTUB2- Δ Apal-III, e das construções pSNBR/6,8kb *Clal-HindIII* e pSNBR/3kb *Clal-EcoRI*, apesar de significativamente diferente dos padrões das células controles, apresentaram valores semelhantes entre si (respectivamente 2,0; 1,82 e 1,91 vezes mais resistentes que as células LmA1). Mas, nenhuma delas próxima a razão de resistência de cerca de 4 vezes do original cosTUB2.

Apesar da região codante da proteína hipotética '1' estar presente nos três insertos submetidos ao teste funcional em presença de TUB, constatamos que esse aumento pequeno e progressivo da resistência a TUB, não está relacionado com a diminuição do tamanho do inserto, como comumente verificamos em análises funcionais com outros compostos, ou mesmo na análise funcional do cosTUB1, realizada nesse trabalho.

Dessa forma, a análise desses resultados nos leva a concluir que a região codante da proteína hipotética '1' (ou pelo menos essa região codante sozinha), não deve estar diretamente relacionada com resistência a TUB em *Leishmania*.

Tabela 3. Quantificação dos testes da análise funcional da região codante da proteína hipotética '1' em presença de TUB

linhagem celular	IC ₅₀ *	razão de resistência **	(p) ***	(n)	fenótipo
LmA1	0,23 ± 0,09	-	-	15	-
pSNBR	0,30 ± 0,03	1,17	ns	3	-
cosTUB2	0,87 ± 0,34	3,78	2x10 ⁻⁶	7	+
cosTUB2-Δ <i>Apal</i> -III	0,46 ± 0,05	2,00	2x10 ⁻⁶	13	+
pSNBR/6,8kb <i>Clal</i> - <i>Hind</i> III	0,42 ± 0,04	1,82	0,003	6	+
pSNBR/3kb <i>Clal</i> - <i>Eco</i> RI	0,44 ± 0,08	1,91	0,002	6	+

* A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de um número (n) de experimentos independentes para cada linhagem celular indicada.

** A razão de resistência foi calculada dividindo-se o valor de IC₅₀ das células transfectadas pelo valor de IC₅₀ das células selvagens (LmA1).

*** Os valores de (p) foram calculados com base no teste *t* de Student, considerando valores não significantes (ns) $p > 0,05$.

II. Eficácia da associação de TUB com um inibidor do transporte de nucleosídeos de mamíferos em *Leishmania* spp.

Sabemos que a alta toxicidade celular de tubercidina (TUB) pode ser revertida no hospedeiro com a associação do inibidor específico do transporte de nucleosídeos para células mamíferas, como por exemplo, nitrobenziltioinosina (NBMPR). Na literatura, esta associação já foi descrita em alguns parasitas, mas nada se sabe sobre a eficácia dessa associação em *Leishmania*. Com a identificação do gene *TOR-Lm* que codifica uma proteína relacionada com a resistência a TUB em *L. (L.) major*, nossa expectativa se direcionou para estudar os mecanismos de transporte de

nucleosídeos no parasita. Assim passamos a analisar o efeito da associação TUB-NBMPR em *Leishmania*.

1. Efeito da associação de tubercidina e nitrobenziltioinosina em culturas de promastigotas de *Leishmania* spp.

Culturas de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) major* e *L. (Viannia) braziliensis* foram incubadas a 26°C com concentrações crescentes de TUB, variando de 0,1 a 1,8 µM por 72 horas. A análise da ação deste composto foi feita pela contagem no Coulter T890, conforme descrito em Métodos.

A figura 15 representa as curvas de inibição de crescimento após a realização de três experimentos individuais com cada uma das espécies em presença de TUB. Verificamos que doses acima de 1 µM de TUB produzem efeito letal para três das quatro espécies analisadas, com porcentagem de células vivas em torno de zero. As células de *L. (L.) amazonensis* mostraram-se ligeiramente mais resistente a TUB quando comparadas com as outras espécies. Baseados ainda nos dados representados figura 15 foi possível calcular a concentração de TUB capaz de inibir 50% do crescimento celular (IC₅₀). Os valores variaram de 0,12 µM para *L. (L.) chagasi* e 0,38 µM para *L. (L.) amazonensis* (Tab. 4). Assim, confirmamos que TUB apresenta uma potente ação antiparasitária contra as células promastigotas das quatro espécies de *Leishmania* analisadas.

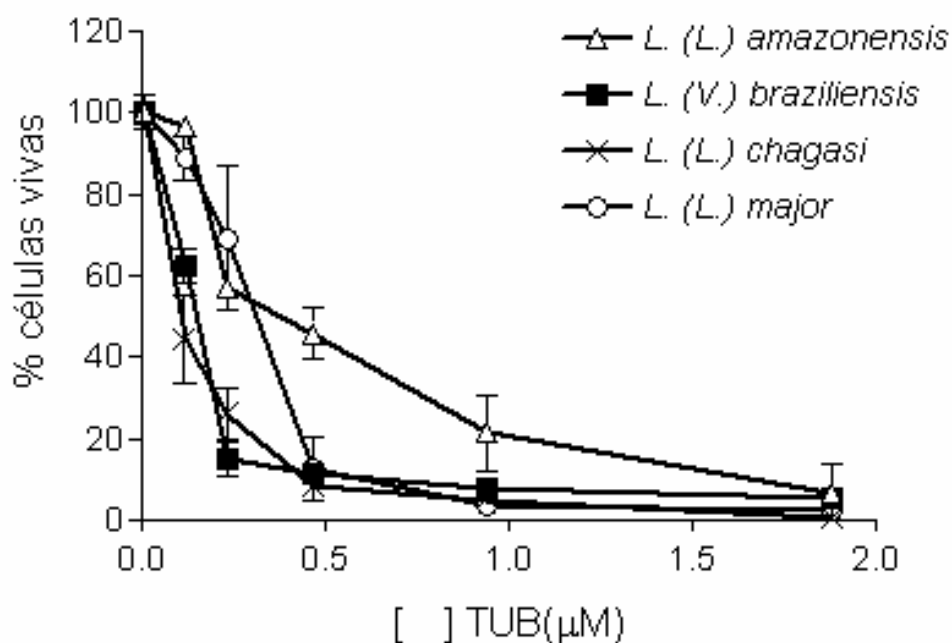


Figura 15. Representação gráfica das curvas médias de inibição do crescimento celular em presença de concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 µM), com as células promastigotas selvagens das espécies indicadas. A porcentagem de células vivas está indicada em função da concentração crescente de TUB. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 4. Quantificação dos testes de inibição de crescimento das espécies de *Leishmania* testadas em presença de TUB (valores de IC₅₀).

Espécies	IC ₅₀ (µM)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,38 ± 0,07
<i>L. (V.) braziliensis</i>	0,13 ± 0,09
<i>L. (L.) chagasi</i>	0,12 ± 0,07
<i>L. (L.) major</i>	0,29 ± 0,04

A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de três experimentos independentes para cada linhagem celular indicada.

Seguindo as padronizações dos experimentos com TUB, culturas de promastigotas das quatro espécies de *Leishmania* também foram incubadas em presença de concentrações crescentes do inibidor do transporte de nucleosídeos (NBMPR), variando de 0,1 a 4 μM . Ao contrário dos resultados verificados nos testes com TUB, NBMPR não apresentou ação antiparasitária relevante nas concentrações testadas (Fig. 16), o que pode ser evidenciado pela alta porcentagem de células vivas (mais de 60%).

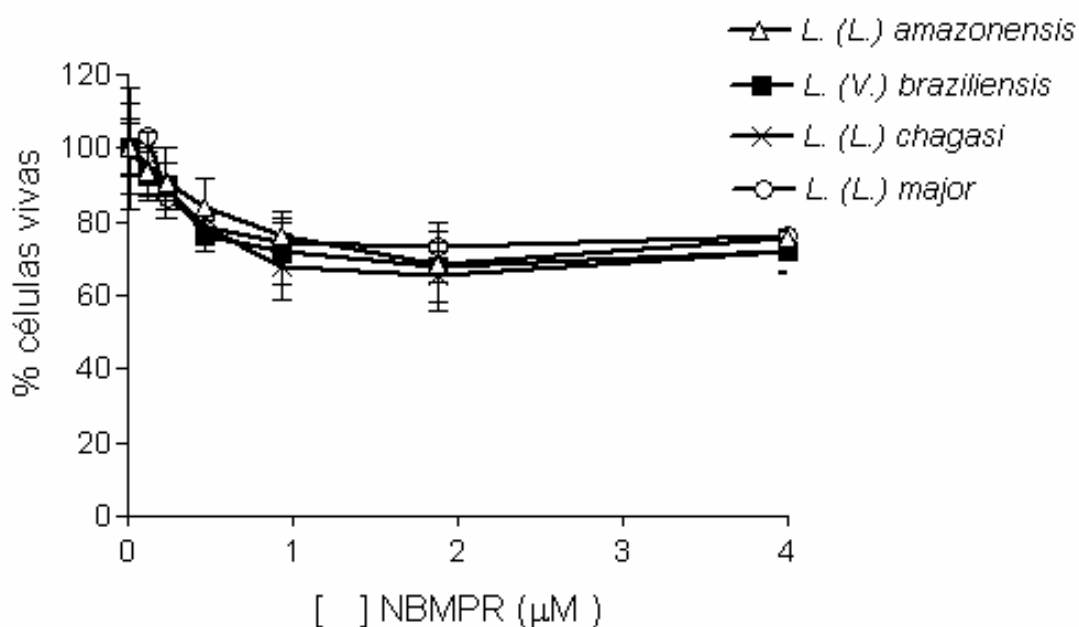


Figura 16. Representação das curvas médias de inibição do crescimento celular em presença de concentrações crescentes de NBMPR (0,1 a 4 μM), obtidas após a realização de três experimentos individuais, onde a porcentagem de células vivas das formas promastigotas das espécies analisadas está indicada em função da concentração crescente de NBMPR.

Para a análise do efeito da associação dos dois compostos (TUB-NBMPR), células promastigotas das quatro espécies de *Leishmania* foram incubadas, nas mesmas condições dos experimentos anteriores, com concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μM) em presença de uma

concentração alta, não tóxica e constante de NBMPR (4 μM). As curvas de inibição obtidas mostram que a presença de NBMPR não bloqueou a atividade antiparasitária de TUB em nenhuma espécie do parasita (Fig. 17).

