

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ANÁLISE FUNCIONAL DE ENZIMAS DA VIA DE SÍNTESE
E REDUÇÃO DA TRIPANOTONA EM *LEISHMANIA* SPP.

por

Maísa Santos da Fonseca

Belo Horizonte

2017

TESE	DCS-CPqRR	M.S.FONSECA	2017
------	-----------	-------------	------

Maísa Santos da Fonseca

ANÁLISE FUNCIONAL DE ENZIMAS DA VIA DE SÍNTESE
E REDUÇÃO DA TRIPANOTONA EM *LEISHMANIA* SPP.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração de Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta
Coorientação: Dr. Rubens Lima do Monte Neto

Belo Horizonte
2017

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F676a Fonseca, Maísa Santos da.
2017

Análise funcional de enzimas da via de síntese e redução da tripanotona em *Leishmania* spp / Maísa Santos da Fonseca. – Belo Horizonte, 2017.

XXXI, 165 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 155 - 171

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose/enzimologia 2. *Leishmania* /efeitos de drogas 3. Antimônio/análise I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação). III. Monte Neto, Rubens Lima do (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Maísa Santos da Fonseca

ANÁLISE FUNCIONAL DE ENZIMAS DA VIA DE SÍNTESE
E REDUÇÃO DA TRIPANOTONA EM *LEISHMANIA* SPP.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração de Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (CPqRR/Fiocruz) Presidente
Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (CPqRR/Fiocruz) Titular
Prof. Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira (CPqRR/Fiocruz) Titular
Prof. Dr. Carlos Renato Machado (UFMG) Titular
Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis (UFOP) Titular
Prof. Dra. Laila Alves Naum (CPqRR/Fiocruz) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 31 de março de 2017.

Dedico esta Tese à minha mãe Eliana;
Meu maior exemplo,
Minha maior inspiração,
Minha maior motivação.

Agradecimentos

“Se pude ver mais além dos demais, foi porque me pus de pé nos ombros de um gigante.”

Sir. Isaac Newton

No meu caso, se eu cheguei ao final de mais essa etapa foi graças à ajuda de muitas mãos, muito ATP alheio gasto, e claro, risadas.

Eu gostaria de agradecer à Dra. Silvane Murta por me abrir as portas do laboratório e pela oportunidade de desenvolver o doutorado.

Agradeço ao Dr. Rubens do Monte-Neto pela coorientação, pelas valiosas sugestões, pela amizade, pelas conversas científicas e também àquelas nem tão científicas assim.

Agradeço aos membros da banca, Dr. Alexandre Reis, Dr. Carlos Renato Machado, Dra. Rosiane Pereira, Dr. Carlos Eduardo Calzavara e Dra. Laila Nahum, por aceitarem discutir esse trabalho tão prontamente.

Ao Dr. Álvaro Romanha, pelas preciosas conversas, sempre muito agradáveis, e pelo auxílio, sem o qual, eu não realizaria o sonho do Doutorado Sanduiche.

Ao Dr. Marcelo Comini, do laboratório de Biología Redox de Tripanosomátidos, do Insitut Pasteur de Montevideo, por ter me recebido em seu laboratório, por toda experiência compartilhada e por todas as discussões, sempre muito enriquecedoras. À todos os colegas do Uruguay, especialmente à Dra. Andrea Medeiros pela amizade, por estar sempre tão disponível e por me acompanhar dentro e fora do laboratório. ¡Gracias!

Ao Dr. Markus Kohlhoff e ao Dr. Tiago Mendes (UFV) pela disponibilidade e auxílio na execução do Metaboloma de *Leishmania* spp.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ-MG, na pessoa da Dra. Zélia Maria Profeta da Luz, por manter a excelência nos trabalhos científicos.

À todos os funcionários e professores do programa de Pós-Graduação do CPqRR pela dedicação e responsabilidade em manter a excelência do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Agradeço à Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz PDTIS-CPqRR/Fiocruz, pelos serviços prestados através das plataformas de Sequenciamento e Eletroforese 2D/Proteômica.

Agradeço a todos os funcionários do CPqRR, pela simpatia e dedicação que tornaram a execução desse trabalho possível, e mais agradável também.

Agradeço à Bethânia e Nayara pela oportunidade, pela grande equipe que nos tornamos, pela companhia e auxílio na bancada, sem vocês certamente eu não teria metade dos resultados apresentados nessa Tese. Obrigada ainda pela amizade e carinho, não há forma de expressar toda a gratidão, amizade e respeito que sinto por vocês.

Ao Douglas, companheiro de jornada e amigo confiante. Aos meus amigos do lab-coração, em ordem alfabética, Christiana, Ednéia, Ellen, Isabel, Jerônimo, Juliano Augusto, Larissa, Luíza, Renata e Tamara, por todos os conselhos, amizade, almoços, cantorias/danças, horas investidas em conversas dentro e fora do laboratório. Obrigada por tudo, este trabalho tem toda a energia positiva e incentivo que recebi de vocês cravadas em cada caracter escrito.

Aos demais amigos do GFP, em ordem alfabética, Agna, Ana Beatriz, Armando, Camila, Elis, Graziela, Isabela, Isabella Bernardes, Joyce (*in memorian*), Juliano Maciel, Mariana Eduarda, Michele, Rhudyara e Roberta pelo companheirismo e amizade. O Doutorado inteiro já valeu a pena só por ter conhecido e convivido com cada um de vocês.

Agradeço à Kênia pela dedicação em resolver tão prontamente as demandas do laboratório.

Agradeço à minha família, minha base e refúgio, que estão sempre comigo nas horas boas e ruins. Vocês foram desde sempre meus maiores incentivadores. Obrigada por sempre acreditarem em mim (até mais do que eu mesma acreditava). Em especial, à minha mãe Eliana, obrigada por se a mãe que eu precisei, sem tirar nem por, em todos os detalhes. Você é minha inspiração, meu modelo e exemplo. Espero que um dia eu possa me tornar metade da mulher extraordinária e forte que você é. Aos meus irmãos Átila e Ingrid, pelos confrontos ainda quando criança que me ensinaram a pedir desculpas (mesmo quando não se tem culpa) e perdoar sempre. Também pela amizade e conselhos, pela companhia nos jogos e no copo.

Aos demais amigos que estão comigo por um tempo um pouco maior do que o tempo do Doutorado, tipo a vida inteira, e em especial Ana Pires e Juliana, minhas irmãs de coração.

À família Mendonça por ter me acolhido e tratado com tanto amor e carinho. Por acreditarem em mim e me incentivarem a permanecer nessa carreira tão árdua.

Agradeço à CAPES pela bolsa.

Às demais agências financiadoras CNPq (Universal 475782/2012-7), FAPEMIG (CBB-PPM 00196/13 e 00610/15), UNICEF/UNDP/World Bank/WHO (A800692) e PROEP/CNPq/FIOCRUZ (PROEP/CNPq/FIOCRUZ 401988/2012-0).

“Especialmente em ciência, aquele que julga ter encontrado uma resposta conclusiva dá mostras não somente de seu fracasso, mas também do fracasso da própria ciência.”

(Luiz Carlos Bombassaro – Ciência e mudança conceitual: notas sobre epistemologia e história da ciência (1995))

Resumo

A resistência ao antimônio em *Leishmania* spp. está associada com o aumento dos níveis de tripanotona e outros tióis, e isso, está relacionado com o aumento da expressão das enzimas das vias de síntese e redução da tripanotona. Neste estudo, análise do nível de expressão de ODC, GCS, TryS e TR nas linhagens de *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens e resistentes ao antimônio trivalente (SbIII), mostrou que a expressão dessas enzimas varia entre as espécies analisadas e que, *L. guyanensis* resistente ao SbIII, foi a única espécie que apresentou aumento de expressão para todas as enzimas avaliadas. Posteriormente, para melhor caracterizar o papel dessas enzimas na resistência ao SbIII, realizamos ensaios de transfecção de linhagens de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* com construções contendo os genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr*. Observamos o envolvimento da superexpressão das enzimas ODC ou GCS na proteção contra o SbIII nas linhagens de *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, mas não em *L. infantum*. A inibição farmacológica de ODC e GCS com os inibidores específicos DFMO e BSO, respectivamente, sensibilizou as linhagens de *L. guyanensis* que superexpressam essas enzimas ao SbIII, confirmando a importância de ODC e GCS na resistência de *L. guyanensis* ao SbIII. O tratamento desses parasitos com BSO aumentou o efeito leishmanicida do SbIII. *L. braziliensis* superexpressora de TryS ficou mais susceptível ao SbIII e nenhuma alteração significativa foi observada em linhagens de *L. guyanensis* e *L. infantum* superexpressoras de TryS. Por outro lado, a superexpressão de TR aumentou a resistência ao SbIII em um dos clones de *L. braziliensis* analisados e nos dois clones de *L. infantum*. Nenhuma alteração no fenótipo ao SbIII foi observada nos parasitos de *L. guyanensis* superexpressores de TR. A expressão de enzimas da via de síntese e redução da tripanotona e de enzimas da via antioxidante foram avaliadas nas linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* superexpressoras de TryS ou TR. A superexpressão dessas enzimas é capaz de alterar a expressão de outras enzimas associadas e, dessa forma, regular o metabolismo desses parasitos. Dentre os resultados obtidos, observamos que em *L. braziliensis* superpressora de TS ocorreu diminuição na expressão da TR e vice-versa, mostrando um mecanismo de co-regulação entre TryS e TR. Nossos dados confirmam o caráter complexo e multifatorial do fenótipo de resistência ao antimônio em *Leishmania* spp. e ele varia entre as espécies do parasito analisadas.

Palavras-chave: *Leishmania* spp., Resistência ao Antimônio, Ornitina Decarboxilase, Gama-Glutamilcisteína Sintetase, Tripanotona Sintetase, Tripanotona Redutase

Abstract

Antimony resistance in *Leishmania* spp. is associated with increased thiols levels, including trypanothione. This increase in thiol levels is related to increased levels of enzymes from trypanothione synthesis and reduction pathways. In this study, the analysis of the expression level of ODC, GCS, TryS and TR in *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) wild-type and trivalent antimony (SbIII)-resistant lines, showed different patterns of expression for these enzymes in the analyzed species. *L. guyanensis* SbIII-resistant line was the only line that presented increased expression levels for all four enzymes analyzed. Besides, in order to better characterize the role of these enzymes in the SbIII-resistance, transfection assays using constructs containing *odc*, *gcs*, *trys* or *tr* genes were performed in *L. guyanensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum* wild-type lines. ODC or GCS overexpression protects *L. guyanensis* and *L. braziliensis*, but not *L. infantum* against SbIII. Pharmacological inhibition of ODC and GCS with specific inhibitors DFMO and BSO, respectively, sensitized *L. guyanensis* lines that overexpress these enzymes to SbIII. These results confirm the importance of ODC and GCS enzymes in the SbIII-resistance in *L. guyanensis*. The BSO increased the antileishmanial effect of SbIII in *L. guyanensis* lines. The TryS overexpression in *L. braziliensis* sensitized these lines to SbIII, but none significant change in susceptibility to SbIII was observed in *L. guyanensis* and *L. infantum* lines overexpressing TryS. On the other hand, the overexpression of TR increased the SbIII-resistance in one of clones of *L. braziliensis* and in both clones of *L. infantum*. No alteration was observed in the SbIII-susceptibility phenotype of *L. guyanensis* lines overexpressing TR. The expression of enzymes from trypanothione synthesis and reduction pathways and from antioxidant pathways was evaluated in *L. braziliensis* and *L. infantum* overexpressing TryS or TR. The overexpression of TryS or TR alters the expression level of other enzymes from the pathways analyzed regulating the metabolism these parasites. One of the results obtained showed that the TryS overexpression in *L. braziliensis* reduces the expression of TR, and vice-versa, showing a co-regulation mechanism between TryS and TR. Our data confirm the complexity and multifactorial behavior of antimony-resistance phenotype in *Leishmania* spp., and it varies among the species of parasite analyzed.

Key-words: *Leishmania* spp., Antimony-resistance, Ornithine Decarboxylase, Gamma-Glutamylcysteine Synthetase, Trypanothione Synthetase, Trypanothione Reductase

Lista de Figuras

Figura 1: Número de casos de Leishmaniose Visceral (A) e Leishmaniose Cutânea (B) no mundo (2015). Fonte: WHO, 2017.....	33
Figura 2: Morfologia de <i>Leishmania</i> spp.	38
Figura 3: Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> spp.	40
Figura 4: Mecanismos de ação e resistência ao Sb em <i>Leishmania</i> spp.	53
Figura 5: Estrutura química da tripanotona na sua forma reduzida.....	56
Figura 6: Metabolismo da tripanotona (T(SH) ₂) de tripanossomatídeos.....	57
Figura 7: Plasmídeo pIR1-BSD contendo a região codificante do gene gama-glutamilcisteína sintetase na posição senso (10.428 pb).....	76
Figura 8: Nível de expressão de Ornitina Decarboxilase (ODC) em linhagens de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR).....	87
Figura 9: Nível de expressão de Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS) em <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR).....	88
Figura 10: Nível de expressão de Tripanotona Sintetase (TryS) em <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR).....	89
Figura 11: Nível de expressão de Tripanotona Redutase (TR) em <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR).....	90

Figura 12: Amplificação do gene <i>bsd</i> nos clones de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-LgODC.....	94
Figura 13: Nível de expressão de Ornitina Decarboxilase em (A) <i>L. guyanensis</i> , (B) <i>L. braziliensis</i> e (C) <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>).....	95
Figura 14: Curva de crescimento de (A) <i>L. guyanensis</i> selvagem (<i>LgWT</i>) e transfectada com o gene <i>odc</i> (<i>LgODC c10</i>) e (B) <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) selvagem (<i>LWT</i>) e transfectada com o gene <i>odc</i> (<i>LiODC c9</i>) na presença de DFMO.....	97
Figura 15: Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) <i>L. guyanensis</i> , (B) <i>L. braziliensis</i> e (C) <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) ao SbIII.....	99
Figura 16: Efeito do inibidor DFMO (50 μ M) no crescimento de <i>L. guyanensis</i> selvagem (<i>LgWT</i>) e transfectada com o gene <i>odc</i> (<i>LgODC c10</i>).....	101
Figura 17: Efeito do inibidor DFMO no fenótipo de resistência ao SbIII de <i>L. guyanensis</i> transfectada com o gene <i>odc</i>	102
Figura 18: Amplificação da região codificante completa do gene da Gama-Glutamilcisteína Sintetase a partir do DNA genômico de <i>L. guyanensis</i> M9945.....	103
Figura 19: Amplificação do gene <i>bsd</i> nos clones de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-LgGCS.....	106
Figura 20: Nível de expressão de Gama-Glutamilcisteína Sintetase em (A) <i>L. guyanensis</i> , (B) <i>L. braziliensis</i> e (C) <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>).....	108