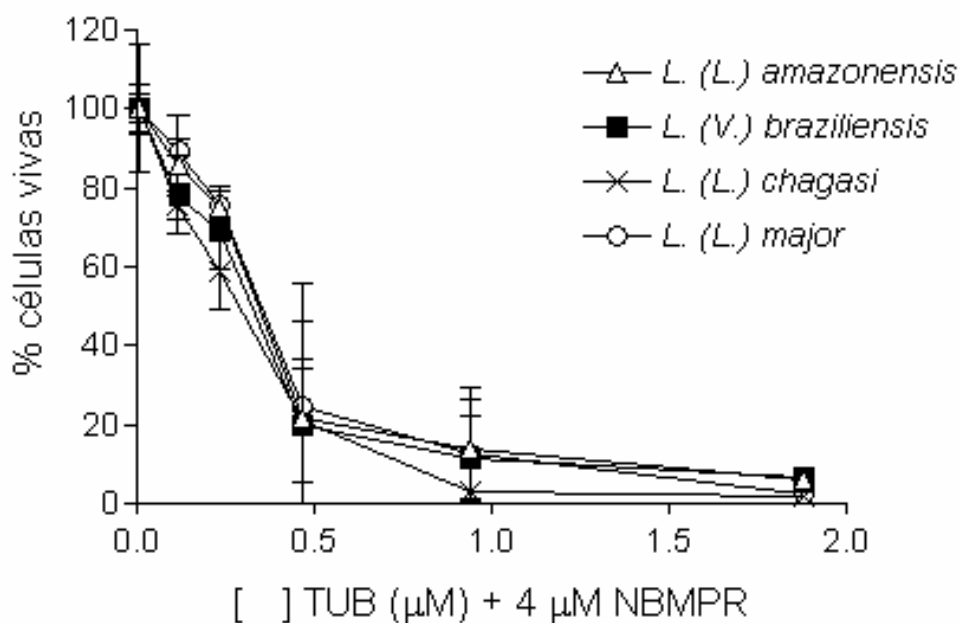


Figura 17. Representação das curvas médias de inibição do crescimento celular em presença da associação dos compostos, com concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 μM) e concentração constante de 4 μM de NBMPR, obtidas após a realização de três experimentos individuais, onde a porcentagem de células vivas das formas promastigotas das espécies analisadas está indicada em função da concentração crescente de TUB.

Confirmando os dados anteriores, as análises comparativas dos valores de IC_{50} desses testes (Tab. 5), mostram uma variação entre 0,20 μM para *L. (L.) chagasi* e 0,32 μM para *L. (L.) major*. Esses dados estão de acordo com os descritos por Ogbunude e Ikediobi (1982) para *T.gambiense*, onde as culturas de TUB e da associação TUB-NBMPR tiveram um comportamento celular *in vitro* muito similar.

Tabela 5. Quantificação dos testes de inibição de crescimento das espécies de *Leishmania* testadas em presença da associação TUB e NBMPR (valores de IC₅₀).

Espécies	IC ₅₀ (µM)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,30 ± 0,07
<i>L. (V.) braziliensis</i>	0,29 ± 0,09
<i>L. (L.) chagasi</i>	0,20 ± 0,07
<i>L. (L.) major</i>	0,32 ± 0,04

A média ± o desvio padrão dos valores de IC₅₀ de três experimentos independentes para cada linhagem celular indicada.

Visando a validação dos nossos dados, comparamos nossos resultados com o efeito anti-leishmania do antimonial pentavalente (glucantime®), um composto clássico, utilizado para o tratamento da leishmaniose. A figura 18 representa o número de células vivas nas culturas contendo glucantime (20 µg/mL), TUB (1,8 µM/mL), NBMPR (4 µM/mL) e com a associação TUB-NBMPR (1,8 µM/mL com 4 µM/mL, respectivamente) em comparação com culturas de cada uma das espécies de *Leishmania* na ausência de drogas. Podemos verificar que as culturas com TUB, ou mesmo com a associação TUB-NBMPR apresentaram uma ação antiparasitária muito maior que as culturas em presença de glucantime, pois o número de células vivas após a incubação foi praticamente zero para todas as espécies analisadas (Fig. 18). Novamente, as culturas em presença do inibidor NBMPR comportaram-se de maneira similar as culturas controle (sem droga).

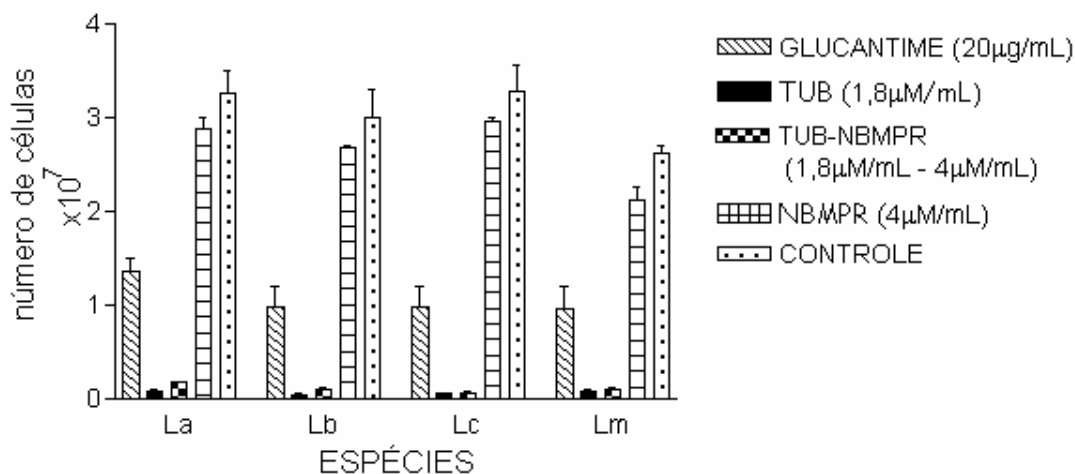


Figura 18. Representação gráfica da ação dos compostos indicados (nas concentrações indicadas) em culturas de promastigotas das espécies de *Leishmania* indicadas. La - *L. (L.) amazonensis*, Lb - *L. (V.) braziliensis*, Lc - *L. (L.) chagasi* e Lm - *L. (L.) major*. Controle: culturas sem drogas.

2. Efeito da associação TUB-NBMPR em culturas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* retiradas de lesão de camundongo infectado por cerca de quatro semanas e depois purificadas, como descrito em Métodos, foram incubadas nas mesmas concentrações utilizadas para as culturas com as formas promastigotas, ou seja: 0,1 a 1,8 µM de TUB, e 0,1 a 4 µM de NBMPR. O mesmo ocorreu nas análises das culturas com a associação TUB-NBMPR, onde utilizamos concentrações crescentes de TUB (0,1 a 1,8 µM), em presença de uma concentração alta, não tóxica e constante de 4 µM de NBMPR.

Nestas culturas, a ação dos compostos foi avaliada de acordo com a capacidade das formas amastigotas purificadas se transformarem em formas promastigotas (Kayser, 2000), o que possibilitava a contagem celular no contador de células (Coulter T890). Verificamos que assim como para as

formas promastigotas, as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* também se mostraram sensíveis a TUB (Fig. 19). Os valores de IC₅₀ calculados a partir das curvas de inibição de crescimento foram de 0,27 μM para TUB e 0,25 μM para a associação TUB-NBMPR, e semelhantes aos valores de IC₅₀ encontrados para as formas promastigotas.

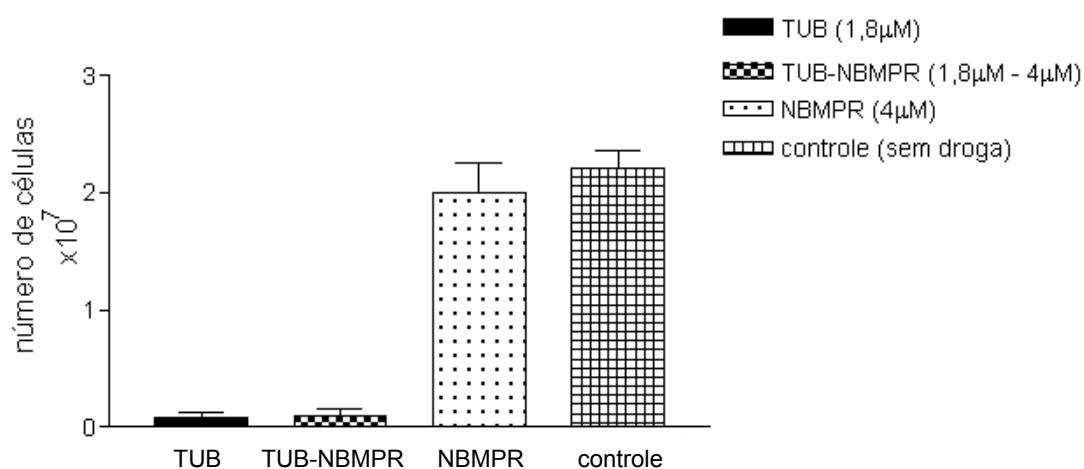


Figura 19. Representação gráfica da ação dos compostos indicados (e nas concentrações indicadas) em culturas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

3. Efeito da associação TUB-NBMPR em interações macrófago - *L. (L.) amazonensis*

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por 24 horas, e em seguida, tratados com TUB, NBMPR e com a associação TUB-NBMPR por 72 horas. Após a interação e tratamento, as lamínulas foram fixadas, coradas com Giemsa e a porcentagem de macrófagos infectados determinada pela contagem de 200 células. O índice de associação, que representa o número

de parasitas que efetivamente infecta os macrófagos, foi determinado para cada experimento, conforme descrito em Métodos.

Ao contrário do verificado nas culturas *in vitro*, notamos que a dose efetiva de TUB para obter uma atividade similar nos parasitas intracelulares deveria ser bem maior que a utilizada nos experimentos anteriores. Considerando a toxicidade celular de TUB, determinamos inicialmente qual a concentração da associação TUB-NBMPR capaz de gerar a menor toxicidade para o macrófago, mantendo a ação antiparasitária intracelular.

Podemos verificar na figura 20, que mostra a variação dos valores do índice de associação em relação às diferentes concentrações dos compostos testados (sempre na relação 1:2 de TUB:NBMPR; TUB variando entre 1-16 μM e NBMPR entre 2-32 μM), que a cultura tratada com de 8 μM de TUB e 16 μM de NBMPR, apresentou diminuição expressiva do índice de associação (de 5,65% para 1,64%), quando comparada com a cultura controle (sem droga). A cultura tratada com 16 μM de TUB e 32 μM de NBMPR, apresentou um índice de associação similar ao anterior (1,35%), o que não justifica o uso por conta da elevada dose de TUB.

Esse fato fica mais evidente comparando as figuras 21-A, B e C, onde podemos observar uma completa alteração da estrutura citoplasmática do macrófago após o tratamento com 8 μM de TUB (Fig. 21-C), em comparação com os controles não tratados (Figs. 21-A e B). Como se esperava, os macrófagos infectados em presença de altas concentrações de NBMPR (16 μM), não apresentaram alterações estruturais, nem tampouco ação antiparasitária (Fig. 21-D).

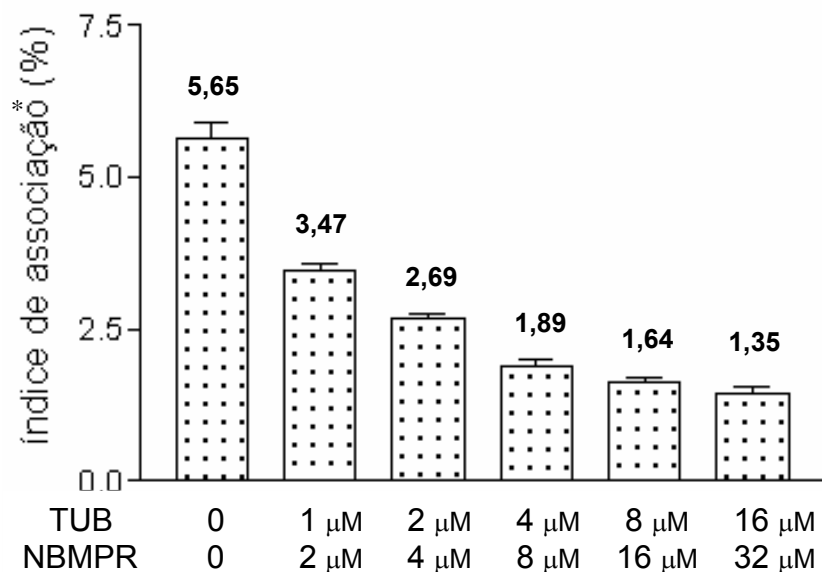


Figura 20. Representação gráfica dos valores do índice de associação obtido nas culturas de macrófagos infectados em presença da associação TUB-NBMPR nas concentrações indicadas.

* O índice de associação médio, representado no alto de cada barra, foi calculado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitas por célula infectada após a contagem (experimentos realizados em triplicata; Rosa et al., 2003).

Por outro lado, quando analisamos o efeito do tratamento da associação TUB-NBMPR (Fig. 21-E), nas mesmas concentrações utilizadas dos experimentos individuais (8 μ M de TUB e 16 μ M de NBMPR), notamos que além da manutenção da integridade celular, observamos também uma diminuição da relação parasitas/macrófago, quando comparado com os macrófagos infectados e não tratados, ou tratados apenas com o inibidor (Figs. 21-B e D, respectivamente).

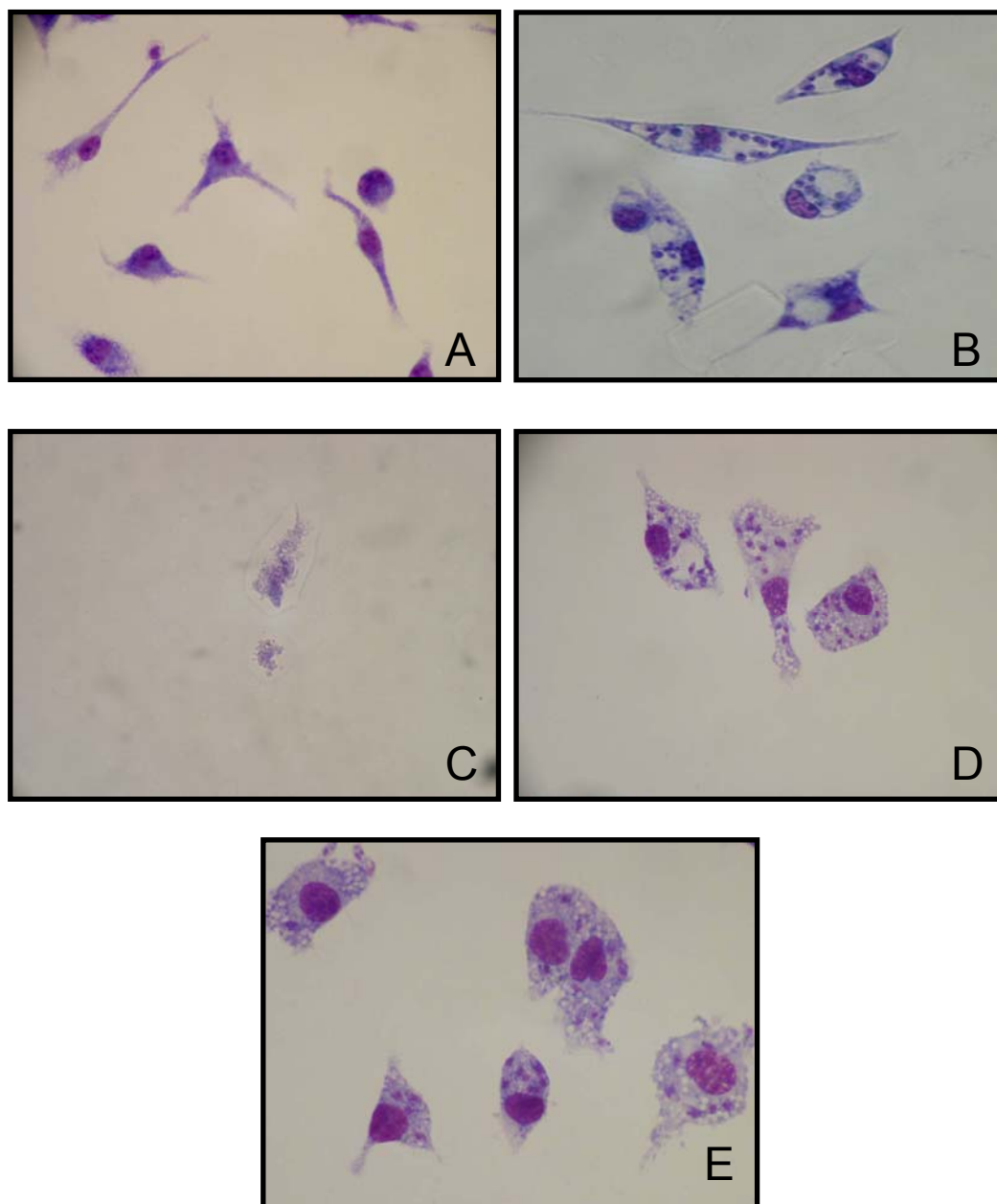


Figura 21. Efeito da associação TUB-NBMPR sobre macrófagos peritoneais de camundongos infectados com células promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. (A) cultura controle com macrófagos não infectados; (B) macrófagos infectados não tratados; (C) macrófagos infectados tratados com 8µM de TUB; (D) macrófagos infectados tratados com 16µM de NBMPR; (E) macrófagos infectados tratados com a associação TUB-NBMPR (8µM-16µM). Aumento de 1000X.

Vale salientar que além do controle de macrófagos infectados e sem drogas (Fig. 21-B), também utilizamos como controle destes experimentos, macrófagos não infectados e tratados nas mesmas condições (dados não mostrados).

4. Efeito da associação TUB-NBMPR na evolução da lesão de leishmaniose cutânea em camundongo BALB/c

Com base nos resultados dos experimentos *in vitro*, restava avaliar se a associação TUB-NBMPR também era eficaz em infecções *in vivo*. Para tanto, camundongos BALB/c foram infectados na pata traseira direita com as formas purificadas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, conforme descrito em Métodos. Após o período de 30 dias para progressão da infecção, os animais foram divididos em quatro grupos de dez camundongos e tratados por sete dias consecutivos com uma dose diária.

O primeiro grupo foi tratado apenas com TUB (na concentração de 5mg/kg). A alta toxicidade para as células mamíferas acarretou em 100% de letalidade já entre o terceiro e o quarto dia do tratamento. Esse resultado está de acordo com os resultados anteriores obtidos nas interações macrófagos – *L. (L.) amazonensis*.

O segundo grupo, recebeu sete doses de 15mg/kg do inibidor de nucleosídeos NBMPR, e comportou-se como o grupo controle, que recebendo sete doses de solução salina, apresentou um aumento

significativo do tamanho da lesão durante os sete dias de tratamento (Fig. 22 e Tab.6).

Já o grupo tratado com sete doses da associação TUB-NBMPR (5mg/kg de TUB e 15mg/kg de NBMPR), além de apresentar uma proteção do efeito letal de TUB (com 100% de sobrevivência entre os dez animais), registrou uma diminuição da progressão da lesão quando comparadas com a progressão das lesões dos grupos controle e tratados com o inibidor NBMPR (Fig. 22 e Tab.6).

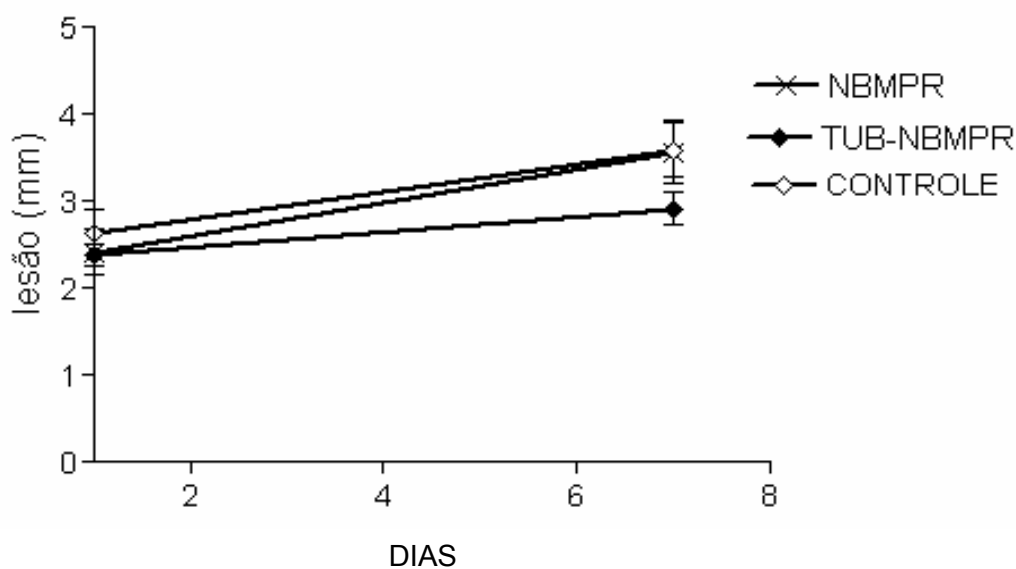


Figura 22. Representação gráfica da evolução da lesão (em mm) dos grupos de dez camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* após o tratamento indicado. O grupo controle (tratamento apenas com solução salina), O grupo NBMPR (tratamento de 15mg/kg) e o grupo de associação TUB-NBMPR (tratamento com 5mg/kg de TUB e 15mg/kg de NBMPR). O grupo tratado apenas com TUB não está representado devido a alta toxicidade do composto.

Tabela 6. Evolução do tamanho da lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*, após tratamento com a associação TUB e NBMPR.

grupos*	dia 1	dia 7	p**
controle	2,65 ± 0,81	3,60 ± 0,99	-
NBMPR	2,43 ± 0,50	3,57 ± 0,73	ns
TUB-NBMPR	2,31 ± 0,33	2,78 ± 0,46	0,03

Média ± desvio padrão do tamanho da lesão (mm) dos grupos de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* após o tratamento indicado.

* Cada grupo compreendeu um (n) de 10 animais.

** Os valores de (p) foram calculados com base no teste *t* de Student, considerando valores não significantes (ns) $p > 0,05$

Apesar de não termos conseguido uma regressão da lesão após o tratamento com a associação TUB-NBMPR, como esperávamos (Fig. 22), a diferença da progressão do tamanho das lesões desse grupo (de 2,31mm para 2,78mm), foi considerada estatisticamente significativa quando comparada com o grupo não tratado (de 2,65 mm para 3,60mm) após os sete dias de seguimento (Tab. 6).

Discussão

I. Identificação e caracterização de dois *loci* de *L. (L.) major* relacionados com resistência a TUB.

Ainda não se conhece com detalhes os alvos moleculares de grande parte dos compostos utilizados no tratamento da leishmaniose. Na busca destes, e eventualmente novos alvos, o nosso grupo utiliza técnicas de amplificação e super-expressão gênica visando o estudo dos mecanismos relacionados com resistência a drogas em *Leishmania* (Cotrim et al., 1999). A utilização de vetores-cosmídios (conhecidos como 'shuttle vectors') capazes de amplificar e super-expressar os genes clonados no inserto é uma importante ferramenta molecular para a caracterização de *loci* do parasita relacionados com resistência a compostos antiparasitários (Cotrim et al., 1999). Essa técnica evita o uso da metodologia de pressão seletiva, onde a identificação dos prováveis alvos de um determinado composto era obtida a partir do cultivo do parasita em concentrações crescentes do composto, o que geralmente seleciona parasitas com mecanismos múltiplos de resistência, dificultando o isolamento de *loci* que realmente estariam envolvidos na resistência (Beverley et al., 1984; Beverley, 1991; Borst e Ouellette, 1995).