Figura 21: Curva de crescimento de (A) *L. guyanensis* selvagem (*LgWT*) e transfectada com o gene *gcs* (*LgGCS c3*) e (B) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagem (*LWT*) e transfectada com o gene *gcs* (*LiGCS c2*) na presença de BSO.....110

Figura 22: Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) ao SbIII.....112

Figura 23: Efeito do inibidor BSO (10 mM) no crescimento de *L. guyanensis* selvagem (*LgWT*) e transfectada com o gene *gcs* (*LgGCS c3*).....114

Figura 24: Efeito do inibidor BSO no fenótipo de resistência ao SbIII de *L. guyanensis* transfectada com o gene *gcs*.....115

Figura 25: Efeito do BSO no crescimento de *L. guyanensis* selvagem e superexpressora de GCS tratadas com concentrações subletais de SbIII.....117

Figura 26: Amplificação da região codificante completa do gene da Tripanotina Sintetase a partir do DNA genômico de *L. braziliensis* M2904 (*LbWT*) e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) PP75 (*LWT*).....118

Figura 27: Amplificação do gene *bsd* nos clones de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-*LiTryS*.....120

Figura 28: Nível de expressão de Tripanotina Sintetase em (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*).....121

Figura 29: Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) ao SbIII.....123

Figura 30: Amplificação da região codificante completa do gene da Tripanotina Redutase a partir do DNA genômico de *L. braziliensis* M2904.....125

Figura 31: Amplificação do gene *bsd* nos clones de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-BSD-*LbTR*.....126

Figura 32: Nível de expressão de Tripanotiona Redutase em (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*).....127

Figura 33: Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) ao SbIII.....129

Figura 34: Nível de expressão de enzimas da via antioxidante e síntese de tripanotiona em *L. braziliensis* superexpressando Tripanotiona Sintetase (*LbTryS* c7 e c11) ou Tripanotiona Redutase (*LbTR* c1 e c16).....132

Figura 35: Nível de expressão de enzimas da via antioxidante e síntese de tripanotiona em *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressando Tripanotiona Sintetase (*LITryS* c22 e c23) ou Tripanotiona Redutase (*LITR* c14 e c17).....134

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Espécies de <i>Leishmania</i> capazes de infectar humanos.....	36
Tabela 2 – Susceptibilidade das linhagens de <i>Leishmania</i> selvagens e resistentes ao SbIII obtidas por Liarte e Murta (2010)	67
Tabela 3 – Iniciadores usados na clonagem, no sequenciamento e na seleção dos clones transfectados com o marcador molecular que confere resistência a blastomicina (BSD)	69
Tabela 4 – Relação dos anticorpos utilizados nos ensaios de <i>Western Blot</i> ...	81
Tabela 5 – Resumo da expressão de enzimas da via de síntese e redução de tripanotona em linhagens selvagens e resistentes ao SbIII de <i>Leishmania</i> spp. do Novo Mundo.....	91
Tabela 6 – Identidade, cobertura e diferenças entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de ODC de <i>L. guyanensis</i> quando comparada às sequências referências do <i>Tritypdb.org</i>	93
Tabela 7 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), superexpressoras de ODC de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) em relação à expressão de ODC e susceptibilidade ao SbIII.....	100
Tabela 8 – IC ₅₀ do DFMO e do SbIII em linhagens de <i>L. guyanensis</i> pré-tratadas ou não com DFMO	102
Tabela 9 – Identidade, cobertura e diferenças entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos de GCS de <i>L. guyanensis</i> quando comparada às sequências referências do <i>Tritypdb.org</i>	105

Tabela 10 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), superexpressoras de GCS de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) em relação à expressão de GCS e susceptibilidade ao SbIII.....	113
Tabela 11 – IC ₅₀ do BSO e do SbIII em linhagens de <i>L. guyanensis</i> pré-tratadas ou não com BSO	115
Tabela 12 – Identidade, cobertura e diferenças entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos de TryS de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> quando comparada às sequências referências do <i>Tritypdb.org</i>	119
Tabela 13 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), superexpressoras de TryS de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) em relação à expressão de TryS e susceptibilidade ao SbIII.....	124
Tabela 14 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), surpexpressoras de TR de <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) em relação à expressão de TR e susceptibilidade ao SbIII.....	130
Tabela 15 – Índice de expressão diferencial de enzimas da via antioxidante em linhagens de <i>L. braziliensis</i> transfectadas com Tripanotiona Sintetase (<i>LbTryS</i> c7 e c11) ou Tripanotiona Redutase (<i>LbTR</i> c1 ou c16).....	133
Tabela 16 – Índice de expressão diferencial de enzimas da via antioxidante em linhagens de <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) transfectadas com Tripanotiona Sintetase (<i>LITryS</i> c22 e c23) ou Tripanotiona Redutase (<i>LITR</i> c14 ou c17)....	135

Lista de Siglas e Abreviaturas

% – Porcentagem

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de Amônio

> – símbolo de 'maior que'

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

1.7 K – região intergênica do minicírculo de 1.7 Kb de *L. major*

2D – eletroforese bidimensional

3'-UTR – região 3'-não codificante do inglês, *3'-untranslated region*

5'-UTR – região 5'-não codificante, do inglês, *5'-untranslated region*

ABC – Transportador transmembrana do tipo ABC, do inglês *ATP-binding cassette*

ABCD – AmB em dispersão coloidal

ABC14 – transportador de membrana da família ABC e da subfamília I

ABLC – complexo lipídico de AmB

ACR2 – Antimoniato Redutase, do inglês, *Antimoniate Reductase*

AdoMet – Adenosilmetionina

AdoMetDC – Adenosilmetionina Decarboxilase

AdoMetS – S-Adenosilmetionina Sintetase

ADP – Adenosina Difosfato

Ag – Prata

AmB – Anfotericina B

AMP – Ampicilina

ANOVA – Análise de Variância

Anti-LdODC – Anticorpo contra proteína recombinante ODC de *L. donovani*

Anti-LgGCS – Anticorpo contra proteína recombinante GCS de *L. guyanensis*

APS – Persulfato de Amônio

APx – Ascorbato peroxidase

AQP1 – Aquagliceroporina 1

aqp1 – gene que codifica a Aquagliceroporina 1

AsIII – Arsênio trivalente

ATP – Adenosina Trifosfato

Au – Ouro

AUG – códon de iniciação e códon da Metionina

BLAST – do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

BSD – Blastocidina

bsd – gene que codifica a enzima blastocidina S-deaminase

BSO – Butionina Sulfoximina

Ca²⁺ – Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

Cad – cadaverina

Cbp80/20 – complexo nuclear de ligação de *cap*, do inglês, *nuclear cap-binding protein complex*

CDC – do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*

CIAP – Fosfatase Alcalina do inglês, *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal*

Complexo Sb-TS – Complexo antimônio-tripantotona

Cys – cisteína

CYS2 – região intergênica do gene Cisteína Protease-2 de *L. mexicana*

dATP – Deoxiadenosina Trifosfato, do inglês, *deoxyadenosine triphosphate*

dcAdoMet – Adenosilmetionina descarboxilada

DFMO – α -difluorometilornitina

DHA – hidroascorbato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

DNase – enzima que degrada DNA

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (A-adenina, T-timina, G-guanina, C-citosina)

DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

eIF4A – fator de iniciação da transcrição de eucariotos – 4A do inglês, *eukaryotic initiation factor-4^a*

eIF4E – fator de iniciação da transcrição de eucariotos – 4E do inglês, *eukaryotic initiation factor-4E*

eIF4F – fator de iniciação da transcrição de eucariotos – 4G do inglês, *eukaryotic initiation factor-4G*

eIF4G – fator de iniciação da transcrição de eucariotos – 4G do inglês, *eukaryotic initiation factor-4G*

EUA – Estados Unidos da América, do inglês, United States of America

FAD – dinucleótido de flavina e adenina, do inglês, *flavin adenine dinucleotide*

Fw – iniciador senso, do inglês, forward

GCS – Gama-Glutamilcisteína Sintetase

gcs – gene que codifica a Gama-Glutamilcisteína Sintetase

GCS.C – iniciador para a amplificar a sequência gênica completa de GCS

GCS.P – iniciador para a amplificar a sequência gênica parcial de GCS

GDP – Guanosindifosfato

GENE.C – iniciador para a amplificar a sequência gênica completa

GENE.P – iniciador para a amplificar a sequência gênica parcial

Gly – Glicina

GPxA – glutathione peroxidase-like A

GPxB – glutathione peroxidase-like B

GR – Glutathione Redutase

GS – Glutathione Sintetase

GSH – Glutathione

GspS – Glutathionylspermidine Sintetase

GSSG – glutathione oxidada

GTP – Trifosfato de Guanosina

h – hora

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HEPES – Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico

His – Histidina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficient Virus)

HLPC – Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês, High Performance Liquid Chromatography

Hsp – Proteína de Choque Térmico, do inglês, Heat Shock Proteins

Hsp 70 – proteína de choque térmico 70, do inglês, *Heat Shock Protein 70*

Hsp 83 – proteína de choque térmico 83, do inglês, *Heat Shock Protein 83*

IC – Intervalo de Confiança

IC₅₀ – concentração inibitória de 50 % do crescimento

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – isopropiltiogalactosídeo do inglês, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

K₂HPO₄ – Fosfato de Potássio Dibásico

kb – kilobases

KCl – Cloreto de Potássio

kDa – kiloDalton

kDNA – DNA mitocondrial

Kg – quilograma

KH₂PO₄ – Fosfato Monopotássico

KMP11 – proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11, do inglês, Kinetoplastid membrane protein 11

L-AmB – Amb lipossomal

LaSbR – *L. amazonensis* resistente ao SbIII

LaWT – *L. amazonensis* selvagem

LB – meio Luria-Bertani

LbGCS – *L. braziliensis* superexpressando GCS

LbODC – *L. braziliensis* superexpressando ODC

LbSbR – *L. braziliensis* resistente ao SbIII

LbTR – *L. braziliensis* superexpressando TR

LbTryS – *L. braziliensis* superexpressando TryS

LbWT – *L. braziliensis* selvagem

L-cys – L-cisteína

LgGCS – *L. guyanensis* superexpressando GCS

L-glu – L-glutamato

LgODC – *L. guyanensis* superexpressando ODC

LgSbR – *L. guyanensis* resistente ao SbIII

LgTR – *L. guyanensis* superexpressando TR

LgTryS – *L. guyanensis* superexpressando TryS

LgWT – *L. guyanensis* selvagem

LiGCS – *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressando GCS

LiODC – *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressando ODC

LiSbR – *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) resistente ao SbIII

LiTR – *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressando TR

LiTryS – *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressando TryS

LiWT – *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagem

LPG1 – região intergênica do gene Lipofosfoglicano-1 de *L. major*

M – molar

M13 – Iniciador Universal

M199 – meio de cultivo de *Leishmania*

MDR1 – proteína de resistência a múltiplas drogas 1 , do inglês, multidrug resistance protein 1

MDR3 – do inglês, multidrug resistance protein 3

mg – miligramas

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

min – minuto (s)

mL – mililitros

mM – milimolar

MOCK – controle de transfecção transfectado com pIR1-BSD

mRNA – RNA mensageiro

MRPA – do inglês, *Multidrug Resistance Protein 3*

mrpa – gene que codifica a proteína MRPA

n.d – não demonstrado

N.s. – Não significativa

N₂ – nitrogênio

Na₂HPO₄ – Fosfato de Sódio Dibásico

NaCl – Cloreto de Sódio

NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NaOH – Hidróxido de Sódio

ND – NanoDrop

ng – nanogramas

nm – nanômetros

°C – graus Celsius

OD – Densidade Óptica

odc – gene que codifica a enzima Ornitina Decarboxilase

odc – gene que codifica a Ornitina Decarboxilase

ODC – Ornitina Decarboxilase

ODC.C – iniciador para a amplificar a sequência gênica completa de ODC

ODC.P – iniciador para a amplificar a sequência gênica parcial de ODC

ORF – fases abertas de leitura, do inglês, *Open Reading Frames*

ori – origem de replicação

Orn – ornitina

p/v – peso por volume

pb – pares de bases

pBSII SK – região do plasmídeo BlueScript II SK

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

PDTIS-CPqRR – Rede de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas René Rachou

PE – Tampão de Lavagem com Etanol

Pgp – Fosfoglicoproteína de Membrana, do inglês *Phosphoglycoprotein*

pH – Potencial de Hidrogênio

pIR1-BSD – plasmídeo de transfecção de *Leishmania*

pIR1-LbTR – plasmídeo de expressão de *Leishmania* com a sequência codificantes de *tr*

pIR1-LgGCS – plasmídeo de expressão de *Leishmania* com a sequência codificantes de *gcs*

pIR1-LgODC – plasmídeo de expressão de *Leishmania* com a sequência codificantes de *odc*

pIR1-LiTRYs – plasmídeo de expressão de *Leishmania* com a sequência codificantes de *trys*

pmoles – Picomoles

PSG – Gel secretados de promastigotas, do inglês - *promastigote secretory gel*

Put – Putrescina

QG – Tampão de Solubilização e Ligação

RNA – Ácido Ribonucléico
RNAi – RNA interferência
RNAPII – RNA polimerase II
RNase – enzima que degrada ácido ribonucléico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês, *Reactive Oxygen Species*
RPM – Rotações por Minuto
RT-PCR – PCR em tempo real
Rv – Iniciador Antisense, do inglês, *reverse*
Sb – Antimônio
SbIII – Antimônio Trivalente
SbR – linhagem resistentes ao SbIII
SbV – Antimônio Pentavalente
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
seg – Segundos
SFB – Soro Fetal Bovino
SFM – células do sistema fagocitário mononuclear
sin. – sinônimo
SL – *spliced leader*
SOD-A – Ferro Superóxido Dismutases – A , do inglês, *Iron-superoxide Dismutase-A*
Spd – Espermidina
spp. – espécie
SSU – Subunidade Menor do RNA Ribossomal
T(SH)₂ – Tripanotona Reduzida
TBE – tampão Tri-Borato-EDTA
TBS-T – tampão Tri-Borato-EDTA com Tween 20
TDR1 – Redutase Dependente de Tiol, do inglês, *Thiol-Dependent Reductase*
TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
THP-1 – do inglês, Cell Line Human Leukemic Monocyte
TOP 10 F' – Linhagem de Bactéria
tr – gene que codifica a Tripanotona Redutase
TR – Tripanotona Redutase
TR.C – iniciador para a amplificar a sequência gênica completa de TR

TR.P – iniciador para a amplificar a sequência gênica parcial de TR

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano Hidroclorido

Tris-SO₄ – Tris(hidroximetil)aminometano Sulfato

trys – gene que codifica a Tripanotiona Sintetase

TryS – Tripanotiona Sintetase

TryS.C – iniciador para a amplificar a sequência gênica completa de TryS

TryS.P – iniciador para a amplificar a sequência gênica parcial de TryS

TS₂ – Tripanotiona Oxidada

TXN – triparedoxina

TXNPx – triparedoxina peroxidase

U – unidade

USA – Estados Unidos da América, do inglês, United States of America

V – voltagem

v/v – volume por volume

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês, World Health Organization