Devido ao pouco conhecimento sobre o mecanismo de ação do análogo de purina tóxico tubercidina (TUB) no parasita, foi proposto nesse trabalho o isolamento de genes relacionados com resistência a este composto. A partir de bibliotecas genômicas construídas no vetor-cosmídio cLHYG que tem a capacidade de super-expressão extracromossomal de

genes clonados e indução do aumento do número de cópias, isolamos os cosmídios cosTUB1 e cosTUB2, ambos capazes de conferir resistência a TUB. A identificação desses dois *loci* foi iniciada a partir de deleções geradas por digestão parcial com as enzimas de restrição *KpnI*, para o inserto cosTUB1 (Figs. 2 e 3), e *Apal* para o inserto cosTUB2 (Fig. 9). Todos os DNAs das deleções obtidas foram posteriormente transfectados em promastigotas selvagens de *L. (L.) major* e analisados individualmente em presença de diferentes concentrações de TUB (Figs. 4 e 10). Com a realização dos testes funcionais, conseguimos identificar nesses insertos, duas regiões contendo os prováveis *loci* relacionados com a resistência a TUB em *Leishmania*.

Essa identificação foi mais evidente nos experimentos realizados com o inserto cosTUB1, onde um fragmento *KpnI* de 3,3 kb foi claramente capaz de conferir resistência a TUB após transfecção, amplificação e super-expressão gênica (Fig. 3 e Tab. 1). Notamos ainda que o teste funcional da deleção cosTUB1- Δ *KpnI*-IV, contendo um inserto de 9 kb apresentou um nível de resistência a TUB 2,82 vezes maior que o das células selvagens; maior também do que o verificado para o inserto original de 30 kb do cosTUB1 (Tab. 1). Esses dados estão de acordo com identificações gênicas semelhantes realizadas em nosso laboratório com pentamidina e itraconazol, onde a medida que diminuíamos o tamanho do inserto, conseguíamos sempre um maior nível de resistência ao composto estudado (Cotrim et al., 1999; Coelho et al., 2003).

Outro dado a favor da relação do fragmento *KpnI* de 3,3 kb (conforme dados do genoma de *L. (L.) major*, ver Fig. 6) com resistência a TUB, foi a análise 'in silico' da seqüência de nucleotídeos do inserto cosTUB1. Uma vez determinada a localização do inserto cosTUB1 no cromossomo 31 do genoma de *L. (L.) major* (conforme descrito no item 1.3 de Resultados), identificamos no interior do fragmento *KpnI* de 3,3 kb um gene de 1.455 nucleotídeos, que codifica uma fase de leitura aberta de 485 aminoácidos com uma alta similaridade (77%; Fig. 7) com o gene *TOR* (TOxic nucleoside Resistance), descrita anteriormente como relacionada com a resistência a TUB em *L. (L.) amazonensis* (Kerby e Detke, 1993).

Nesse trabalho, os autores concluem que as células do parasita se tornaram resistentes a TUB devido à diminuição da capacidade de acumular purinas exógenas. Posteriormente, esses mesmos autores sugerem que a diminuição desse acúmulo de purinas estava envolvida com a redução da atividade de transportadores específicos de purina no parasita (Detke, 2007). Nesse sentido TOR teria um papel importante como um possível repressor da transcrição de genes que codificam transportadores de purinas, hipótese sustentada pela diminuição da capacidade de transporte em células que super-expressam TOR, demonstrada por Detke et al. (1997). Outro fator que reforça essa hipótese é o fato de TOR apresentar homologia com o fator de transcrição *Oct-6* de roedores e humanos (Detke et al., 1997), homologia essa confirmada pela recente anotação do produto do gene *TOR* no genoma de *L. (L.) major* como um provável fator de transcrição ('transcription like protein').

Considerando que possuímos um cosmídio contendo o ortólogo de TOR em *L. (L.) major*, e estimulados por esses resultados descritos em *L. (L.) amazonensis*, iniciamos uma análise preliminar sobre o efeito de transportadores de purina em *Leishmania*, visando em um futuro próximo entender melhor o papel de TOR na resistência a TUB. Os primeiros resultados obtidos estão descritos na segunda parte desse trabalho, quando estudamos o efeito de um inibidor específico do transporte de purinas em mamíferos (o NBMPR).

Antes, porém, discutiremos os resultados obtidos na identificação do *locus* relacionado com a resistência a TUB presente no inserto costTUB2. Diferentemente, dos resultados apresentados na identificação do gene *TOR* de *L. (L.) major*, não conseguimos determinar com clareza qual a região do inserto costTUB2 que está relacionada com resistência a TUB. Os resultados dos testes funcionais com as deleções do inserto costTUB2 apontam que o fragmento *Apal* de 9,6 kb presente nos insertos costTUB2 original (de 31 kb), e da deleção costTUB2- Δ *Apal*-III (de 27 kb), deve conter o *locus* relacionado com resistência a TUB para a *Leishmania* (Figs. 9, 10 e Tab. 2). Entretanto, dois fatores contribuíram para dificultar essa análise: 1) Não obtivemos uma deleção capaz de conferir resistência a TUB com um inserto pequeno (menor que 10 kb); e 2) O fragmento *Apal* de 9,6 kb é relativamente grande e, portanto, capaz de conter mais de um *locus* em seu interior (Fig. 9). Seria importante, então gerar e testar funcionalmente, novas deleções do fragmento *Apal* de 9,6 kb.

Por outro lado, utilizando a estratégia de clonagem semelhante à empregada no *costUB1* (Figs. 5 e 11), determinamos que o inserto *costUB2* também estava contido no cromossomo 31 de *L. (L.) major*, porém em região distinta do inserto *costUB1*. A análise 'in silico' da seqüência de nucleotídeos do inserto *costUB2*, revelou a presença de seis fases de leitura aberta majoritárias, três delas relacionadas com o fragmento *Apal* de 9,6 kb (Fig. 12). Ao contrário de *TOR*, constatamos que nenhuma das seis fases de leitura identificadas possuía relação aparente com resistência a TUB. No interior do fragmento *Apal* de 9,6 kb encontramos a região codante de uma proteína desconhecida até o momento (proteína hipotética '1'), e parte dos genes que codificam uma gp63-like e uma succinil-diaminopimelato-desuccinilase-like (SDD-like) (Fig. 12). A SDD-like está relacionada com a síntese e metabolismo de aminoácidos (Dea-Auyuela et al., 2006) e não tem, aparentemente, relação estrutural conhecida com resistência a drogas. Vale ressaltar ainda que a região codante da SDD-like está totalmente contida no inserto de 27 kb da deleção *costUB2-ΔApal-III*, que não conferiu níveis de resistência a TUB maiores que os obtidos após a transfecção do DNA do inserto original (Figs. 9 e Tab. 2).

Já a gp63, destaca-se como uma das principais glicoproteínas de superfície encontrada nas formas promastigotas de *Leishmania*, assim como o lipofosfoglican (LPG) e o glicosilinositolfosfolipídios (GIPLs) (Yao et al., 2003). Diversas funções foram sugeridas para a gp63 de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, entre elas, adesão celular às células mamíferas. Entretanto, a gp63 é predominantemente expressa nas formas evolutivas

encontradas no inseto, e pouco se sabe sobre suas funções no inseto vetor. Estima-se que cada promastigota de *L. (L.) major*, em sua fase estacionária, tenha 500.000 cópias da gp63, constituindo cerca de 1% de todo conteúdo protéico (Bouvier et al., 1985). Sabe-se também que homólogos da gp63 de tripanossomatídeos inferiores desempenham um papel essencial na nutrição, assim como na interação com células epiteliais do inseto (Santos et al., 2006). Até o momento não se tem nada descrito que possa relacionar uma gp63-like com resistência a drogas.

Em vista disso, subclonamos a região codificadora da proteína hipotética '1' (Fig. 12) para análise em presença de TUB. A estratégia de subclonagem para obtenção das duas construções contendo o *locus* da proteína hipotética '1' está representada na figura 13. Infelizmente testes funcionais em presença de diferentes concentrações de TUB não conferiram os níveis esperados de resistência após a transfecção e amplificação do número de cópias das duas construções obtidas (Fig. 14 e Tab. 3).

Concluimos com base nesses resultados que nenhuma das três fases de leitura presentes no interior do fragmento *Apal* de 9,6 kb (Fig. 12), foi capaz de gerar (sozinha) níveis de resistência maiores que os obtidos após a transfecção do DNA do *costUB2* original (razão de resistência de 3,78; Tab. 2).

Outra abordagem seria deletar uma pequena região do gene da proteína hipotética '1' e analisar essa construção em presença de TUB. Essa deleção no interior da proteína inviabilizaria a síntese de uma proteína funcional, interferindo no nível de resistência a TUB determinado nos testes

funcionais com as construções contendo o gene íntegro (pSNBR/6,8kb *Clal-HindIII*; Fig. 14 e Tab. 3). Na verdade, essa construção já foi gerada, simplesmente retirando um fragmento *Eco47III* de 4,4 kb do interior do inserto pSNBR/6,8kb *Clal-HindIII* após digestão e re-ligação das extremidades com *T4 DNA Ligase*. O DNA dessa construção foi transfectado em células LmA1, e as células ainda se encontram em processo de amplificação do número de cópias do DNA transfectado para serem analisadas em presença de TUB.

Existe ainda a hipótese de alguma outra proteína localizada a montante do fragmento *Apal* de 9,6 kb poder atuar como um ativador transcricional, conforme proposto por MacPherson et al. (2005). Nesse trabalho os autores descrevem dois genes, *Upc2p* e *Ecm22p*, respectivamente ativadores de transcrição em *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, que interferem na expressão de genes relacionados com a síntese de ergosterol. Uma deleção no gene *Upc2p* sensibiliza as células de *C. albicans* aos anti-fúngicos fluconazol ou cetoconazol, e, inversamente, a super-expressão do gene *Upc22p* aumenta a resistência a estes compostos em *S. cerevisiae*.

Foi feita uma análise 'in silico' da região a montante do fragmento *Apal* de 9,6 kb, contida no interior do inserto de 31 kb do cosTUB2 original, e não encontramos nenhuma seqüência que possa estar associada com uma proteína de atividade transcricional. Mesmo assim, temos como perspectiva futura para comprovar esta hipótese, a obtenção de uma construção contendo a região que compreende a junção dos fragmentos *Apal* de 4,5 e

de 9,6 kb (Fig. 9), a única região contida no inserto original não avaliada isoladamente nos testes funcionais em presença de TUB.

II. Eficácia da associação de TUB com um inibidor do transporte de nucleosídeos de mamíferos (NBMPR) em *Leishmania* spp.