WT – linhagem selvagem

X – vezes

xg – gravidade

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo

A – alfa (letra do alfabeto grego)

B – beta (letra do alfabeto grego)

γ – gama (letra do alfabeto grego)

μF – microfarads

μg – microgramas

Sumário

1 Introdução.....	32
1.1 Epidemiologia.....	32
1.2 Agente Etiológico	34
1.3 Ciclo de Vida e Biologia de <i>Leishmania</i> spp.....	37
1.4 Manifestações Clínicas	42
1.5 Tratamento.....	44
1.5.1 Antimônio Pentavalente.....	44
1.5.2 Anfotericina B	45
1.5.3 Paramomicina.....	46
1.5.4 Pentamidina.....	47
1.5.5 Miltefosina.....	47
1.6 Mecanismos de Ação do Antimônio Trivalente (SbIII).....	48
1.7 Mecanismos de Resistência de <i>Leishmania</i> spp. ao Antimônio.....	50
1.8 Via de Síntese e Redução da Tripanotiona e Metabolismo Antioxidante	53
1.8.1 Ornitina Decarboxilase (ODC)	58
1.8.2 Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS)	59
1.8.3 Tripanotiona Sintetase (TryS).....	60
1.8.4 Tripanotiona Redutase (TR)	62
2 Justificativa.....	65
3 Objetivos	66
3.1 Objetivo Geral	66

3.2 Objetivos Específicos.....	66
4 Métodos.....	67
4.1 Obtenção das Linhagens de <i>Leishmania</i> spp. e cultivo dos parasitos	67
4.2 Extração de DNA Genômico	68
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR)	68
4.4 Eletroforese de DNA em gel de Agarose	71
4.5 Purificação do Produto de PCR do Gel de Agarose.....	71
4.6 Preparação de Células Cálcio-Competentes	72
4.7 Clonagem em Vetor pGEM®T Easy	72
4.8 Sequenciamento	74
4.9 Subclonagem dos genes <i>odc</i> , <i>gcs</i> , <i>trys</i> e <i>tr</i> em Vetor de Expressão pIR1-BSD.....	75
4.10 Transfecção Estável em Formas Promastigotas de <i>Leishmania</i> spp....	78
4.11 Eletroforese de DNA em Gel de Poliacrilamida.....	79
4.12 Extração de Proteínas Totais	80
4.13 <i>Western Blot</i>	80
4.14 Análise Densitométrica	82
4.15 Efeito dos inibidores DFMO e BSO no crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	82
4.16 Teste de Susceptibilidade dos Parasitos ao SbIII	83
4.17 Efeito dos Inibidores DFMO e BSO no fenótipo de resistência e sensibilidade ao SbIII	83
4.18 Ensaio de Susceptibilidade Com Doses Subletais de BSO e SbIII em <i>L. guyanensis</i> selvagem e superexpressora de GCS	84

4.19 Análises Estatísticas	85
5 Resultados	86
5.1 Análise da Expressão das Enzimas das Vias de Síntese e Redução da Tripanotiona em Populações de <i>Leishmania</i> spp. Sensíveis e Resistentes ao SbIII.....	86
5.2 Ornitina Decarboxilase (ODC).....	92
5.2.1 Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de ODC.....	92
5.2.2 Nível de Expressão de ODC nos Clones Transfectados	94
5.2.3 Efeito do Inibidor DFMO no Crescimento das Formas Promastigotas de <i>L. guyanensis</i> e <i>L. infantum</i>	96
5.2.4 Teste de Susceptibilidade ao SbIII em Linhagens Superexpressoras de ODC.....	98
5.2.5 Teste de Susceptibilidade de Linhagens Superexpressoras de ODC ao SbIII na Presença do Inibidor DFMO	100
5.3 Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS).....	103
5.3.1 Amplificação, Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de GCS.....	103
5.3.2 Nível de Expressão de GCS nos Clones Transfectados.....	106
5.3.3 Efeito do Inibidor BSO no Crescimento das Formas Promastigotas de <i>L. guyanensis</i> e <i>L. infantum</i>	109
5.3.4 Teste de Susceptibilidade de Linhagens Superexpressoras de GCS ao SbIII	111
5.3.5 Teste de Susceptibilidade de Linhagens Superexpressoras de GCS ao SbIII na presença de BSO	113

5.3.6 Efeito da combinação de baixas concentrações de SbIII e BSO no crescimento de <i>L. guyanensis</i> Selvagem e Superexpressora de GCS....	116
5.4 Tripanotiona Sintetase (TryS)	117
5.4.1 Amplificação, Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de TryS	117
5.4.2 Nível de Expressão de TryS nos Clones Transfectados.....	120
5.4.3 Teste de Susceptibilidade ao SbIII em Linhagens Superexpressoras de TryS	121
5.5 Tripanotiona Redutase (TR).....	124
5.5.1 Amplificação, Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de TR.....	124
5.5.2 Nível de Expressão de TR nos Clones Transfectados.....	126
5.5.3 Teste de Susceptibilidade ao SbIII em Linhagens Superexpressoras de TR.....	128
5.6 Análise da Expressão Global de Enzimas da Via Antioxidante de <i>Leishmania</i> spp. em Linhagens Superexpressoras de TryS e TR	130
5.6.1 Análise de Expressão Global em <i>L. braziliensis</i> Superexpressora de TryS e TR	131
5.6.2 Análise de Expressão Global em <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) superexpressora de TryS e TR.....	133
6 Discussão	136
7 Resumo dos Principais Resultados	152
8 Conclusões	153
9 Perspectivas	154
Referências Bibliográficas	155

Apêndice I - Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>odc</i> de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.12.0300).....	172
Apêndice II - Alinhamento da sequência de aminoácidos de ODC de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.12.0300).....	173
Apêndice III - Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>odc</i> de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. panamensis</i> L13 (LPAL13_120007700)	174
Apêndice IV - Alinhamento da sequência de aminoácidos de ODC de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. panamensis</i> L13 (LPAL13_120007700)	175
Apêndice V - Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>gcs</i> de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.18.1700).....	176
Apêndice VI - Alinhamento da sequência de aminoácidos de GCS de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.18.1700).....	177
Apêndice VII - Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>gcs</i> de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. panamensis</i> L13 (LPAL13_180019700)	178
Apêndice VIII - Alinhamento da sequência de aminoácidos de GCS de <i>L. guyanensis</i> M9945 contra sequência referência de <i>L. panamensis</i> L13 (LPAL13_180019700)	179
Apêndice IX - Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>trys</i> de <i>L. braziliensis</i> M2904 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.27.2010).....	180

Apêndice X - Alinhamento da sequência de aminoácidos de TryS de <i>L. braziliensis</i> M2904 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.27.2010).....	181
Apêndice XI - Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>trys</i> de <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) PP75 contra sequência referência de <i>L. infantum</i> JPCM5 (LinJ.27.1770).....	182
Apêndice XII - Alinhamento da sequência de aminoácidos de TryS de <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) PP75 contra sequência referência de <i>L. infantum</i> JPCM5 (LinJ.27.1770).....	183
Apêndice XIII - Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>tr</i> de <i>L. braziliensis</i> M2904 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.05.0350).....	184
Apêndice XIV - Alinhamento da sequência de aminoácidos de TR de <i>L. braziliensis</i> M2904 contra sequência referência de <i>L. braziliensis</i> M2904 (LbrM.05.0350).....	185
Apêndice XV - Eletroforese de proteínas bidimensional e <i>Western Blot</i> 2D de amostras de proteína solúvel total de <i>L. braziliensis</i> M2904 selvagem e superexpressando Tripanotiona Redutase.....	186
Apêndice XVI - Eletroforese de proteínas bidimensional e <i>Western Blot</i> 2D de amostras de proteína solúvel total de <i>L. guyanensis</i> M9945 selvagem e superexpressando Tripanotiona Redutase.....	187
Apêndice XVII - Cromatogramas 'base peak' (em cinza) de metabolitos purificados (coloridos) de (A) <i>L. braziliensis</i> M2904 e (B) <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) PP75 selvagens.....	188
Apêndice XVIII - Artigo Publicado com os dados provenientes da Tese de Doutorado.....	189

1 Introdução

1.1 Epidemiologia

As Leishmanioses são um complexo de doenças que se encontram entre as seis doenças infecciosas mais importantes do mundo. Elas afetam cerca de 1,3 milhões de pessoas anualmente. Desses casos, entre 700 mil e um milhão são devido à leishmaniose cutânea e 200 a 300 mil à leishmaniose visceral. As Leishmanioses estão presentes em 98 países nos cinco continentes (WHO, 2017). A leishmaniose cutânea é mais amplamente distribuída, sendo os 10 países que possuem o maior número de casos: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, que juntos contam com 70 a 75 % dos casos no mundo (ALVAR et al., 2012). Para a leishmaniose visceral, mais de 90 % dos casos reportados se concentram em apenas cinco países: Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 1 – A e B). Somente nesses países, existem cerca de 310 milhões de pessoas sob risco de infecção. A leishmaniose visceral é responsável anualmente pela morte de 20.000 a 30.000 pessoas em todo o mundo (WHO, 2017).

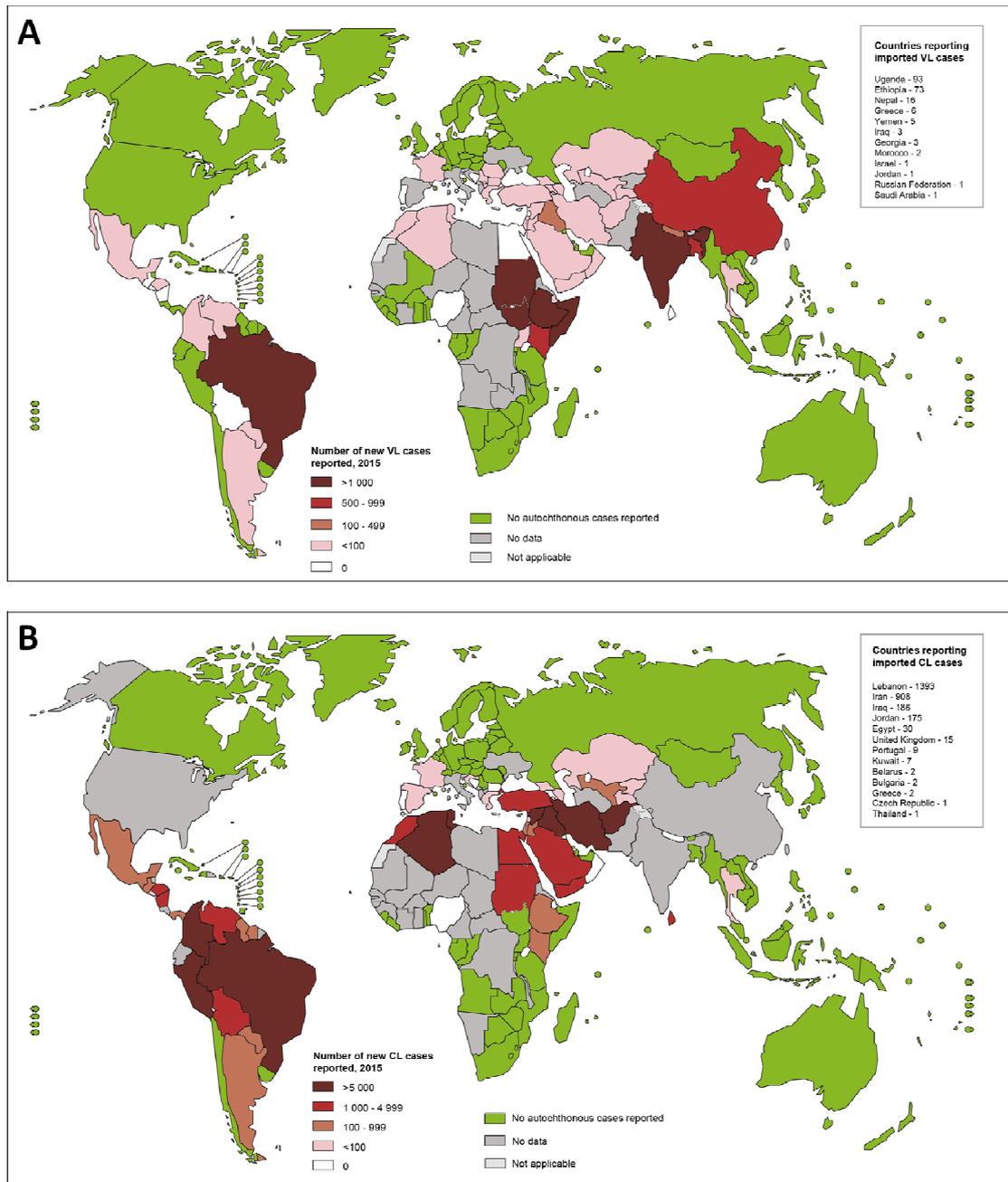


Figura 1 – Número de casos de Leishmaniose Visceral (A) e Leishmaniose Cutânea (B) no mundo (2015). Fonte: WHO, 2017.

O Brasil é um país que se encontra dentre os países com maior número de casos tanto para a leishmaniose cutânea quanto para a visceral (ALVAR et al., 2012). No Brasil, ambas as formas de leishmaniose apresentam ampla distribuição com registro de casos em todos os estados brasileiros. De 2003 a 2013 foram registrados em todo o país 38.501 casos de leishmaniose visceral e 257.005 casos

de leishmaniose cutânea. Em Minas Gerais, no mesmo período, foram registrados 4.676 e 15.788 casos de leishmaniose visceral e cutânea, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A leishmaniose mucocutânea possui uma frequência de 0,4 % nos casos de leishmaniose cutânea da região sudeste, 1,4 % dos casos da região central e 2,7 % dos casos da região nordeste (GOTO; LINDOSO, 2010). Para a leishmaniose visceral, a maioria dos casos registrados entre 1984 e 2002 ocorreu nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. O Nordeste, na década de 90, era a região brasileira que registrava 90 % dos casos de leishmaniose visceral no Brasil, no entanto, entre 2000 e 2002, o número de casos caiu para 77 % do total de casos registrados no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Em todo o Brasil, de 2003 a 2013 foram registradas 2.641 mortes em decorrência da leishmaniose visceral, o que equivale a quase 7 % do total de casos registrados para a doença no mesmo período (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Em comparação a outros países endêmicos para leishmaniose visceral, o Brasil é o que apresenta a maior ocorrência de óbitos por número de casos, uma vez que o registro do número de mortes associados à essa doença parece ser subestimado em todo o mundo (ALVAR et al., 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010), a pobreza é um fator que aumenta grandemente o risco de infecção por *Leishmania* spp. Isso porque próximo às residências de áreas pobres não existem condições sanitárias adequadas devido à falta de gestão de resíduos, coleta de lixo, e a presença de esgoto a céu-aberto. Tudo isso propicia o aumento das áreas de reprodução dos flebotomos, assim como seu fácil acesso aos hospedeiros vertebrados devido à sua proximidade às residências.

1.2 Agente Etiológico

Os agentes etiológicos das Leishmanioses são protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*. Atualmente são conhecidas mais de 21 espécies potencialmente capazes de infectar o homem (WHO, 2015). No Novo Mundo são conhecidas 11 espécies capazes de causar a leishmaniose cutânea e

apenas uma causando leishmaniose visceral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2014) (Tabela 1).

Esses parasitos são pertencentes ao Filo Kinetoplastida, à Ordem Trypanosomatida, à família Trypanosomatidae (GROBBEN, 1905) e ao Gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Essas espécies podem ser subdividas em dois subgêneros: *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*. Essa classificação separa os dois subgêneros de acordo com o local do flebótomo no qual o parasito se desenvolve, ou seja, parasitos pertencentes ao subgênero *L. (Leishmania)* se desenvolvem no intestino anterior e médio, enquanto que, parasitos do subgênero *L. (Viannia)* se desenvolvem no intestino posterior (LAINSON; SHAW, 1987). Essa sub-divisão também está associada com a distribuição geográfica dessas espécies, sendo que parasitos pertencentes ao sub-gênero *Viannia* compõe apenas espécies do Novo Mundo e o subgênero *Leishmania* possui espécies tanto Velho quanto do Novo Mundo (SHAW, 1994). Esses dois subgêneros podem ainda ser separados por meio de marcadores moleculares como, por exemplo, o gene do mini-éxon (SL, *spliced leader*), envolvido no processo de *trans-splicing* em *Leishmania* spp. A amplificação de regiões conservadas desse gene geraram fragmentos de diferentes tamanhos para cada subgênero (*Viannia* e *Leishmania*), e também, foram capazes de separar com sucesso espécies do subgênero *Leishmania* do Novo e do Velho Mundo (MARFURT et al., 2003). (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies de *Leishmania* capazes de infectar humanos.

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>		
		<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killickia</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>	
			<i>L. guyanensis</i>	
		<i>L. infantum</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. shawi</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. pifanoia</i>	<i>L. naiffi</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. garnhamia</i>	<i>L. lindenbergi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis</i>	
Principal Tropismo	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

Fonte: WHO, 2010. (Traduzida e Adaptada).

No Velho Mundo a leishmaniose visceral é causada por parasitos do complexo *L. donovani* e *L. infantum*. Os casos de leishmaniose visceral do Novo Mundo resultam da transmissão zoonótica de parasitos da espécie de *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin. *L. chagasi*) (WHO, 2010). Os cães são os principais reservatórios e podem facilmente atrair o vetor, promovendo a manutenção do ciclo e a transmissão em ambiente doméstico (MORENO; ALVAR, 2002).

Durante muito tempo, acreditou-se que *L. chagasi* era uma espécie distinta de *L. infantum* do Velho Mundo. Porém, diferentes abordagens moleculares falharam em distinguir esses parasitos em nível de espécie (STEVERDING, 2017). Dessa forma, *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie e, seguindo-se a “ordem de prioridade” da taxonomia, o primeiro nome prevalece, sendo ambas denominadas como *L. infantum* (DANTAS-TORRES, 2006). Dantas-Torres (2006) ainda sugere que a denominação *L. chagasi* seja colocada entre parênteses após *L. infantum* com o intuito de se referir à área de isolamento do parasito (DANTAS-TORRES, 2006).

A leishmaniose cutânea é complexa, devido à grande variação intra- e inter-específica dos ciclos de transmissão dos hospedeiros que servem como reservatório da doença, dos vetores, das manifestações clínicas, da resposta a quimioterapia e à grande quantidade de espécies de *Leishmania* em circulação na mesma área geográfica. A associação de todos esses fatores torna difícil a definição específica sobre os dados da epidemiologia e ocorrência da leishmaniose cutânea no Novo Mundo (REITHINGER et al., 2007). Das 11 espécies de *Leishmania* causadoras da forma cutânea presentes no Novo Mundo, sete foram identificadas causando a doença no Brasil. Dessas sete, seis delas pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. As três espécies com maior importância epidemiológica no Brasil são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em Minas Gerais e em Belo Horizonte, *L. braziliensis* é a espécie predominante nos casos reportados de leishmaniose cutânea (PASSOS et al., 1999).

As estratégias de controle para as Leishmanioses englobam o controle de vetores e reservatórios, o uso de materiais impregnados com inseticidas e tratamento dos doentes (CHAPPUIS et al., 2007). No Brasil é recomendada a eutanásia de cães infectados, como método de controle de reservatórios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.3 Ciclo de Vida e Biologia de *Leishmania* spp.

Os tripanossomatídeos são caracterizados principalmente pela presença de uma mitocôndria única e ramificada, na qual está situado o cinetoplasto que fica próximo à base do flagelo que contém o kDNA (DNA mitocondrial). O kDNA é composto por sequências repetidas de DNA organizadas em uma rede de DNAs circulares grandes (maxi-círculos) e pequenos (mini-círculos) (SIMPSON, 1987, SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Assim como o DNA mitocondrial de outros eucariotos, os maxi-círculos codificam sequências do RNA ribossomal e de proteínas envolvidas no transporte de elétrons (ciclo de Krebs) e na fosforilação oxidativa (SIMPSON, 1987).

Estes parasitos apresentam ciclo de vida heteroxênico com duas principais formas de vida distintas: a forma amastigota e a forma promastigota (Figura 2 – A, B e C), sendo por isso classificado como dimórficos. As formas amastigotas são parasitos intracelulares que infectam células do sistema fagocitário mononuclear de vertebrados, como macrófagos. Elas possuem a forma arredondada, são menores do que as formas promastigotas, imóveis e possuem apenas um flagelo rudimentar interno. As formas promastigotas são alongadas e móveis, detentoras de um único flagelo e encontram-se no hospedeiro invertebrado (MICHALICK, 2005).

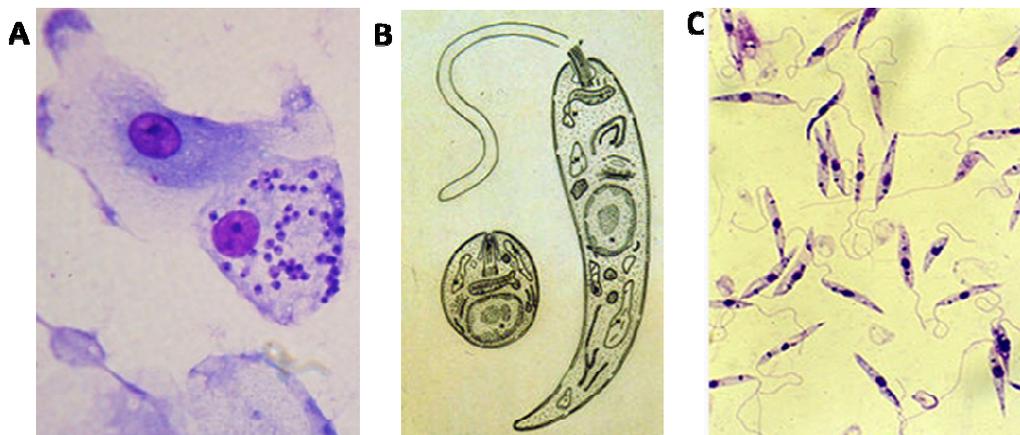


Figura 2 – Morfologia de *Leishmania* spp. (A) Microscopia óptica de formas amastigotas intracelulares dentro de macrófagos. (B) desenho esquemático da morfologia de amastigotas (à esquerda) e promastigotas (à direita) e (C) Microscopia óptica de formas promastigotas. Fonte: (A) <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32>, (B) <http://www.dbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm> e (C) http://1.bp.blogspot.com/_8xg6npjRLj8/SyLe9UwrVFI/AAAAAAAAASY/RWq_ZeZdFmY/w1200-h630-p-k-no-nu/Leishmania2.jpg.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos por flebótomos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho e no Novo Mundo respectivamente (REITHINGER et al., 2007). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose cutânea são *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* e, na transmissão da *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) apenas duas espécies foram descritas: *L. longipalpis* e *L. cruzi*, sendo a primeira a mais encontrada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2014).

No ciclo de vida desses parasitos quando flebótomos fêmea fazem o repasto sanguíneo, e durante a alimentação passam as formas infectantes (promastigotas

metacíclicos) de *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado. Essa passagem acontece devido à obstrução da válvula estomodeal do intestino ocasionada pela secreção de um gel (PSG – do inglês *promastigote secretory gel*) pelas formas leptomonadas, precursora da forma infectante (BATES, 2007). Durante a alimentação, essa obstrução força o flebótomo regurgitar os parasitos infectivos que então ganham a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Uma vez na corrente sanguínea, esses parasitos, por intermédio de seus flagelos, vão interagir com células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas sendo, em seguida, internalizadas para o interior de vacúolos parasitóforos (LIÉVIN-LE MOAL; LOISEAU, 2015). A transformação para a forma amastigota é associada à temperatura elevada (37 °C humano), ao pH ácido (pH 5.5) do vacúolo parasitóforo e outros tipos de sinais, como por exemplo, sinais de estresse (SPÄTH et al., 2015). Após a transformação, esses parasitos são disseminados para o meio extracelular (extrusão) por meio de bolhas originadas por zeiose e que possuem componentes da membrana do fagolisossomo (REAL et al., 2014). Essas bolhas recheadas de amastigotas são então internalizadas por macrófagos vizinhos e uma nova rodada de replicação e extrusão se inicia (REAL et al., 2014). Para que o ciclo passe para o hospedeiro invertebrado é necessário que um flebótomo se alimente do sangue de hospedeiros vertebrados infectados. Nesta etapa, as formas amastigotas localizadas dentro dos macrófagos ou livres no sangue são então ingeridas e encaminhadas ao intestino do inseto. Os parasitos da forma amastigota irão se diferenciar para a forma promastigota procíclica, que não é infectiva ao hospedeiro vertebrado. Estas formas migram para a parte anterior do intestino do flebótomo onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas que são as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado, por meio de um processo denominado metaciclogênese (GOSSAGE et al., 2003). Essas formas irão causar obstrução obrigando o flebótomo a regurgitá-las em um novo hospedeiro no próximo repasto sanguíneo (Figura 3).

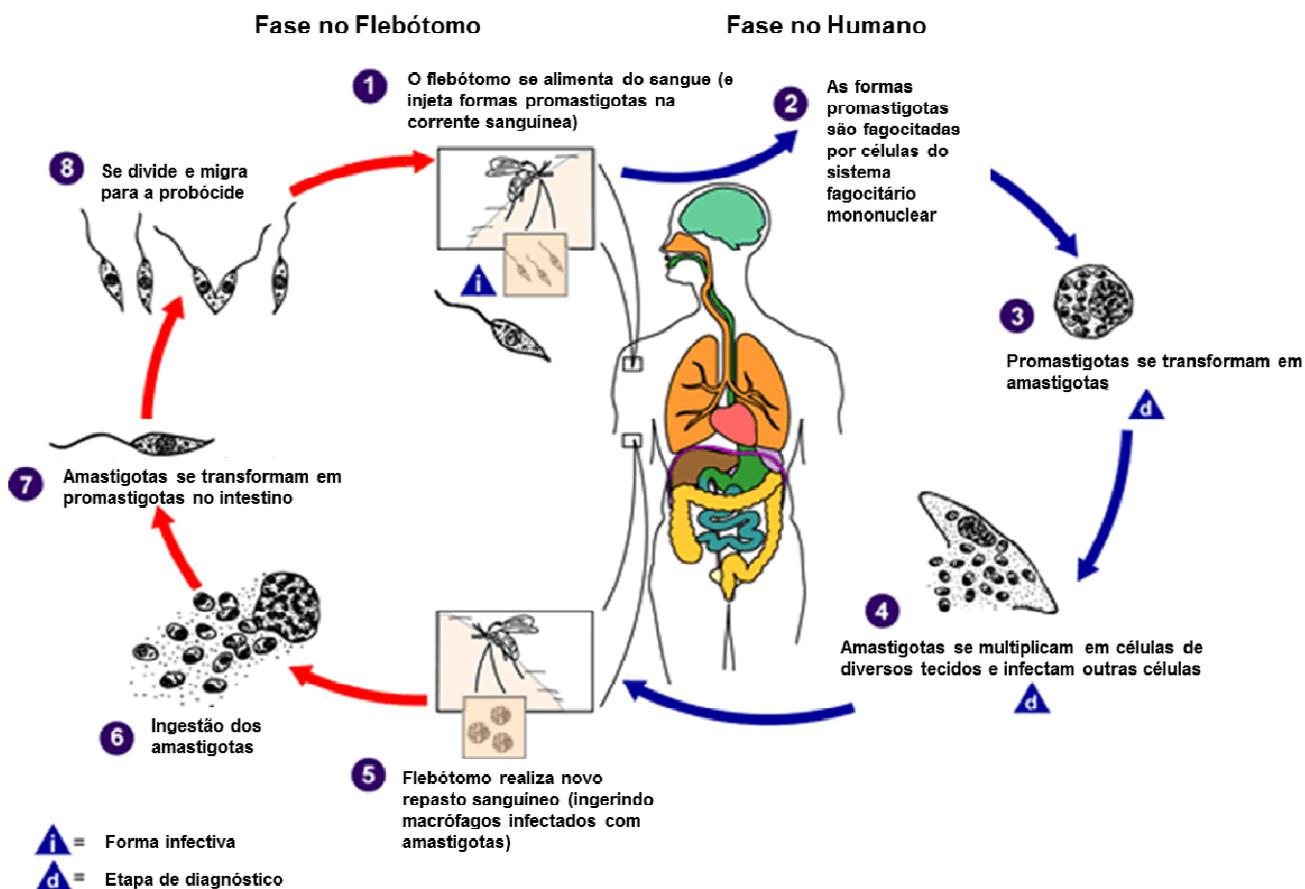


Figura 3 – Ciclo Biológico de *Leishmania* spp. Em vermelho: Parte do ciclo que acontece no flebótomo. Em azul: Parte do ciclo que acontece no hospedeiro vertebrado. Os números indicam e ordenam a sequência do desenvolvimento a partir da inoculação de *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado. Fonte: Center of Disease Control and Prevention – CDC (2015) (Traduzido).