O efeito antiparasitário de muitos análogos purínicos, entre eles a tubercidina (TUB) é conhecido (el Kouni, 2003), sendo que a toxicidade de TUB também está relatada para o hospedeiro mamífero (el Kouni, 1991). Entretanto, esta toxicidade pode ser revertida com a associação de um inibidor do transporte de nucleosídeos específico para células mamíferas (el Kouni, 2003), como por exemplo, nitrobenziltioinosina (NBMPR), que tem a capacidade de se ligar apenas aos sítios de transporte de nucleosídeos de mamíferos, protegendo-os, assim, da ação tóxica de TUB sem interferir na atividade antiparasitária deste análogo purínico. A literatura já descreveu muitos trabalhos referentes a esta associação em *Schistosoma* (el Kouni, 1991) e *Trypanosoma gambiensi* (Ogbunude e Ikediobi, 1982). Até hoje nada se sabe sobre a eficácia desta associação em *Leishmania*.

Assim, nessa segunda parte da dissertação, foi descrito o efeito de TUB em associação com o inibidor NBMPR em quatro espécies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major*.

Inicialmente demonstramos que a associação TUB-NBMPR é eficaz, tanto nas culturas de promastigotas das quatro espécies de *Leishmania*

analisadas, como nas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Figs. 18 e 19). Esses resultados eram de certa forma esperados em vista da conhecida toxicidade celular de TUB. O fato novo foi a comprovação de que o inibidor NBMPR não apresenta nenhum efeito tóxico para as células de *Leishmania*, mesmo em altas concentrações (Figs. 16 e 19).

Entretanto o nosso desafio principal foi avaliar a toxicidade desses compostos nas infecções intracelulares características da patogenia da leishmaniose, já que os trabalhos da literatura só descrevem o efeito da associação TUB-NBMPR em culturas de parasitas extracelulares (Ogbunude e Ikediobi, 1982; el Kouni, 1991). Assim, analisamos se a associação TUB-NBMPR era capaz de atuar especificamente nas células do parasita mesmo quando infectando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Primeiramente, constatamos que a dose efetiva de TUB capaz de inibir 50% do crescimento celular nos parasitas intracelulares deveria ser bem maior que a utilizada nas culturas com as formas pro e amastigotas, respectivamente cerca de 2 μM e 0,5 μM (Figs. 17 e 20). No entanto, como já foi observado em 'Resultados', o tratamento com altas concentrações de TUB promove não só a eliminação total dos parasitas, como também uma completa alteração da estrutura citoplasmática do macrófago (Fig. 21-C), o que não ocorre quando os macrófagos infectados foram tratados com o inibidor NBMPR (Fig. 21-D).

Por outro lado, e como esperávamos o tratamento dos macrófagos infectados com a associação TUB-NBMPR nas concentrações de 2-4 μM ; 4-

8 μM ; 8-16 μM e 16-32 μM (Fig. 20), promoveu uma diminuição expressiva do índice de associação (respectivamente para 2,69%; 1,89%; 1,64% e 1,35%), quando comparados com a cultura de macrófagos infectados sem tratamento (5,65%). Mais um dado importante, é que até em tratamentos com altas concentrações (8 μM de TUB com 16 μM de NBMPR) não verificamos uma alteração evidente da estrutura celular da célula hospedeira (Fig. 21-E), como ocorreu quando os macrófagos infectados foram tratados apenas com TUB (Fig. 21-C).

Entretanto, uma pergunta básica foi levantada. Se o inibidor NBMPR bloqueia a entrada de TUB na célula mamífera, como que ele poderia agir nas formas amastigotas localizadas no interior dos macrófagos de camundongo?

Na verdade, acreditamos que realmente o inibidor NBMPR impeça a entrada de TUB no interior do macrófago, e que a ação antiparasitária verificada em nossos resultados ocorra apenas na fase de rompimento do macrófago e conseqüente liberação de formas amastigotas no meio de cultura contendo altas concentrações de TUB (acima de 1 μM). Dessa forma, não ocorreria (ou estaria bem diminuída) a infecção de novas células, acarretando, portanto, em uma progressão mais lenta do processo infeccioso.

Essa hipótese está de acordo com resultados verificados após o tratamento dos macrófagos infectados com a associação TUB-NBMPR na proporção 1:2 (TUB:NBMPR) (Figs. 20 e 21). Primeiro, na análise desses

experimentos, não observamos a cura total da infecção no período de 72 horas de tratamento. Segundo, demonstramos apenas uma diminuição do número de amastigotas intracelulares, acompanhada também de uma diminuição do número de macrófagos infectados. A diminuição do número de macrófagos pode ter ocorrido pelo rompimento celular que ocorre como consequência do crescimento parasitário. A diminuição do número de parasitas é explicada pela simples diminuição do processo infeccioso já referido. Infelizmente, o tratamento não foi continuado por um período maior, a fim de melhor validar essa hipótese.

No entanto, a relação (1:2) utilizada nas concentrações na associação TUB-NBMPR está adequada, já que o inibidor NBMPR (nessa proporção) foi capaz de bloquear a entrada de TUB na célula, mantendo a integridade do macrófago. Outro dado a favor da eficácia da inibição do NBMPR foi a ação antiparasitária quase inexistente, observada no interior do macrófago, uma vez que uma pequena concentração de TUB (0,5 μ M; Fig. 17) já seria capaz de inibir fortemente o crescimento do parasita, o que não ocorreu.

A hipótese da ausência ou pequena atividade de TUB no interior do macrófago e conseqüente progressão lenta do processo infeccioso também pode explicar os resultados verificados no tratamento de camundongos infectados e tratados com a associação TUB-NBMPR. Aqui a progressão lenta da patogenia é observada pelo retardo do desenvolvimento do tamanho da lesão quando comparado com o grupo controle ou o grupo tratado apenas com NBMPR (Fig. 22). Mais uma vez não observamos a cura

da infecção, o que poderia ter ocorrido se o tratamento tivesse continuado por um período maior que sete dias.

Nos experimentos *in vivo*, no entanto, a relação 1:2 (TUB:NBMPR) parece não ter sido eficaz como na cultura com macrófagos infectados. Em experimentos anteriores (dados não mostrados), onde tratamos os animais infectados com a associação de 5mg/kg de TUB com 10mg/kg de NBMPR, verificamos regressão da infecção, com diminuição do tamanho da lesão. Porém, dois animais de um grupo inicial de cinco morreram antes do fim dos sete dias de tratamento, sugerindo que nesse caso, a dose de NBMPR não foi suficiente para proteger o hospedeiro da toxicidade de TUB. Baseados nestes resultados, aumentamos a concentração de NBMPR para 15mg/kg mantendo TUB com 5mg/kg e verificamos uma melhor proteção das células do hospedeiro com nenhuma letalidade no grupo. Por outro lado, não houve regressão da lesão e muito menos a cura da patologia. Observamos apenas uma diminuição na progressão da lesão (Fig. 22 e Tab. 6), ou seja, uma diminuição do processo patogênico, semelhante ao observado nos experimentos com os macrófagos infectados.

Assim, podemos concluir que temos pela frente uma série de análises a serem feitas para podermos chegar a uma conclusão mais evidente com respeito a eficácia dessa associação no crescimento do parasita.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir:

1.) O sistema de amplificação e super-expressão gênica em parasitas resistentes a determinados compostos anti-parasitários contribui para o entendimento do mecanismo de ação de alguns destes compostos;

2.) Com a utilização deste protocolo foi possível identificar dois *loci* capazes de conferir resistência a TUB, um já descrito como *TOR* e outro que vai ser caracterizado em trabalhos futuros;

3.) A associação TUB-NBMPR é eficaz também para *Leishmania*, devido a ação antiparasitária de TUB e a significativa proteção de NBMPR frente à toxicidade de TUB.

Referências Bibliográficas

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

Ashford R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 30(12-13):1269-1281; 2000.

Barbieri C.L., Giorgio S., Merjan A.J.C., Figueiredo E.N. Glycophingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. *Infection and Immunity*. 61(5): 2131-2137; 1993.

Basselin M., Denise H., Coombs G.H., Barrett M.P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46(12): 3731-3738; 2002.

Bates P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*. 79(2): 215-218; 1994.

Bello A.R., Nare B., Freedman D., Hardy L., Beverley S.M. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(24): 11442-11446; 1994.

Berman J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*. 24(4): 684-703; 1997.

De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografia*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Berman J.D., Lee L.S., Robins R.K., Revankar G.R. Activity of purine analogs against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 24(2): 233-236.

Beverley S.M., Clayton C.E. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by eletroporation. *Protocols in Molecular Parasitology.* 21:333-348; 1993.

Beverley S.M. Gene amplification in *Leishmania*. *Annual Review of Microbiology.* 45:417-444; 1991.

Beverley S.M., Coderre J.A., Santi D.V., Schimke R.T. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell.* 38(2): 431-439; 1984.

Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.* 7(6):1513-1523; 1979.

Borst P., Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual Review Microbiology.* 49:427-460; 1995.

Bouvier J., Edges R.J., Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *The Journal of Biological Chemistry.* 260(29): 15504-15509; 1985.

Bray P.G., Barret M.P., Wards S.A., de Koning H.P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends of Parasitology.* 19(5): 232-239; 2003.

Callahan H.L., Beverley S.M. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *Journal of Biochemical Chemistry*. 267(34): 24165-24168; 1992.

Coderre J.A., Beverley S.M., Schimke R.T., Santi D.V. Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80(8): 2132-2136; 1983.

Coelho A.C., Beverley S.M., Cotrim P.C. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Molecular Biochemical Parasitology*. 130(2): 83-90; 2003.

Chung C.T., Miller R.H. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Research*. 16(8): 3580; 1988.

Cotrim P.C., Garrity L.K., Beverley S.M. Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(53):37723-37730; 1999.

Croft S.L., Sundar S., Fairlamb A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Review*. 19(1): 111-126; 2006.

Croft S.L., Coombs G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*. 19(11): 502-508; 2003.

Croft S.L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*. 6(11): 899-905; 2001.

Cruz I., Nieto J., Moreno J., Cañavate C., Desjeux P., Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian Journal Medical Research*. 123(3): 357-388; 2006.

Cruz A.K., Beverley S.M. Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature*. 348(6297): 171-173; 1990.

Dea-Ayuela M.A., Rama-Iñiguez S., Bolás-Fernandez F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics*. 6(14): 4187-4194; 2006.

Descoteaux A., Garraway L.A., Ryan K.A., Garrity L.K., Turco S.J., Beverley S.M. Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. In: Adolph K.W. *Methods in Molecular Genetics*. Academic Press: 22-48; 1994.

Desjeux P. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clinics in Dermatology*. 17(3):317-325; 1999.

Detke S. TOR-induced resistance to toxic adenosine analogs in *Leishmania* brought about by internalization and degradation of the adenosine permease. *Experimental Cell Research*. 313(9): 1963-1978; 2007.

Detke S. Identification of a transcription factor like at the TOR locus in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 90: 505-511; 1997.

Dovey H.F., McKerrow J.H., Wang C.C. Action of Tubercidin and other adenosine analogs on *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 16(2):185-198; 1985.

el Kouni M.H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology & Therapeutics*. 99(3): 283-309; 2003.

el Kouni M.H. Efficacy of combination therapy with tubercidina and nitrobenzylthioinosine 5'- monophosphate against chronic and advanced stages of schistosomiasis. *Biochemical Pharmacology*. 41(5): 815-820; 1991.

el Kouni M.H., Messier N.J., Cha, S.M. Treatment of schistosomiasis by purine nucleoside analogues in combination with nucleoside transport inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 36(22): 3815-3821; 1987.

el Kouni M.H., Knopf P.M., Cha S.M. Combination therapy of *Schistosoma japonicum* by Tubercidin and Nitrobenzylthioinosine 5'- Monophosphate. *Biochemical Pharmacology*. 34(21):3921-3923; 1985.

el Kouni M.H., Diop D., Cha S. Combination therapy of schistosomiasis by tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5'-monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80(21): 6667-6670; 1983.