Apesar de morfologicamente distintas e o ambiente no qual cada uma das formas sobrevive serem diferentes, análises comparando as duas formas de vida de *L. major*, mostrou que mais de 94 % dos genes são expressos em ambas as formas do parasito (LEIFSO et al., 2007). A análise comparativa do proteoma de *L. infantum* mostrou que 72 % das proteínas identificadas são constitutivamente expressas em ambas as formas, havendo apenas 20 % de proteínas com maior nível de expressão em promastigotas e 8 % em amastigotas (LEIFSO et al., 2007). Já as análises de microarranjo de DNA das formas promastigotas e amastigotas de *L. major* e *L. infantum*, mostraram que entre 91 e 93 %, respectivamente, dos genes expressos não são significativamente modulados quando comparada a expressão gênica dessas duas formas evolutivas da mesma espécie (ROCHETTE et al., 2008). Esse

estudo também mostrou que quando os padrões de expressão entre uma ou outro estágio de vida eram comparados entre as duas espécies, *L. major* e *L. infantum*, uma diferença significativa na expressão de mRNA era observada. Isso pode estar relacionado ao diferente tropismo dos parasitos (ROCHETTE et al., 2008). Um estudo de diferenciação de promastigota para amastigota em *L. donovani*, mostrou que durante a diferenciação modificações pós-traducionais como fosforilação, metilação, acetilação e glicosilação de proteínas acontecem (MORALES et al., 2008, ROSENZWEIG et al., 2008), indicando que tais modificações tenham importância no desenvolvimento intracelular.

Apesar do ciclo acima representar a transmissão apenas entre flebótomo e humanos, no Novo Mundo a transmissão das leishmanioses é considerada zoonótica, ou seja, o homem é um hospedeiro acidental do ciclo. Assim, a manutenção do ciclo está diretamente ligada à presença de algum reservatório da doença. Esse reservatório irá manter a circulação do parasito na natureza por um determinado tempo e espaço (AGUILAR et al., 1989). Nos centros urbanos, os cães têm sido apontados como os principais reservatórios dos agentes causadores da leishmaniose visceral. Em todos os locais de registro da doença humana, os cães são encontrados infectados, e por isso, são considerados como o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (MELO, 2004). De acordo com o Ministério da Saúde (2014), a presença de cães infectados sempre precede a infecção no homem, e que, cerca de 40 a 60 % dos cães infectados são assintomáticos para a doença, dificultando o controle das áreas de infecção. Na Índia, o ciclo das Leishmanioses é antroponótico, sendo composto por vetor e homem, sem a presença de outro hospedeiro vertebrado como intermediário. Nesses casos a transmissão da infecção é mais ativa. Esse tipo de ciclo favorece o aumento da resistência ao antimônio (SUNDAR, 2001).

1.4 Manifestações Clínicas

As Leishmanioses possuem três formas principais de apresentação da doença em humanos: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (WHO, 2017).

A infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania* pode não ser aparente, dando origem aos casos assintomáticos da doença. Esses casos só são diagnosticados quando o paciente aparentemente sadio obtém resultado positivo no teste sorológico. Porém, para serem considerados como assintomáticos esses pacientes não podem possuir histórico de infecção por *Leishmania* spp. ou mesmo cicatriz de lesão cutânea ou mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

As lesões apresentadas na manifestação clínica da leishmaniose cutânea podem ser únicas ou múltiplas, dependendo do número de picadas do flebótomo infectado ou mesmo da disseminação local do parasito (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O primeiro sinal da infecção é devido ao aparecimento de um pequeno eritema que se desenvolve em uma pápula e, posteriormente, em um nódulo que progressivamente se transforma em uma úlcera característica da leishmaniose cutânea. O aparecimento e a evolução das lesões acontecem em um período que pode variar de duas semanas a seis meses. Essas lesões variam em severidade, aparência clínica e tempo de cura. As lesões causadas por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. tropica* podem levar entre seis e 15 meses para a cura espontânea, enquanto que as causadas por *L. major* de dois a seis meses e de três a nove meses para *L. mexicana*. A cura espontânea resulta em uma proteção para toda a vida contra a leishmaniose que pode ou não ser restrita à espécie que causou a infecção (REITHINGER et al., 2007). Nos cães, as mudanças na derme incluem dermatites exfoliativas, ulcerativas, nodulares e pustulares, que podem ou não ser provocadas por respostas inflamatórias à presença do parasito na pele (BANETH et al., 2008).

A leishmaniose mucocutânea ocorre depois do início da leishmaniose cutânea e é caracterizada pela destruição das cavidades oral, nasal e faríngea, evoluindo para lesões desfigurantes. Os sintomas iniciais são inflamação nasal e congestão, mas ulceração e perfurações no septo nasal podem acontecer lentamente. As

lesões podem aparecer na face, no palato mole, na faringe ou na laringe. Parasitos da espécie *L. braziliensis*, são encontrados mais frequentemente causando esse tipo de lesão, porém *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. major* também podem ser encontradas como as causadoras da leishmaniose mucocutânea (GOTO; LINDOSO, 2010).

A leishmaniose visceral é reconhecida por ser a forma mais severa e por levar até 90 % dos pacientes a morte se não tratada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Os pacientes com leishmaniose visceral apresentam sintomas e sinais de uma infecção sistêmica persistente que incluem febre, fadiga, cansaço, perda de apetite e de peso, além de invasão parasitária no sangue e sistemas retículo-endoteliais que se caracterizam por linfonodos, fígado e baço aumentados (CHAPPUIS et al., 2007). O aumento da ocorrência das manifestações clínicas da leishmaniose visceral, além estarem associada às condições imunológicas do hospedeiro, estão também associadas à má nutrição devido ao baixo consumo de alimentos com baixa qualidade nutricional, incluindo baixa ingestão de ferro, vitamina A e zinco (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral no cão é uma doença multisistêmica na qual os animais infectados podem apresentar uma série de manifestações clínicas que variam desde sintomas generalizados (fraqueza, letargia, hipotrofia muscular, febre, epistaxia, mucosa pálida, aumento dos linfonodos, hepatoesplenomegalia, inchaço nas articulações, sintomas gastrointestinais ou neurológicos) à sintomas cutâneos e mucocutâneos (dermatites: descamativa, ulcerativa, papular, nodular e/ou pustular; lesões nasais tipo lúpus ou pênfigo, onicopatía (crescimento exagerado das unhas), hiperkeratose nasodigital) e sintomas oculares (lesões nas pálpebras, lesões conjuntivais difusas ou nodulares, lesões na córnea, ceratite nodular e ceratoconjuntivite, lesão escleral, lesões na úvea e na órbita) (PALTRINIERI et al., 2010).

1.5 Tratamento

A Organização Mundial da Saúde (2010) recomenda diferentes escolhas de tratamento dependendo dos sintomas apresentados e das características do paciente e da doença. As principais drogas indicadas para o tratamento das leishmanioses são formulações com o antimônio pentavalente (SbV), a anfotericina B (AmB) deoxicolato e em formulação lipossomal, paramomicina, pentamidina e mitelfosina. As formulações contendo SbV são consideradas as drogas de primeira escolha no tratamento tanto da leishmaniose cutânea quanto da visceral (BERMAN, 1997). Nas regiões hiperendêmicas de Butão, Nepal e Índia, a droga de primeira escolha é a Anfotericina B lipossomal devido aos altos índices de resistência ao tratamento com o antimônio (WHO, 2010, 2017). Na região hiperendêmica de Bihar, na Índia, a falha terapêutica no tratamento da leishmaniose visceral chega de 50 a 65 % de todos os pacientes tratados com SbV (SUNDAR, 2001).

1.5.1 Antimônio Pentavalente

Existem dois medicamentos que contêm a forma pentavalente do antimônio (Sb) em sua formulação, são o Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) e o Pentostam® (estibogluconato de sódio). No Brasil, apenas o Glucantime® está disponível, e esta é considerada a droga de primeira escolha para o tratamento tanto da leishmaniose visceral quanto da cutânea (RATH et al., 2003). Esse medicamento é distribuído em ampolas de 5 mL, contendo 405 mg de SbV. A dose recomendada para o tratamento da leishmaniose cutânea localizada ou disseminada é de 10 a 20 mg de SbV kg/dia, sem ultrapassar o limite de duas a três ampolas diárias, sugerindo-se 15 mg de SbV kg/dia tanto para adultos quanto para crianças por 20 dias seguidos. Para as lesões mucosas a dose recomendada é de 20 mg de SbV por kg/dia durante 30 dias seguidos, sem extrapolar as dosagens anteriormente citadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Para o tratamento da leishmaniose visceral, uma dose de 20 mg de SbV kg/dia com tratamento entre 20 e 40 dias com

o limite de duas – três ampolas por dia, é o recomendado e apresenta bons índices de cura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Para todos os tratamentos citados, as injeções do Glucantime® devem ser feitas por via intravenosa ou intramuscular. As taxas de cura no tratamento da leishmaniose visceral com SbV ao redor do mundo são maiores do que 90 % (WHO, 2010).

A utilização do Glucantime® não deve ser feito por gestantes, e há restrições quanto ao uso por pacientes com menos de dois anos e mais de 45 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doenças de Chagas, sendo normalmente recomendada a utilização da segunda droga de escolha, a Anfotericina B (CHAPPUIS et al., 2007, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2014).

Mesmo sendo a droga utilizada no tratamento clínico, o SbV possui diversas limitações como efeitos colaterais, necessidade de administração diária e resistência ao medicamento. Dentre os efeitos colaterais do tratamento com SbV a anorexia, vômito, náuseas, mialgia, artralgia, dor de cabeça, paladar metálico e letargia são frequentes (OLIVEIRA et al., 2011). Devido a essa grande quantidade de efeitos colaterais, as drogas que possuem o antimônio como princípio ativo são consideradas altamente tóxicas (CHAPPUIS et al., 2007).

1.5.2 Anfotericina B

A AmB é um potente antifúngico que, desde 1959, teve sua utilização também recomendada para o tratamento das leishmanioses. Apesar dos bons resultados obtidos com o tratamento, esse medicamento é altamente tóxico sendo a nefrotoxicidade seu efeito tóxico mais grave (GOLENSER; DOMB, 2006). Para reduzir a toxicidade e aumentar o efeito terapêutico da AmB, três formulações lipossomais foram desenvolvidas: o complexo lipídico de AmB (ABLC), a AmB lipossomal (L-AmB) e AmB em dispersão coloidal (ABCD) (HAMILL, 2013). As três formulações apresentam diferentes fármaco-cinéticas, mas todas reduziram significativamente os efeitos nefrotóxicos quando comparadas à AmB deoxicolato (HAMILL, 2013). Porém, o alto custo, em relação ao custo do tratamento com compostos antimoniais, é um limitante para sua ampla utilização (SINGH et al., 2012).

O mecanismo de ação da AmB contra *Leishmania* spp. é o mesmo observado nos fungos. A AmB se liga ao ergosterol presente na membrana celular do parasito, o que leva à formação de agregados que criam canais transmembrana. Esses canais alteram a permeabilidade da membrana a cátions, moléculas de água e glicose, alterando, conseqüentemente, o equilíbrio osmótico do parasito, o levando a perder íons de magnésio e potássio e, finalmente, à morte (KAUR; RAJPUT, 2014). No entanto, embora tenha menor afinidade, a AmB ainda é capaz de ligar ao colesterol das células dos hospedeiros vertebrados, e isso, é o principal fator responsável pela sua toxicidade (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Resistência à AmB em isolados de campo são raras, apesar de pacientes com co-infecção de leishmaniose visceral e HIV possuírem uma grande taxa de recaídas, resistência à AmB não foi detectada até o momento (KAUR; RAJPUT, 2014). Apenas em uma região não endêmica da Índia, foi identificado em um paciente uma linhagem de *L. donovani* resistente à AmB (SRIVASTAVA et al., 2011). Isso chama a atenção para um possível surgimento de resistência com o uso de AmB. A análise de um isolado clínico de *L. donovani* resistente à AmB, mostrou que essa linhagem possuía uma maior fluidez da membrana, além da ausência de ergosterol, substituído por colest-5,7,24-trien-3 β -ol com menos afinidade pela AmB (MBONGO et al., 1998). Além disso, um aumento na expressão de MDR1 e a regulação da via metabólica de tióis, indicam um aumento do efluxo da droga e da detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species) produzidas pela AmB, respectivamente (PURKAIT et al., 2012).

1.5.3 Paramomicina

Esse medicamento é um antibiótico aminoglicosídico com efeito bactericida e leishmanicida. Seu uso como uma droga contra as leishmanioses foi iniciado em 2006, na forma de sulfato de paromomicina (WIWANITKIT, 2012). É um medicamento de baixo custo, uma boa eficácia e um tempo curto de administração, porém, com o alto risco de gerar resistência com seu uso em monoterapia novas formulações estão sendo elaboradas (MOHAPATRA, 2014). Seus principais efeitos

colaterais são formação de eritema, dor, edema (acúmulo de líquido no interstício e nas cavidades do corpo) e ototoxicidade (dano aos sistemas coclear e/ou vestibular resultante de exposição à substâncias químicas) (KAUR; RAJPUT, 2014). O principal mecanismo de ação da paromomicina é inibir a síntese de proteínas. Isso ocorre porque ele interage com a subunidade 16S do RNA ribossomal impedindo a tradução (WIWANITKIT, 2012).

1.5.4 Pentamidina

A pentamidina é uma diamina aromática cujo exato mecanismo de ação em *Leishmania* spp. ainda é desconhecido. Porém, sabe-se que a pentamidina é capaz de inibir atividade da S-adenosilmetionina decarboxilase, interferindo diretamente na síntese de poliaminas. Além disso, ela atua reduzindo o potencial de membrana devido ao seu acúmulo na mitocôndria do parasito (BASSELIN et al., 1996). A pentamidina é altamente tóxica e os principais efeitos adversos são hipoglicemia, nefrotoxicidade, hipotensão, entre outros (SINGH et al., 2012).

1.5.5 Miltefosina

Miltefosina pertence à classe da alquilfosfocolina, classe de compostos que foram inicialmente usados para o tratamento de câncer, apesar dos estudos iniciais indicarem uma boa atividade contra protozoários (CROFT; ENGEL, 2006). Ela foi a primeira droga de uso oral a apresentar uma taxa de cura em torno de 94 % das leishmanioses em países do Velho Mundo (SUNDAR et al., 2002). No entanto, testes *in vitro* usando miltefosina, mostraram que essa droga é cerca de 20 vezes mais ativa contra as espécies de *Leishmania* do Velho Mundo do que contra as principais espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (MORAIS-TEIXEIRA et al., 2011). Isso limita o uso dessa droga devido à baixa eficácia *in vitro*, porém testes *in vivo* necessitam ser realizados para comprovar a eficiência reduzida nessa

condição. Os estudos que investigaram o modo de ação da miltefosina mostraram que a atividade contra *Leishmania* spp. e células neoplásicas são muito similares e estão associados à indução de apoptose e distúrbios nas vias de sinalização celular dependente de lipídios (DORLO et al., 2012). Recentemente no Brasil, a miltefosina (MilteforanTM) foi liberada para tratamento de cães com leishmaniose (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABRASTECIMENTO, 2016). Essa nota técnica destaca que a liberação foi fundamentada no fato de a miltefosina não ser usada no tratamento da leishmaniose humana no Brasil, e não apresentar eficácia suficiente para ser incorporada ao protocolo terapêutico da leishmaniose visceral para humanos no país (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABRASTECIMENTO, 2016). Apesar de não se tratar de uma ação de saúde pública, uma vez que o tratamento é de escolha do proprietário (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABRASTECIMENTO, 2016), essa medida pode contribuir para a redução da eutanásia de animais infectados e na redução do número de reservatórios, além disso, não oferece risco para o desenvolvimento de resistência no tratamento de humanos.

1.6 Mecanismos de Ação do Antimônio Trivalente (SbIII)

Apesar do uso extensivo e longo dos compostos de antimônio no tratamento das Leishmanioses, seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido (Figura 4). Sabe-se que a forma pentavalente é a forma administrada nos pacientes com a doença, no entanto, para ter ação leishmanicida, esse composto precisa ser reduzido para a sua forma trivalente (SbIII) (SHAKED-MISHAN et al., 2001). Tanto as formas promastigotas quanto as formas amastigotas são capazes de acumular SbV e SbIII no seu compartimento intracelular (BROCHU et al., 2003). Há evidências que a redução à forma trivalente pode acontecer tanto no macrófago (SERENO et al., 1998) quanto dentro do próprio parasito (SHAKED-MISHAN et al., 2001). Recentemente, foi descrito que a redução pode ser realizada, dentro do parasito, por meio da enzima Redutase Dependente de Tiol (TDR1 – do inglês, Thiol-Dependent Reductase) (FYFE et al., 2012). A enzima antimoniato redutase (ACR2) também

atua na redução enzimática de SbV (ZHOU et al., 2004). Estudos sobre a redução não-enzimática são menos definitivos, mas sabe-se que esse tipo de redução pode ocorrer com o auxílio de tripanotona ($T(SH)_2$) no parasito e, com o auxílio de cisteína e cisteína-glicina nos compartimentos ácidos das células de mamíferos (FERREIRA et al., 2003).

O transporte de SbV e SbIII são feitos por diferentes vias (BROCHU et al., 2003), no entanto, ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual o SbV é transportado para o meio intracelular (FRÉZARD et al., 2014). O transporte de SbIII para o interior de *Leishmania* spp. é realizado pela proteína de membrana Aquagliceroporina 1 (AQP1) (GOURBAL et al., 2004).

Estando no ambiente intracelular, o SbIII pode atuar no parasito de diversas formas. É certo que não existe apenas um mecanismo de ação para explicar a toxicidade do SbIII, e sim, um conjunto de alterações que são responsáveis por culminar na morte do parasito. O SbIII, além de inibir a ação da tripanotona redutase (TR) (CUNNIGHAM; FAIRLAMB, 1995), enzima envolvida na reciclagem de $T(SH)_2$, reduz os níveis de tióis não protéicos (cisteína, glutatona (GSH) e $T(SH)_2$) no citosol pela indução do efluxo dessas moléculas (WYLLIE et al., 2004). Essa interferência do SbIII no metabolismo da tripanotona reduz amplamente a capacidade de proteção do parasito contra o estresse oxidativo. Esse estresse é um dos mecanismos usados pelas células do sistema monofagocitário do hospedeiro vertebrado para eliminar microorganismos (STAFFORD et al., 2002).

O Sb também é capaz de inibir a via da glicólise e a oxidação dos ácidos graxos (BERMAN et al., 1987), o que reduz a fosforilação de ADP e GDP em ATP e GTP, respectivamente, ocasionando um decréscimo na síntese de proteínas, RNA e DNA, tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas de *L. mexicana* (BERMAN et al., 1985). Morte celular programada semelhante à apoptose foi descrita como decorrência do tratamento com SbIII (SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003). Formas amastigotas de *L. donovani* tratadas com SbIII apresentaram degradação de DNA e exposição de fosfatidilserina, eventos esses que foram precedidos pela redução do potencial de membrana e pelo aumento da síntese de ROS (SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003). O aumento de ROS levou ao aumento da entrada de cálcio (Ca^{2+}) no parasito (SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003). A participação

do Ca^{2+} é conhecidamente um evento associado à morte celular por apoptose em *Leishmania* (MOREIRA et al., 1996). Corroborando a relação de Ca^{2+} com morte do similar à apoptose em *Leishmania*, formas promastigotas de *L. donovani* tratadas com SbIII mostraram aumento do influxo de Ca^{2+} , devido ao aumento de ROS, que culminou com morte do tipo-apoptótica não correspondente à via clássica de apoptose mediada por caspases (MUKHERJEE et al., 2002).

O arsênio na sua forma trivalente (AsIII) é um metal que mostrou resistência cruzada ao SbIII tanto *in vitro* (DEY et al., 1994) quanto *in vivo* (PERRY et al., 2013). No entanto, os seus mecanismos de ação parecem não ser completamente similares, apesar de ambos serem capazes de diminuir o potencial de membrana, os níveis de ATP, desregular a função mitocondrial e mudar a morfologia das formas promastigotas (MEHTA; SHAHA, 2006). Esses eventos ocasionados por AsIII e SbIII, levam a um grande aumento da produção de ROS, no entanto, apenas SbIII reduz os níveis de GSH e a suplementação do meio de cultura com GSH é capaz de proteger os parasitos da morte apenas contra essa droga. Adicionalmente, o aumento dos níveis de Ca^{2+} é observado apenas nos parasitos tratados com AsIII e não com SbIII (MEHTA; SHAHA, 2006). No entanto, o aumento dos níveis de Ca^{2+} já foi observado em *Leishmania* spp. em resposta a presença de antimônio (MOREIRA et al., 1996, MUKHERJEE et al., 2002, SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003).

1.7 Mecanismos de Resistência de *Leishmania* spp. ao Antimônio

Assim como o modo de ação do Sb em *Leishmania* spp., os mecanismos de resistência são complexos, variados e envolvem diferentes vias moleculares no parasito. Alguns mecanismos de resistência são propostos, porém acredita-se que a resistência ao Sb não seja fruto de um único mecanismo e sim da interação de vários deles, o que contribui para que a resistência em *Leishmania* spp. seja multifatorial (KAUR; RAJPUT, 2014) (Figura 4). Além disso, os mecanismos de resistência podem não ser universais para todas as espécies de *Leishmania*.

A amplificação gênica é uma estratégia utilizada por *Leishmania* spp. para aumentar os níveis de determinado produto envolvido nos mecanismos de resistência. A amplificação do gene da *mrpa*, um transportador do tipo ABC, foi

observada em diversos estudos com espécies de *Leishmania* resistentes ao Sb (GRONDIN et al., 1997, MOREIRA et al., 2013). Esse transportador propicia a retirada do Sb ligado a tióis (complexo Sb-tiol) do ambiente intracelular para um compartimento intravesicular próximo à bolsa flagelar que ainda não foi descrito (LEGARÉ et al., 2001). Em linhagens de *L. guyanensis* e *L. amazonensis* resistentes ao SbIII, não foi observada amplificação gênica do gene *mrpa*, porém os transcritos desse gene foram encontrados aumentados, assim como a expressão da fosfoglicoproteína de membrana (do inglês Phosphoglycoprotein, Pgp) (MOREIRA et al., 2013). Em outra linhagem de *L. amazonensis*, selecionada *in vitro* para resistência ao SbIII, a amplificação gênica do gene *mrpa* foi observada (DO MONTE-NETO et al., 2011). Outro mecanismo de resistência é a diminuição da entrada de SbIII no parasito associada à deleção do gene que codifica para a AQP1 (GOURBAL et al., 2004). Em *L. guyanensis* resistente ao SbIII, o gene da aquagliceroporina 1 (*aqp1*) foi deletado (MONTE-NETO et al., 2015). Redução na expressão da proteína de membrana AQP1 também foi observado em *L. guyanensis* e *L. amazonensis* resistente ao SbIII (MOREIRA et al., 2013).

A redução do SbV para a forma ativa da droga SbIII é necessária, e, em *L. donovani* resistente ao Sb, a redução de SbV em SbIII é deficiente, indicando a diminuição da redução como um mecanismo de resistência ao Sb (SHAKED-MISHAN et al., 2001).

Como o modo de ação do Sb também inclui o distúrbio no balanço redox do parasito devido ao aumento da produção de ROS e à inibição da tripanotona redutase (WYLLIE et al., 2004), o aumento da expressão de enzimas e moléculas envolvidas na defesa antioxidante do parasito é também considerado como mecanismo de resistência ao Sb. O aumento dos níveis de tripanotona, uma molécula única em tripanossomatídeos envolvida na defesa antioxidante, foi observada em diversos estudos com *Leishmania* spp. resistente ao Sb (MUKHOPADHYAY et al., 1996; HAIMEUR et al., 2000; MANDAL et al., 2007; MITTAL et al., 2007; MUKHOPADHYAY et al., 2011, RAI et al., 2013). Esse aumento foi associado ao aumento da expressão de algumas enzimas da via de síntese da tripanotona como a gama-glutamilcisteína sintetase (GCS) (GRONDIN et al., 1997, TORRES et al., 2010), da ornitina decarboxilase (ODC) (HAIMEUR et al., 1999,

SINGH et al., 2007) e da glutathione sintetase (GUIMOND et al., 2003). Outras enzimas associadas ao metabolismo antioxidante, como a triparodoxina peroxidase, enzima responsável por hidrolisar as moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, foi encontrada superexpressa em *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) resistentes ao SbIII, e com os níveis de mRNA aumentados em *L. braziliensis* resistente ao SbIII (ANDRADE; MURTA, 2014). Análise proteômica mostrou que a triparodoxina peroxidase também foi mais expressa nas linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistente ao SbIII (MATRANGOLO et al., 2013).

Outras enzimas que apresentam as mais diversas funções em *Leishmania* spp., como proteínas de choque térmico, Hsp 70, Hsp 83 e proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 (KMP11), foram associadas à resistência ao Sb (EL FADILI et al., 2009, MATRANGOLO et al., 2013). Alterações no metabolismo de parasitos resistentes como a variação na composição de lipídios, a diminuição da expressão de calcinerina, o aumento dos níveis glicconjugados de superfície, entre outros, foram observados (KAUR; RAJPUT, 2014). No entanto, foram poucos os estudos que investigaram esses genes e moléculas associados à resistência.

O transportador de membrana ABCI4 pertence à família dos transportadores ABC de *Leishmania* e está localizado nas membranas plasmáticas e mitocondriais (LEPROHON et al., 2006). Esse transportador conferiu resistência ao antimônio em *L. major* por intermediar a extrusão desse metal conjugado à tripanotona (MANZANO et al., 2013)

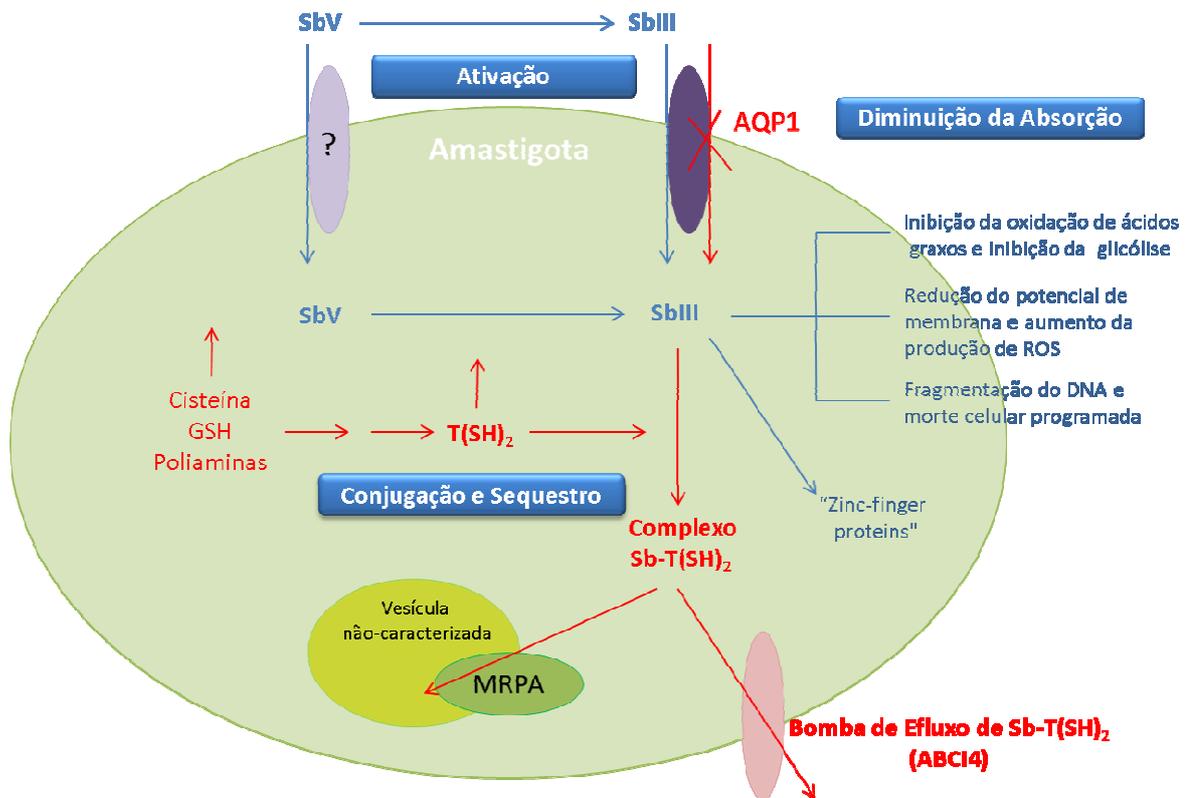


Figura 4 – Mecanismos de ação e resistência ao Sb em *Leishmania* spp. Em azul: indicados os mecanismos de ação do Sb em parasitos susceptíveis. Em vermelho: os principais mecanismos de resistência adquiridos por *Leishmania* spp. ao Sb. Ativação: a conversão de SbV em SbIII é inibida nos parasitos resistentes. Diminuição da Absorção: diminuição da expressão de aquagliceroporina 1 (AQP1) reduz a absorção de SbIII nos parasitos resistentes. Conjugação e Sequestro: Níveis de tióis aumentados (cisteína, glutathione (GSH) e tripanotona (T(SH)₂) e poliaminas) e a formação do complexo antimônio-tiol (Sb-TS) que pode ser sequestrado pela MRPA ou para fora do parasito por um transportador desconhecido. Fonte: Kaur; Rajput, 2014 (Modificado e Traduzido).

1.8 Via de Síntese e Redução da Tripanotona e Metabolismo Antioxidante

A tripanotona é um ditiol sintetizado a partir da conjugação de duas moléculas de glutathione e uma de espermidina (FAIRLAMB, 1985). É uma molécula única em tripanossomatídeos e ocupa papel central no metabolismo antioxidante. Inicialmente, as moléculas do sistema de defesa antioxidante, já caracterizadas em mamíferos, como a glutathione redutase e tioredoxina peroxidase, não foram encontradas em tripanossomatídeos. A tripanotona foi descoberta em 1985 por Fairlamb e colaboradores (1985), sendo identificada como o principal tiol de baixa massa molecular presente em tripanossomatídeos (FAIRLAMB et al., 1985). Esse

tiol atua juntamente com a tripanotiona redutase e a triparedoxina peroxidase, que juntos, formam um eficiente sistema de defesa antioxidante nesse grupo de organismos (MANTA et al., 2013).