Freire M., Badaro F., Avelar M.E., Luz K., Nakatani M.S., Teixeira R., Martins Netto E., Badaro R. Efficacy and tolerability of liposomal Amphotericin B (Ambisome) in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. *Brazil Journal of Infectious Disease*. 1(5): 230-240; 1997.

Griffiths M., Beaumont N., Yao S.Y., Sundaram M., Boumah C.E., Davies A., Kwong F.Y., Coe I., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nature Medicine*. 3(1): 89-93; 1997.

Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S.L., Desjeux P., Wasunna M.K., Bryceson A.D. Visceral Leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a propose research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*. 2(8):494-501; 2002.

Hammond D.J., Gutteridge W.E. Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 13(3): 243-261; 1984.

Hochstadt J. Adenine phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymology*. 51:558-567; 1978.

Hyde R.J., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Molecular Membrane Biology*. 18(1): 53-63; 2001.

Kapler G.M., Coburn C.M., Beverley S.M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Molecular and Cellular Biology*. 10(3): 1084-1094; 1990.

Kayser, O. Nanosuspensions for the formulation of aphidicolin to improve drug targeting effects against leishmania infected macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*. 196(2):253-256; 2000.

Kerby B.R., Detke S. Reduced purine accumulation is encoded on an amplified DNA in *Leishmania mexicana amazonensis* resistant to toxic nucleosides. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 60(2): 171-185; 1993.

Landfear S.M., Ullman B., Carter N.S., Sanchez M.A. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryotic cell*. 3(2): 245-254; 2004.

LeBowitz J.H., Coburn C.M., McMahon-Pratt D., Beverley S.M. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(24): 9736-9740; 1990.

MacPherson S., Akache B., Weber S., Deken X.D., Raymond M., Turcotte B. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (5): 1745-1752; 2005.

Minodier P., Noel G., Blanc P., Uters M., Retornaz K, Grnier J.M. Management of cutaneous leishmaniasis in adults and children. *Medecine Tropicale*. 65(5): 487-495; 2005.

Mishra J., Saxena A., Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current Medicinal Chemistry*. 14(10): 1153-1169; 2007.

Mukherjee A., Padmanabhan P.K. Sahani M.H., Barret M.P., Madhubala R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 145(1): 1-10; 2006.

Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 366(9496): 1561-1577; 2005.

Ogbunude P.O.J., Ikediobi C.O. Effect of nitrobenzylthioinosinate on the toxicity of tubercidina and ethidium against *Trypanosoma gambiense*. *Nigerian Institute for Trypanosomiasis Research*. 39(3): 219-224; 1982.

Olliaro P.L., Bryceson A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today*. 9(9):323-328; 1993.

Olmo A., Arrebola R., Bernier V., Gonzalez-Pacanowska D., Ruiz-Perez L.M. Co-existence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Research*. 23(15): 2856-2864; 1995.

Ouellette M., Drummelsmith J., Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*. 7(4-5): 257-266; 2004.

Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicine & International Health*. 6(11) 874-882; 2001.

Ouellette M., Borst P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoa parasite *Leishmania*. *Research of Microbiology*. 142(6): 737-746; 1991.

Pereira, W.K.V., Lonardon M.V.C., Grespan R., Caparroz-Assef S.M., Cuman R.K.N., Bersani-Amado C.A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Infection*. 51(2): 157-164; 2005.

Rey L. *Parasitologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rosa M.S.S., Filho R.R.M., Bizzo H.R., Rodriguez I.A., SOARES, R.M.A.; PADRÓN, T.S.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S.; Antileishmanial activity of a Linalool-Rich essential oil from *Croton cajucara*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1895-1901; 2003.

Robak T. Robak T., Korycka A., Kasznicki M., Wrzesien-Kus A., Smolewski P. Purine nucleoside analogues for the treatment of hematological malignancies: pharmacology and clinical applications. *Current Cancer Drug Targets*. 5(6): 421-444; 2005.

Roberts C.W., Mcleod R., Rice D.W., Ginger M., Chance M.L., Goad L.J. Fatty acid and sterol metabolism: potencial antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 126(2): 129-142; 2003.

Ryan K.A., Dasgupta S., Beverley S.M. Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene*. 131(1): 145-150; 1993.

Sanchez M.A., Tryon R., Pierce S., Vasudevan G., Landfear S.M. Functional expression and characterization of a purine nucleobase transporter gene from *Leishmania major*. *Molecular Membrane Biology*. 21(1): 11-18; 2004.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12):5463-5467; 1977.

Santos A.L.S., Branquinha M.H., D'ávila-Levy C.M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78(4): 687-714; 2006.

Segovia M. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 88(2): 123-130; 1994.

Senft A.W., Crabtree G.W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. *Pharmacology Therapy*. 20(3): 341-356; 1983.

Singh S. New development in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal Medical Research*. 123(3):311-330; 2006.

Singh S., Mohapatra D.P., Sivakumar R. Successful replacement of fetal calf serum with human urine for in vitro culture of *Leishmania donovani*. *The Journal of Communicable Diseases*. 32(4): 289-294; 2000.

Soto J., Soto P. Oral miltefosine to treat leishmaniasis. *Biomedica*. 26: 207-217; 2006.

Soto J., Arana B.A., Toledo J., Rizzo N., Vega J.C., Diaz A., Luz M., Gutierrez P., Arboleda M., Berman J.D., Junge K., Engel J., Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Disease*. 38(9): 1266-1272; 2004.

Steck E.A. The leishmaniasis. *Progress in Drug Research*. 18: 289-351; 1974.

Sundar S., Chatterje M. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. *Indian Journal Medical Research*. 123(3):345-352; 2006.

Ullman B., Carter D. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoa infections. *Infectious Agents and Disease*. 4(1):29-40; 1995.

Vasudevan G., Ullman B., Landfear S.M. Point mutations in a nucleoside transporter gene from *Leishmania donovani* confer drug resistance and alter substrate selectivity. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(11): 6092-6097; 2001.

Xing F., Hiley S.L., Hughes T.R., Phizicky E.M. The specificities of four yeast dihidrouridine synthases for cytoplasmic tRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(17):17850-17860; 2004.

Wyllie S., Cunningham M.L., Fairlamb A.H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*. 279(38): 39925-39932; 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/TROPICAL DISEASE RESEARCH (WHO/TDR) 2008. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>.

Yao c., Donelson J.E., Wilson M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 132(1): 1-16; 2003.

Zimmerman T.P. Wolberg G. Duncan G.S. Metabolism of tubercidin and formycin to their 3':5'-cyclic nucleotides in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 253(24): 8792-8797; 1978.

Anexo I

**Efficacy of the tubercidin anti leishmania action
associated
with an inhibitor of the nucleoside transport**

J. I. Aoki; E. H. Yamashiro-Kanashiro, D. C. C. Ramos; P. C. Cotrim*

Instituto de Medicina Tropical, *Depto. Doenças Infecciosas e Parasitárias –
Universidade de Sao Paulo; Sao Paulo; Brazil.

***Corresponding author:** Paulo C. Cotrim

Instituto de Medicina Tropical – Universidade de Sao Paulo

Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470 - 4º andar; São Paulo-SP, Brazil -

05403-000

E-mail: pccotrim@usp.br

Keywords: leishmania, tubercidin, nitrobenzylthioinosine, antiparasite effect,
inhibitor purine transport.

Abstract.

Tubercidin (TUB) is an adenosine analog with potent antiparasite action, unfortunately associated with severe host toxicity. Prevention of TUB toxicity can be reached associating nitrobenzylthioinosine (NBMPR), an inhibitor of the purine nucleoside transport, specifically target to the mammals cells. It was demonstrated that this nucleoside transport inhibitor has no significant effect in the *in vitro* uptake of TUB by *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma gambiense*. Seeking to evaluate if the association of these compounds is also effective against leishmania, we analyzed the TUB-NBMPR association *in vitro*-cultures of promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) major* and *L. (V.) braziliensis*; as well as in cultures of amastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*; mice macrophages infected with *L. (L.) amazonensis*; and *in vivo* tests, in BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*. We demonstrated that TUB-NBMPR association can be effective against leishmania cells protecting mammalian cells from TUB toxicity.

Introduction.

Leishmaniasis is an emergent parasitic disease with a large spectrum of clinical symptoms caused by protozoa of the genus *Leishmania*. It is estimated that 350 million people live in the risk areas, 12 million are infected and 1.5 to 2 million new cases occur each year (WHO 2008). The research for new antileishmanial drugs have been main motivated by the development of resistance acquired to drugs used in the treatment, as well as toxicity

verified by the high dose and duration regimens indicated for most of these compounds (Croft and Coombs 2003; Oliaro and Bryceson 1993).

The cell biology of mammalian and leishmania cells differs considerably and this distinctness extends at the biochemical level (el Kouni 2003). It is well known that leishmania, as well as other parasitic protozoa and worms, are unable of *de novo* synthesis of the purine ring, being dependent of surface nucleoside from host (el Kouni 1991; Hammond and Gutteridge 1984). One way to interfere in the purine salvage pathways would be to use one of the numerous purine cytotoxic analogs available, as tubercidin (TUB). Although the powerful antiparasite action of TUB, it is also associated with severe host toxicity, making impracticable their use in human beings (Berman et al. 1983; el Kouni 1991; Ogbunode and Ikediobi 1982).

Nitrobenzylthioinosine (NBMPR) is a specific inhibitor of nucleoside transport for mammalian cells (el Kouni 2003). Analysis of the TUB-NBMPR association in cultures of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma gambiense* has shown a selective TUB toxicity directed against parasite cells (el Kouni 1991; Ogbunode et al. 1991). This indicated that NBMPR binds reversibly and specifically to the nucleoside transporter of mammalian cells, protecting them of the TUB toxicity, without intervening with the TUB antiparasite action (el Kouni 1991; Ogbunode et al. 1991).

There is no information on the efficacy of this association against *in vitro* or *in vivo* leishmania cell cultures. Based on that, we tested here the efficacy of the TUB-NBMPR association in cultures of different leishmania

species, as well as on the interaction of *L. (L.) amazonensis* promastigotes with mice macrophages as well as *in vivo* *L. (L.) amazonensis* infection.

Materials and Methods.

Animals and Chemicals

BALB/c mice (22-26g) were obtained from the Bioterism Center of the Instituto de Medicina Tropical, Sao Paulo University (IMT-USP) and previously maintained in cages with sterilized absorbent environment, receiving water and food *ad libitum*. Tubercidin (TUB) and Nitrobenzylthioinosine (NBMPR) were obtained from the Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Glucantime was provided by Dr. Angelo Lauletta Lindoso, Sao Paulo, Brazil.