O metabolismo antioxidante é essencial para a sobrevivência e também para a diferenciação de promastigota metacíclico para forma amastigota, que ocorre dentro do vacúolo parasitóforo de macrófagos. O bom funcionamento dessa via é essencial, uma vez que macrófagos induzem estresse oxidativo, pela liberação de ROS e espécies reativas de nitrogênio no vacúolo parasitóforo, como forma de eliminar os parasitos (STAFFORD et al., 2002). Durante o processo de diferenciação, uma das principais vias cujos genes são modulados em nível transcricional e pós-transcricional é justamente a via da tripanotiona (MANTA et al., 2013).

A via de síntese da tripanotiona é constituída por duas outras vias: a via de síntese da glutatona, que origina a glutatona (GSH) e a via de síntese das poliaminas, que gera a espermidina (Spd) (Figura 7). A via de síntese da glutatona é semelhante àquela presente em mamíferos. Ela é composta por duas enzimas, a Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS) e a Glutatona Sintetase. A primeira, a GCS, é considerada a enzima limitante do processo uma vez que ela é inibida pelo produto final da via a GSH. Síntese da GSH se inicia pela ação da enzima GCS faz a ligação entre L-cisteína e L-glutamato para formar γ -glutamilcisteína, em uma reação dependente de ATP (MEISTER; ANDERSON, 1983). A ligação peptídica entre essas duas moléculas é realizada através do grupo γ -carboxil do L-glutamato. Isso é importante na reciclagem da γ -glutamilcisteína pela γ -glutamiltranspeptidase, proteína de membrana, que reconhece especificamente essa ligação. Assim, GSH é resistente a degradação intracelular (LU, 2000). A γ -glutamilcisteína é ligada a uma molécula de L-glicina pela segunda enzima da via, a glutatona sintetase, dando origem à GSH. A GSH é um tripeptídeo, γ -glutamilcisteínaglicina, que será unida à Spd para dar origem à tripanotiona (Figura 7) (MANTA et al., 2013).

Os produtos da via de síntese das poliaminas nos tripanossomatídeos são diferentes dos obtidos da via apresentada nos mamíferos. Em tripanossomatídeos, apenas putrescina e espermidina são sintetizados, e não há produção de espermina, devido à ausência da enzima espermina sintase (ILARI et al., 2015). A putrescina é

sintetizada pela ação da ornitina decarboxilase (ODC) que catalisa a decarboxilação de L-ornitina. A S-adenosilmetionina decarboxilase atua na decarboxilação de S-adenosilmetionina em S-adenosilmetiona decarboxilada e um grupo amino propil. Este grupo será unido à putrescina pela espermidina sintase para formar a Spd. Entre os tripanossomatídeos parasitos, apenas *T. brucei* e *Leishmania spp.* são capazes de sintetizar putrescina. *T. cruzi* tem que obter a putrescina de forma auxotrófica, uma vez que não possui a enzima ODC (Figura 7) (BIRKHOLTZ et al., 2011).

A tripanotiona (Figura 6) é sintetizada por uma ligase monomérica dependente de ATP, a Tripanotiona Sintetase (TryS), em uma reação que acontece em duas etapas. Na primeira, há a junção de uma molécula de GSH e uma de Spd, formando o produto intermediário, glutathionilespermidina. A segunda etapa consiste na ligação do intermediário da primeira reação, a glutathionilespermidina, com mais uma molécula de glutathiona. A TryS ainda possui um domínio amidase que catalisa a hidrólise de T(SH)₂ em GSH e Spd, sendo importante para manter a homeostase de T(SH)₂ (MANTA et al., 2013).

A tripanotiona é o mais poderoso agente redutor em tripanossomatídeos quando comparado aos outros tióis disponíveis (glutathionilespermidina, GSH e ovotiol) (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008). Essa molécula é oxidada e retorna a sua forma reduzida pela ação da flavoenzima Tripanotiona Redutase que usa uma molécula de NADPH no processo (TAYLOR et al., 1994). Essa enzima realizada função similar da glutathiona redutase de mamíferos, no entanto, é específica para tripanotiona enquanto a de mamíferos para GSH (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008).

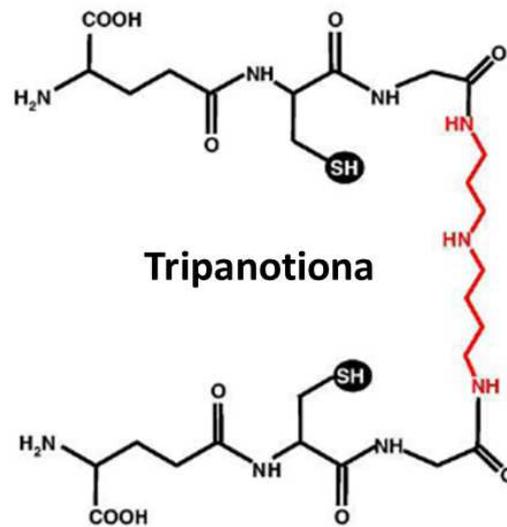


Figura 5 – Estrutura química da tripanotiona na sua forma reduzida. As regiões marcadas indicam nos círculos pretos com SH, os tióis. Em vermelho a parte correspondente à espermidina. Em preto as partes correspondentes às moléculas de glutationa. Fonte: Krauth-Siegel e Comini, 2008 (Traduzido).

O poder de redução da tripanotiona é utilizado como combustível de várias funções celulares como a neutralização de radicais, a redução de biomoléculas e diferentes tipos de dissulfidos em proteínas e compostos de baixo peso molecular, entre outras (MANTA et al., 2013). Dessa forma, a tripanotiona atua como o principal doador de elétrons para a redução de metabólitos oxidados como os envolvidos no sistema de defesa antioxidante como as enzimas e moléculas relacionadas funcionalmente: hidroascorbato (DHA)/ascorbato peroxidase (APx), triparedoxina (TXN)/triparedoxina peroxidase (TXNPx), TXN/glutationa peroxidase-like A (GPxA), glutationa oxidada (GSSG)/glutationa peroxidase-like B (GPxB). As moléculas DHA, TXN e GSSG atuam como intermediários que transferem os elétrons obtidos da tripanotiona para as enzimas que detoxificam ROS e espécies reativas de nitrogênio: a APx, a TXNPx, a GPxA e a GPxB (Figura 7).

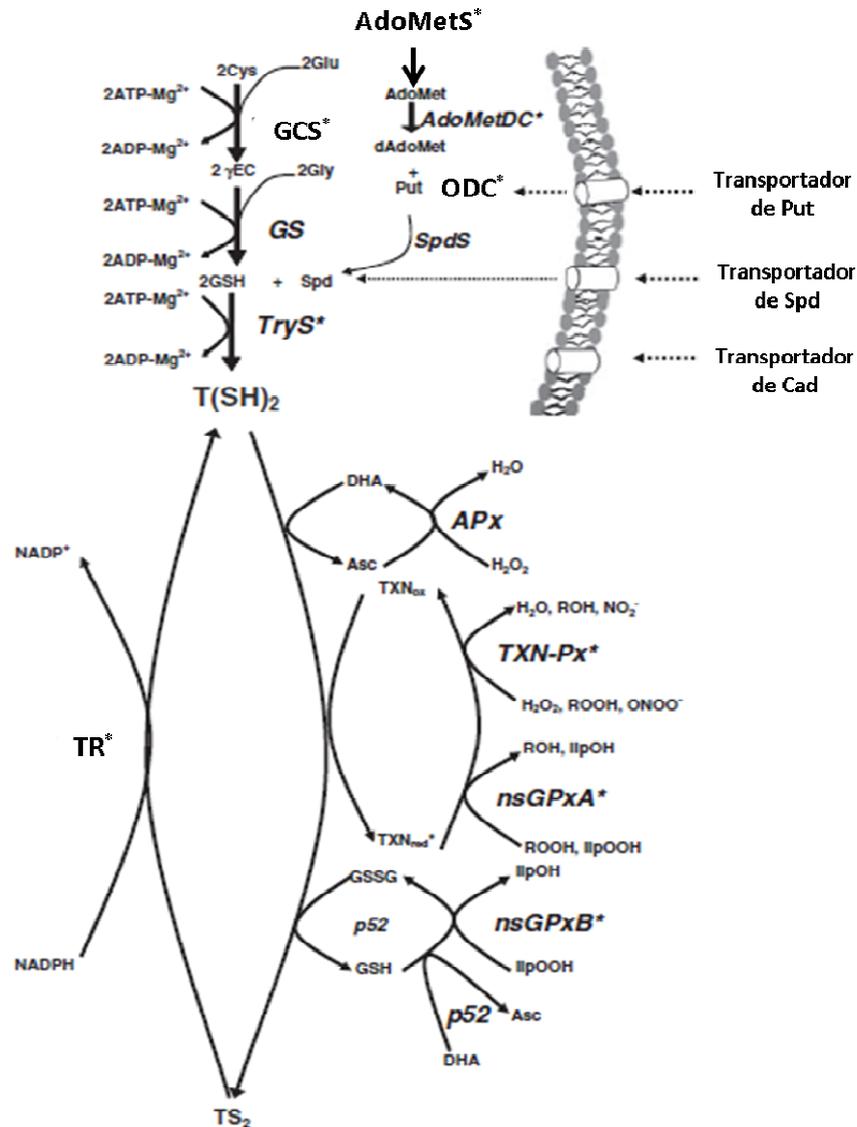


Figura 6 – Metabolismo da tripanotona ($T(SH)_2$) de tripanossomatídeos. $T(SH)_2$ é sintetizada pela Tripanotona Sintetase (TryS) a partir de duas moléculas de glutatona (GSH) e uma de espermidina (Spd). GSH é sintetizada pela ação sequencial de Gama-Glutamilsteína Sintetase (GCS), que liga o glitamato (Glu) e cisteína (Cys) para produzir γ -glutamilsteína (cEC), e Glutatona Sintetase (GS), que liga cEC e glicine (Gly) para produzir GSH. Seis moléculas de ATP são consumidas por mol de $T(SH)_2$ sintetizada. Spmd pode ser sintetizada *de novo* pela espermidina sintase (SpdS) a partir de putrescina (Put) e S-adenosilmetionina descarboxilada (dAdoMet). dAdoMet é sintetizada a partir de S-adenosilmetionona (AdoMet) pela S-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC). AdoMet é sintetizada pela S-Adenosilmetionona Sintetase (AdoMetS). Em *T. brucei* e *Leishmania*, Put pode ser sintetizada *de novo* pela Ornitina Descarboxilase (ODC); *Leishmania* também pode absorver Put do meio usando transportadores de diamine. No sistema antioxidante, $T(SH)_2$ atua como o principal doador de elétrons para a redução de metabólitos (dehidroascorbato, DHA; glutatona oxidada, GSSG) e pequenos ditióis protéicos (glutaredoxinas e triparedoxina (TXN), que transfere elétrons para uma variedade de sistemas de enzimas antioxidantes tais como Ascorbato Peroxidase (Apx), Triparedoxina Peroxidase (TXNPx), Glutatona Peroxidase-like A e B (GPxA and GPxB) e tiol-transferase tripanotona-glutatona (p52). Tripanotona oxidada (TS_2) é regenerada pela Tripanotione Redutase (TR), consumindo NADPH. Asteriscos indicam enzimas que foram geneticamente manipuladas em *T. brucei* e *Leishmania*. Fonte: OLIN-SANDOVAL et al., 2012 (Modificada).

1.8.1 Ornitina Decarboxilase (ODC)

A ornitina decarboxilase é a primeira enzima reguladora da via das poliaminas (COLOTI; ILARI, 2011). A suplementação de putrescina e Spd inibiu a atividade de ODC de *L. donovani* sem prejudicar o crescimento da cultura (MUKHOPADHYAY; MADHUBALA, 1995), mostrando que os níveis de poliaminas podem regular a atividade dessa enzima. No genoma de *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. infantum* a ODC é encontrada em cópia única no cromossomo 12 (tritrypdb.org). A ODC de *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum* possui cerca de 90 % de similaridade, quando comparadas entre si, enquanto a comparação da ODC de *L. major* e *L. braziliensis* mostra apenas 70 % de similaridade entre elas (COLOTTI; ILARI, 2011).

A cristalização da estrutura da ODC de humano mostrou que esta enzima é dimérica, na qual cada domínio da região N-terminal é formado por um motivo estrutural barril- $\alpha\beta$ e cada domínio da região C-terminal forma uma folha- β , que é muito semelhante à estrutura da ODC de *T. brucei* (ALMRUD et al., 2000). Os sítios ativos se encontram na interface dos dímeros, entre o domínio N-terminal de um monômero e o domínio C-terminal do outro. Os resíduos envolvidos na atividade decarboxilase estão no domínio N-terminal e os resíduos que interagem com o substrato no domínio C-terminal do outro dímero (KERN et al., 1999).

A ODC é considerada uma enzima essencial em *Leishmania* spp. apesar desses parasitos serem auxotróficos para poliaminas. Isso porque, na ausência de síntese *de novo* de poliaminas, apenas suplementação externa pode recuperar o crescimento e a infectividade dos parasitos (BOITZ et al., 2009). A inibição de ODC com o inibidor específico DFMO foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. donovani* e de *L. infantum*. Quando usado *in vivo* o DFMO foi capaz de reduzir os números de parasitos no fígado e baço de camundongos infectados com *L. donovani* e *L. infantum*, porém seu efeito foi limitado (BIRKHOLTZ et al., 2011). Possivelmente, devido à localização intracelular das formas amastigotas de *Leishmania* spp., uma quantidade insuficiente de DFMO entrou em contato com os parasitos, tornando o tratamento com esse inibidor ineficiente (OLENYIK et al., 2011). Para *T. brucei*, o tratamento *in vivo* com DFMO foi efetivo ao curar camundongos da infecção (BACCHI et al., 1980). Desde 1990, o DFMO na

forma de Eflornitina é usado no segundo estágio de tratamento de *T. b. gambiense* (MALVY; CHAPPUIS, 2011). A efetividade desse inibidor contra *T. brucei* pode ser explicado pelos seguintes fatores: 1) sendo o DFMO um inibidor irreversível e o *turnover* de ODC no parasito muito lento, a rápida reposição da ODC em mamíferos não confere os danos causados pelo inibidor no hospedeiro, 2) na corrente sanguínea, local onde o parasito vive, há pouca quantidade de poliaminas, tornando a reposição pela captação insuficiente, 3) no sangue, os parasitos estão diretamente expostos ao DFMO, diferentemente dos parasitos intracelulares, como a *Leishmania* (BIKHOLTZ et al., 2011).