Promastigotes issues

Promastigotes forms of *L. (L.) major* (MHOM/1L/80/Friedlin), *L. (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46) and *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) were maintained in M199 liquid media supplemented with 10% fetal calf serum (Kapler et al. 1990) and 2% human urine (Singh et al. 2000) at 26°C. About 1×10^6 promastigotes cells were separately incubated in 24 well plates (Corning) at 26°C for 72 hours in the presence of increasing concentrations of TUB (0.1–1.8µM) and NBMPR (0.1–4µM). The association TUB-NBMPR was analyzed at the same conditions in cultures containing a constant NBMPR concentration (4µM) and

different concentrations of TUB ranging from 0.1 to 1.8 μ M. The number of cells in each culture was estimated, by counting in Neubauer chamber and calculation of the IC₅₀ (drug concentration responsible for a 50% cell number inhibition).

Amastigotes issues

Amastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* were obtained from wounded footpads of infected BALB/c mice. After 30 days of infection, mice were sacrificed, footpads and wounded skin removed, and the remaining tissue homogenized in M199 medium containing 10% fetal calf serum. The resulting suspension was centrifuged at 3,200xg for 10 minutes to eliminated cellular debris, rendering a final pellet contained purified amastigotes free of other cells (Barbieri et al. 1993;Pereira et al. 2005). The antiparasite effect of TUB and NBMPR were performed on these purified amastigotes in cultures at 26°C for 72 hours in the same concentrations described for promastigotes cells. Similarly, the effectiveness (IC₅₀ calculation) was determinate after counting the promastigotes originated from the development of the surviving amastigotes cells (Kayser 2000).

Promastigotes-macrophages interaction issues

Peritoneal macrophages were collected from BALB/c mice in RPMI 1640 medium. About 5x10⁵ cells were incubated at 37°C for 24hs in a 13mm diameter coverslip placed in a 24 well sterile culture plates, maintained in a

humid atmosphere containing 5% CO₂. Non-adherent cells were removed by rinsing the coverslips with PBS and macrophages culture was infected with *L. (L.) amazonensis* promastigotes from stationary growth phase (5 parasite cells per macrophage). Infected cells were incubated with increasing concentrations of TUB (1-16µM) and NBMPR (2-32µM) and cultures evaluated determining the percentage of infection after counting 200 Giemsa stained macrophages. The association index was determinate by multiplying the percentage of infected macrophages by the mean number of parasites per infected cell (do Socorro et al. 2003;Pereira et al. 2005).

In vivo L. (L.) amazonensis infection issues

The right footpads of 40 BALB/c mice were subcutaneously inoculated with 1×10^7 cells of *L. (L.) amazonensis* purified amastigotes diluted in 100µL of M199 media; the same volume of M199 was inoculated in the left footpad as a control. After 30 days mice were separated in four groups (10 animals each), when started the seven daily intra-peritoneal treatment. The first group received saline solution, the second group received TUB (5mg/kg) alone, the third group received NBMPR (15mg/kg) alone and the fourth group received TUB (5mg/kg) – NBMPR (15mg/kg) association. Footpad swelling was monitored by caliper (Mitutoyo – Japan) at the first and the seventh day after treatment. Results were expressed based on the footpad increase volume compared to the initial volume. The final result was obtained by subtracting the value of the footpad inoculated with the parasites from the value of the control footpad (Pereira et al. 2005).

Results.

Effectiveness of TUB-NBMPR association in promastigotes cultures of *Leishmania spp.*

As expected, TUB is a potent anti-parasite agent for all leishmania species tested, when compared with the same cultures treated with glucantime (20µg/mL), the drug used to treat human cases of leishmaniasis (Murray et al. 2005). No significant differences were verified when cultures of the four species of *Leishmania* tested without drug, were compared with individual cultures containing 4µM of the mammalian inhibitor of nucleoside transport, NBMPR, as expected (Fig. 1). On the other hand, when the same control cultures were compared with cultures containing TUB (1.8µM) and the association of TUB (1.8µM) plus NBMPR (4µM), we confirmed that TUB, at this concentration, has a potent antiparasite action for all *Leishmania* species tested. It is interesting to note that the TUB-NBMPR association has almost no interference at the TUB activity, maintaining the same level of antiparasite activity verified on the TUB experiments.

Effectiveness of TUB-NBMPR association in amastigotes cultures of *L. (L.) amazonensis*

Similarly as promastigotes experiments, purified amastigotes forms were incubated in the presence of increasing concentrations of TUB and NBMPR (from 0.1 to 1.8µM), as well as TUB-NBMPR association using a 4µM constant NBMPR concentration and increasing TUB concentrations (from 0.1 to 1.8µM). After differentiation of the surviving amastigotes cells in the

culture, the viable promastigotes originated were counting and the IC₅₀ value calculated. Figure 2 represents the inhibition growth curves for each experiment, showing similar results as verified for promastigotes analysis. While the cultures in the presence of NBMPR shown a similar growing pattern as the verified for the control culture without drug, the cultures incubated with TUB alone, as well as cultures containing the TUB-NBMPR association present a potent antiparasite effect for these cells.

Effectiveness of TUB-NBMPR association in the interaction *L. (L.) amazonensis* - macrophage

We determine the better concentration of the association aiming at the better effectiveness against intracellular parasites present in BALB/c mice peritoneal macrophage infected with promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*. A constant relationship of 1:2 (TUB:NBMPR) varying from 1µM to 16µM of TUB and 2µM to 32µM of NBMPR were used. Results were expressed by the association index (number of parasites that truly infected each macrophage), shown a constant decrease on the parasite infection, from 5.65% from control cultures, to 1.35% for cultures incubated with 16µM:32µM of TUB-NBMPR association (Fig. 3).

However, treatments with TUB concentrations higher than 2µM destroys the whole cytoplasm structure of the macrophage (Fig. 4C). On the other hand, when the same infected cells were treated with a 4 times higher dose of TUB (8µM) in association with NBMPR 16µM, macrophages remain intact (Fig. 4D), suggesting that the NBMPR inhibitor was capable to protect these mammal

cells from the TUB toxicity. Macrophages infected and treated with high NBMPR dose (16 μ M) presented a similar pattern as control cultures not treated (Figs. 4 A and 4-B).

Effectiveness of TUB-NBMPR association in the *in vivo* infection

Lesions were monitored by 30 days after subcutaneous inoculation of purified *L. (L.) amazonensis* amastigotes into the mouse footpad. After this period, daily treatments were carried out for seven days for each group of 10 mice. First, we verified that TUB-NBMPR association (at 5mg/kg:10mg/kg concentrations; 1:2 relation) maintained TUB toxicity with two out of five deaths on the group, besides a decrease of the lesion diameter (data not show). To get a 100% animal protection we increase the NBMPR inhibitor concentration to 15 mg/kg.

Mice from control group, as well as the group that receive NBMPR at 15mg/kg, developed larger lesions after 7 days treatment with small differences in the lesion diameter (3.60mm and 3.57mm, respectively) (Table 1). On the other hand, mice treated with the TUB-NBMPR association (5mg/kg:15mg/kg), presented a minor and statistically significant development of the lesion diameter when compared with the lesions evolution of the control mice above. While lesions of the group treated with the TUB-NBMPR association had an average increase of 0.47mm (from 2.31mm to 2.78mm after 7 days treatment), lesions from the control groups increased in the same period approximately 2 times more (0.95mm and 1.14mm). The group treated only with TUB at 5mg/kg presented high levels of toxicity and were not reported.

Discussion

A rational strategy for therapeutic exploitation of parasitic diseases can be based on identification of fundamental biochemical differences between the parasite and its mammalian host, like the purine metabolism. Leishmania and other protozoan parasites are unable to synthesizing purine nucleotides *de novo* and must salvage them from the host (el Kouni 1991;Hammond and Gutteridge 1984). The transport of preformed host purines across parasite or host membranes is mediated by genus specific nucleoside transporter proteins (Landfear et al. 2004). Therefore, transporters and enzymes responsible for the salvage of purines in parasite constitute excellent potential target for chemotherapy against these organisms (el Kouni 2003).

Tubercidin (TUB), a purine toxic analogue, can be considering as a potential antiparasitic agent if co-administrated with Nitrobenzylthioinosine (NBMPR), a specific inhibitor of the mammalian nucleoside transporter (el Kouni 2003;Ogbunude and Ikediobi 1982). We shown here that TUB, as well as the TUB-NBMPR association have a potent antiparasite effect against the promastigotes forms of the leishmania species analyzed, as well as in amastigotes cultures of *L. (L.) amazonensis* (Figs. 1 and 2), confirming that TUB-NBMPR association did not interfere on TUB anti-leishmania action.

In leishmaniasis, macrophages constitute both the host and effectors' cells against the infection (Rittig and Bogdan 2000). We demonstrate that the treatment with TUB-NBMPR association causes a significant decrease of more than 4 times on the macrophage association index by *L. (L.) amazonensis*, from 5,65% on the control cells with no treatment, to 1,35%

after treatment with 16 μ M:32 μ M of TUB-NBMPR association (Fig. 3). Based on the high macrophages toxicity verified after 2 μ M TUB treatment alone (Fig. 4-C), we can conclude that NBMPR protected the host cells from TUB toxicity, without interfering on the TUB anti leishmania effect.

The selectivity of TUB-NBMPR association for *Leishmania* cells could be attributed to the fact that NBMPR inhibits only the mammalian nucleoside transport, protecting the host but not the parasite from the TUB lethal effects, similarly as proposed by *Schistosoma* model (el Kouni et al. 1983; el Kouni et al. 1987). The combinations of nucleoside transport inhibitors with TUB produce highly selective toxicity against the parasite, supporting the hypothesis that mechanisms of nucleoside transport in leishmania are also different from their host. On the other hand, we cannot verify a complete elimination of the intracellular parasites (Fig. 4-D), as observed on the *in vitro* cultures (Fig. 1). This can be explained by the fact that NBMPR is inhibiting the transport into the macrophages and the infection control is occurring by the time macrophages are disrupted after amastigotes proliferation. In the presence of extracellular TUB, parasites are killed avoiding new macrophages infection, and reducing the infection rate.

This was clearly demonstrated in the *in vivo* experiments, where we could observe almost 2 times decrease on the lesion progression of the group treated with TUB-NBMPR association (5 mg/kg:15 mg/kg, respectively), when compared with the control group with no treatment, or the group treated with NBMPR alone (Table 1).

Concluding, the potency of this toxic purine analogue in combination with NBMPR inhibitor may provide an alternative chemotherapeutic approach for the treatment of leishmaniasis. Indeed the capacity of the NBMPR inhibitor to protect infected macrophages from the toxic effects of TUB must be consider and better studied.

Acknowledgements.

This work was supported by CNPq (47121-2), FAPESP (00/10016-1), LIM-48 (FM-USP) and by fellowships from CNPq (P.C.C.), CAPES (J.I.A.) and FAPESP (D.C.C.R.). All procedures in this study are in accordance with the Brazilians laws and complied with the ethical guidelines of the institution for experiments with animals. The *in vivo* analyses were conducted, according to the Guide for the 'Care and Use of Laboratory Animals' from the National Academy of Sciences (<http://www.nap.edu>).

References

- Barbieri CL, Giorgio S, Merjan AJ, Figueiredo EN (1993) Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. *Infect Immun* 61:2131-7.
- Berman JD, Lee LS, Robins RK, Revankar GR (1983) Activity of purine analogs against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 24:233-6.
- Croft SL, Coombs GH (2003) Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19:502-8.
- do Socorro SRMS, Mendonca-Filho RR, Bizzo HR, de Almeida Rodrigues I, Soares RM, Souto-Padron T, et al. (2003) Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1895-901.
- el Kouni MH (1991) Efficacy of combination therapy with tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5'-monophosphate against chronic and advanced stages of schistosomiasis. *Biochem Pharmacol* 41:815-20.
- el Kouni MH (2003) Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol Ther* 99:283-309.
- el Kouni MH, Diop D, Cha S (1983) Combination therapy of schistosomiasis by tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5'-monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6667-70.
- el Kouni MH, Messier NJ, Cha S (1987) Treatment of schistosomiasis by purine nucleoside analogues in combination with nucleoside transport inhibitors. *Biochem Pharmacol* 36:3815-21.
- Hammond DJ, Gutteridge WE (1984) Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*. *Mol Biochem Parasitol* 13:243-61.
- Kapler GM, Zhang K, Beverley SM (1990) Nuclease mapping and DNA sequence analysis of transcripts from the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (R) region of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res* 18:6399-408.
- Kayser O (2000) Nanosuspensions for the formulation of aphidicolin to improve drug targeting effects against leishmania infected macrophages. *Int J Pharm* 196:253-6.
- Landfear SM, Ullman B, Carter NS, Sanchez MA (2004) Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* 3:245-54.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561-77.
- Ogbunude PO, al-Jaser MH, Baer HP (1991) *Leishmania donovani*: characteristics of adenosine and inosine transporters in promastigotes of two different strains. *Exp Parasitol* 73:369-75.
- Ogbunude PO, Ikediobi CO (1982) Effect of nitrobenzylthioinosinate on the toxicity of tubercidin and ethidium against *Trypanosoma gambiense*. *Acta Trop* 39:219-24.

- Olliaro PL, Bryceson AD (1993) Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today* 9:323-8.
- Pereira WK, Lonardoni MV, Grespan R, Caparroz-Assef SM, Cuman RK, Bersani-Amado CA (2005) Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *J Infect* 51:157-64. Epub 2004 Nov 5.
- Rittig MG, Bogdan C (2000) *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16:292-7.
- Singh S, Mohapatra DP, Sivakumar R (2000) Successful replacement of fetal calf serum with human urine for in vitro culture of *Leishmania donovani*. *J Commun Dis* 32:289-94.
- World Health Organization/Tropical Disease Research (WHO/TDR) (2008) in <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>

Figure legends.

Figure 1. Representation of the anti-parasite action of TUB [1.8 μ M], NBMPR [4 μ M], TUB-NBMPR association [1.8 μ M:4 μ M] and Glucantime [20 μ g/ml] in the presence of cultures of promastigotes cells of *L. (L.) amazonensis* (La), *L. (V.) braziliensis* (Lb), *L. (L.) chagasi* (Lc) and *L. (L.) major* (Lm). Bars represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. Controls mean cultures with no drugs.

Figure 2. Representation of the anti-parasite action of TUB [1.8 μ M], NBMPR [4 μ M] and TUB-NBMPR association [1.8 μ M:4 μ M] in the presence of cultures of amastigotes cells of *L. (L.) amazonensis*. Bars represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. Controls mean cultures with no drugs.

Figure 3. Representation of the anti-parasite action of different concentrations of TUB-NBMPR association in the interaction macrophage - *L. (L.) amazonensis*. Bars represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. The mean association index values were calculated counting parasites into 200 Giemsa macrophages stained.

Figure 4. TUB toxicity in cultures of BALB/c macrophages infected with *L. (L.) amazonensis*. (A) control culture without drugs; (B) culture treated with NBMPR [16 μ M]; (C) culture treated with TUB [2 μ M] and (D) culture treated with TUB-NBMPR association [8 μ M:16 μ M]. Macrophages were fixed in cover slips, treated as indicated, stained with Giemsa and observed with a 100x objective.

Table 1. The mean \pm standard deviations of the lesions diameter of 10 BALB/c mice group infected with *L. (L.) amazonensis* are indicated. Control group received saline solution; NBMPR group received NBMPR (15mg/kg) alone and the TUB-NBMPR association group received TUB 5mg/kg plus NBMPR 15mg/kg. The (p) values were calculated by Student *t* test, considering not significant value (ns) $p > 0,05$.

Figure 1.

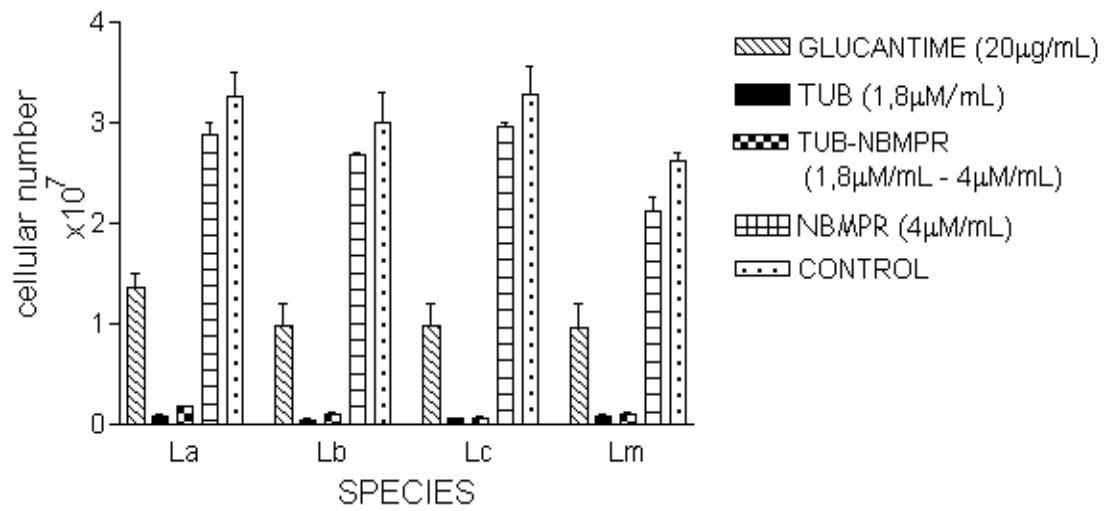


Figure 2.

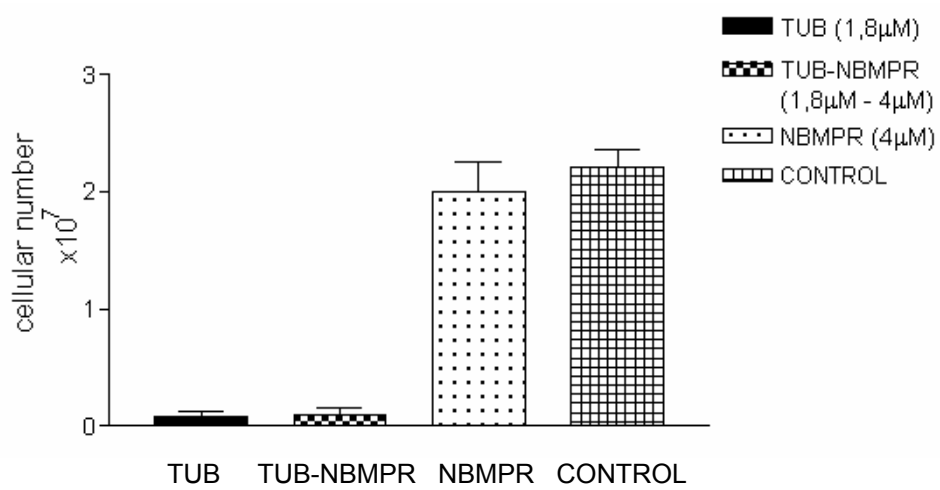


Figure 3.

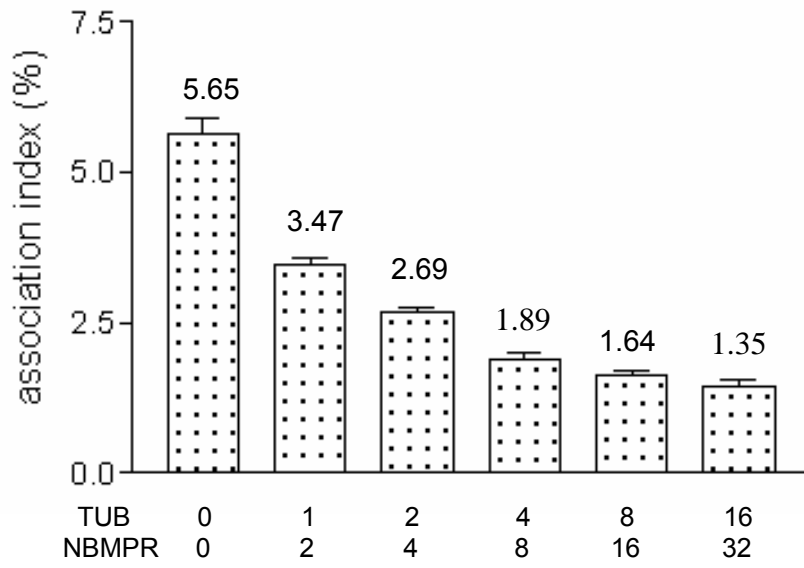


Figure 4.

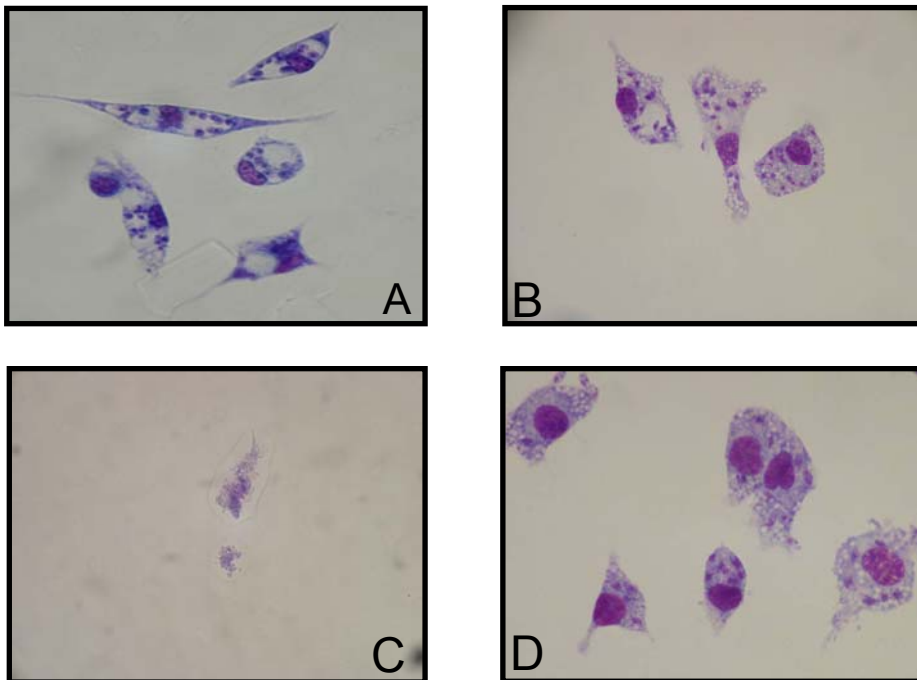


Table 1. Comparison of the lesion evolution of BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* after 7 days treatment

Groups	day 1	day 7	p
no drug	2.65 ± 0.81	3.60 ± 0.99	-
NBMPR	2.43 ± 0.50	3.57 ± 0.73	ns
TUB-NBMPR	2.31 ± 0.33	2.78 ± 0.46	0.03