1.8.2 Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS)

O gene da gama-glutamilcisteína sintetase responsável pela síntese de gama-glutamilcisteína é encontrado em cópia única no genoma de *L. tarentolae* (GRONDIN et al., 1997). No genoma de *L. infantum* a GCS também possui uma cópia e está localizada na região subtelomérica do cromossomo 18 (MUKHERJEE et al., 2009, 2011). A sequência codificadora desse gene para *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.18.1700*) apresenta 2067 pb e 688 aminoácidos em sua sequência proteica predita, dando origem à uma proteína de aproximadamente 78 kDa. Funcionalmente, a GCS de *T. cruzi* juntamente com a tripanotiona sintetase, são as principais responsáveis pelo controle do fluxo da via de síntese da tripanotiona e do nível celular dessa molécula (OLIN-SANDOVAL et al., 2012). Essa enzima em *T. cruzi* e *T. brucei* são inibidas por glutathiona (GSH), assim como a enzima correlata de mamíferos (LUEDER; PHILLIPS, 1996, OLIN-SANDOVAL et al., 2012).

A estrutura de GCS em mamíferos consiste em uma subunidade catalítica maior (70 kDa) e uma subunidade menor regulatória (30 kDa). Funcionalmente, a subunidade catalítica, mesmo separada da regulatória, mantém toda a atividade catalítica inclusive o efeito inibitório (*feedback* negativo) exercido por GSH. Já a subunidade regulatória modula a atividade catalítica aumentando a afinidade por L-glutamato e reduzindo a afinidade por GSH (LU, 2000). A GCS de *T. brucei*, não possui a subunidade regulatória menor e também não necessita dela para exibir uma alta afinidade ao L-glutamato. No entanto, na sequência de aminoácidos de

GCS de *T. brucei* há uma inserção de 60 aminoácidos na posição 242 que pode ser a responsável por exercer o papel regulatório da subunidade menor (LUEDER; PHILLIPS, 1996).

A GCS é um gene essencial em *L. infantum*, uma vez que todas as tentativas em gerar um mutante nulo falharam (MUKHERJEE et al., 2009). A geração desse mutante só foi possível com a adição de uma cópia episossomal do gene. A deleção de uma das cópias além de reduzir pela metade os níveis de GSH e T(SH)₂, também deixou linhagens de *L. infantum* mais sensíveis ao estresse oxidativo causado por H₂O₂ e ao tratamento com SbV (MUKHERJEE et al., 2009). Em *T. brucei*, esse gene também é essencial, visto que o silenciamento de GCS por RNAi, culminou na morte dos parasitos entre quatro a seis dias após a indução. O silenciamento também reduziu os níveis de GSH e T(SH)₂ nesses parasitos (HUYNH et al., 2003). O fato da inibição da expressão de GCS por nocaute e RNAi em *L. infantum* e *T. brucei*, respectivamente, terem culminado na redução dos tióis dos parasitos, demonstra que GCS é também uma das principais enzimas responsáveis tanto pelo controle do fluxo da via quanto dos níveis de T(SH)₂ intracelular nesses parasitos. Ainda nesses parasitos, a adição de GSH no meio foi capaz de preveni-los da morte e também de recuperar os níveis de T(SH)₂ (HUYNH et al., 2003, MUKHERJEE et al., 2009). A inibição de GCS de *L. donovani* com o inibidor butionina sulfoximina (BSO) mostrou uma redução de 50 % na infectividade desses parasitos em macrófagos (KAPOOR et al., 2000). O tratamento de *T. brucei* com BSO resultou na morte do parasito que não foi evitada pela adição de GSH, sugerindo que esse inibidor possui mais de um alvo intracelular nesses parasitos (HUYNH et al., 2003).

1.8.3 Tripanotiona Sintetase (TryS)

A Tripanotiona Sintetase é uma enzima citosólica responsável pela síntese da tripanotiona (N¹,N⁸-bis(glutationil)spermidina) e do intermediário glutationil-spermidina (MANTA et al., 2013). Essa enzima é única em tripanossomatídeos, não possuindo correspondente no genoma do hospedeiro mamífero (ILARI et al., 2017). O gene da TryS se localiza no cromossomo 27. A sequência codificadora desse gene para *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.27.2010*)

apresenta 1959 pb e 652 aminoácidos em sua sequência protéica predita, dando origem a uma proteína de aproximadamente 74 kDa (tritypdb.org). Em algumas espécies de tripanossomatídeos ainda há outra enzima, a Glutationilperimidina Sintetase (GspS), que é capaz de sintetizar o intermediário glutacionilperimidina, mas não tripanotiona. A enzima GspS possui similaridade de sequência de cerca 29 % com TryS (comparativo entre GspS e TryS de *L. infantum*) (SOUSA et al., 2014). Já comparações entre sequências de TryS de tripanossomatídeos demonstrou que a TryS de *L. major* possui uma proximidade com *Citidiala fasciculata* (89 % de similaridade e 77 % de identidade), *T. brucei* e *T. cruzi* (ambos com aproximadamente 72 % de similaridade e 57 % de identidade) (OZA et al., 2005). Já a TryS de *L. infantum* compartilha alta identidade com *L. donovani* (99,4 %), *L. major* (78,5 %), *C. fasciculata* (61,1 %) e *T. brucei* (58,9 %) (SOUSA et al., 2014).

A estrutura cristalográfica da TryS de *L. major* revelou dois domínios catalíticos: o domínio N-terminal que é um domínio amidase, similar a uma cisteína protease clássica, e o domínio C-terminal, que é um domínio sintetase com sítio para ligação de ATP (FYFE et al., 2008). A modelagem de substratos em cada um dos dois domínios catalíticos demonstrou que a TryS pode catalizar quatro reações diferentes, atuando, desta forma, como: glutacionilperimidina sintetase, glutacionilperimidina amidase, tripanotiona sintetase e tripanotiona amidase (FYFE et al., 2008).

A síntese de tripanotiona é realizada em duas etapas: primeiramente há a produção do intermediário glutacionilperimidina, que consiste em uma molécula de GSH ligada a uma Spem, e em seguida, a esse composto intermediário, é adicionado outra GSH e a formação da T(SH)₂ é concluída (MANTA et al., 2013). Como já descrito, a regulação da síntese e da concentração da tripanotiona, é realizada principalmente por GCS e TryS, nessa ordem de importância, que possuem coeficientes de controle de 0,58-0,7 e 0,49-0,58, respectivamente (OLIN-SANDOVAL et al., 2012). Essas duas enzimas ainda são responsáveis pela diminuição dos níveis de tripanotiona quando há inibição de TryS em 63 %, ou ainda, à inibição de 50 % da atividade GCS e de TryS simultaneamente (OLIN-SANDOVAL et al., 2012).

Além de sua importante função regulatória, TryS é também uma enzima essencial para a sobrevivência de *Leishmania* spp. Isso porque, a tentativa de gerar um parasito com duplo nocaute para TryS em *L. infantum* só foi possível com a complementação de uma cópia extracromossomal deste gene (SOUSA et al., 2014). Em contraste, a deleção dos dois alelos de GspS não gerou nenhum efeito negativo no crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* (SOUSA et al., 2014). A inibição de TryS por meio de RNA de interferência (RNAi) também demonstrou a essencialidade desse gene na viabilidade em *T. brucei* (COMINI et al., 2004).

Todas as características de TryS apresentadas, ou seja, estar presente unicamente em tripanossomatídeos; ser codificada por um único gene no genoma; ser essencial; ser expressa em baixa abundância e não possuir *by-pass* alternativo, tornam TryS um dos melhores alvos para o desenvolvimento de drogas da via de biossíntese da tripanotiona (ILARI et al., 2017). Nesse sentido, vários estudos tentam buscar inibidores para a TryS que sejam eficientes e funcionais nas TryS das várias espécies de tripanossomatídeos (TORRIE et al., 2009, BENITEZ et al., 2016).

1.8.4 Tripanotiona Redutase (TR)

A flavoenzima oxiredutase Tripanotiona Redutase (TR) atua de forma a retornar a tripanotiona que foi oxidada nos processos de detoxificação de ROS para a sua forma reduzida utilizando NADPH como fonte de elétrons (MANTA et al., 2013). Essa enzima não possui correspondente no genoma de mamíferos e o sistema Tripanotiona/TR presente em tripanossomatídeos é substituído por GSH/glutationa redutase (GR) no hospedeiro humano (ILARI et al., 2017). Em termos de sequência, TR de *T. congolense* compartilha 38 e 41 % de similaridade de sequência com GR de *E. coli* e humano, respectivamente (SHAMES et al., 1988). A similaridade da sequência obtida entre as TRs nos tripanossomatídeos é bem alta, estando entre 65 e 100 % (ILARI et al., 2017). Por exemplo, a sequência de TR de *L. donovani* compartilha similaridade de 76 % com *C. fasciculata*, 67 % com *T. cruzi*, *T. congolense* e *T. brucei* onde os resíduos que reconhecem NADPH e FAD, e os

resíduos do sítio catalítico (aminoácidos 47-67) envolvidos na transferência de elétrons de TR para tripanotona estavam completamente conservados (TAYLOR et al., 1994).

A TR de *L. braziliensis* (LbrM.05.0350) está localizada no cromossomo 5 em cópia única no genoma (tritrypdb.org). Nesta mesma espécie, o gene da TR possui 1.476 pb e proteína predita com 491 aminoácido e cerca de 53 kDa de massa molecular. TR é considerada uma enzima essencial em *L. donovani*, uma vez que a tentativa de deletar os dois alelos desse gene não foi possível porque uma terceira cópia de TR era gerada como resultado de rearranjos genéticos envolvendo a translocação de uma região gênica contendo a região codificante de TR para um outro cromossomo (DUMAS et al., 1997).

A estrutura de TR ativa é homodimérica (FAIRLAMB; CERAMI, 1992, BAIOTTO et al., 2009) e cada monômero é composto por três domínios, sendo eles, um domínio de ligação à FAD (resíduos 1-160 e 289-360), um domínio de ligação à NADPH (resíduos 161-289) e um domínio de interface (resíduos 361-488). O sítio de ligação à tripanotona é muito grande e coberto por resíduos não-polares em sua maioria (BAIOTTO et al., 2009).

A reação de redução da tripanotona oxidada se inicia após a ligação de NADPH, onde acontece a transferência dos elétrons à FAD e a redução dos resíduos da ponte dissulfuro formado entre as cisteínas 52 e 57 (Cys-52-Cys-57). A redução desses resíduos ocorre pela formação de uma transferência de carga transiente entre a flavina e o tiolato Cys-57. Em seguida, após a entrada da tripanotona oxidada no sítio ativo de TR, Cys-52 que está deprotonada pelo par His461'-Glu466', ataca nucleofilicamente a ponte dissulfeto na tripanotona oxidada, formando com ela um dissulfeto misto, que é resolvido pelo ataque de Cys-57 à Cys-52. Por fim, a ponte dissulfeto Cys-57-Cys52 é novamente formada e a tripanotona reduzida é liberada (ILARI et al., 2017).

O SbIII, forma ativa do antimônio contra *Leishmania*, descrito anteriormente, é capaz de inibir TR (CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 1995). A estrutura cristalizada de TR complexada com SbIII, demonstrou que a inibição de TR pelo SbIII ocorre porque SbIII se liga ao sítio catalítico interrompe a ligação que ocorre entre a His461', os resíduos Cys57-Cys52 e os átomos oxidados da tripanotona oxidada,

impedindo, desta forma a redução da tripanotona oxidada (BAIOCCO et al., 2009). Outros metais, tais como, prata (Ag(I)) e ouro (Au(I)) também são capazes de formar complexos com TR em um mecanismo similar ao descrito para o SbIII (BAIOCCO et al., 2011; ILARI et al., 2012).

Assim como a TryS, TR por ser uma enzima única em tripanossomatídeos, sem correspondente em humanos e por ter a função essencial e insubstituível, também torna essa enzima um bom alvo para o desenvolvimento de drogas contra as Leishmanioses. Vários inibidores de TR, pertencentes a diferentes classes e atuando de diferentes formas na inibição dessa enzima, já foram descritos. Porém, somente um pequeno número desses compostos descritos conseguem atingir a inibição em concentrações submicromolares e de forma constante (ILARI et al., 2017).

Todos os estudos realizados com as enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante de *Leishmania* spp. comprovam a importância dessas enzimas para a manutenção do equilíbrio Redox desses parasitos. Além disso, as enzimas foco desse estudo, ODC, GCS, TryS e TR foram associadas à resistência ao antimônio em várias linhagens de *Leishmania* spp., principalmente em espécies do Velho Mundo. Assim, o envolvimento dessas enzimas na resistência ao antimônio precisa ser melhor elucidado nas espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Outro ponto a ser elucidado é como a superexpressão de TryS e TR de *Leishmania* spp pode interferir e modular a expressão de enzimas da defesa antioxidante e enzimas da via de síntese de tripanotona.

2 Justificativa

Apesar do tratamento das Leishmanioses com o antimônio ser eficaz, ele é extremamente tóxico para os pacientes causando vários efeitos colaterais. Outro fator que é preocupante são os emergentes casos de resistência a esse fármaco. A resistência ao tratamento com o antimônio tem sido relacionada à modificação da expressão gênica, até mesmo amplificação e deleção dos genes de alguns transportadores de membrana e também de proteínas e moléculas do metabolismo antioxidante de *Leishmania* spp. Algumas dessas proteínas com expressão modificada são enzimas da via de síntese e da redução da tripanotona, que é a principal molécula da defesa antioxidante desses parasitos. Além do papel central no metabolismo do parasito, a tripanotona é alvo da ação do antimônio e é comumente encontrada em níveis aumentados nos parasitos resistentes a esse fármaco. Estudos em espécies de *Leishmania* resistentes ao antimônio mostraram que a Ornitina Decarboxilase (ODC), a Gama-glutamilcisteína Sintetase (GCS), Tripanotona Sintetase (TryS) e Tripanotona Redutase (TR), enzimas foco desse estudo, estão associadas ao fenótipo de resistência nesses parasitos. No entanto, a maioria dos estudos foi realizada com espécies de *Leishmania* do Velho Mundo e pouco se sabe a respeito da resistência nas espécies predominantes no Novo Mundo. Além da participação dessas enzimas na resistência ao antimônio, elas são metabolicamente importantes para a sobrevivência e virulência de *Leishmania* spp. nos hospedeiros vertebrados. Dessa forma, o estudo de ODC, GCS, TryS e TR em espécies do Novo Mundo pode elucidar a importância dessas enzimas nesses parasitos e assim, fornecendo dados que confirmem se realmente elas são bons alvos moleculares para a busca de novas drogas. O entendimento da participação nessas enzimas na resistência e suas relações de expressão e regulação pode também possibilitar a elaboração de estratégias para contornar a resistência ao antimônio, uma vez que esse medicamento continua a ser a droga de primeira escolha na maioria dos países onde a Leishmaniose está presente.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da superexpressão das enzimas Ornitina Decarboxilase (ODC), Gama-Glutamylcisteína Sintetase (GCS), Tripanotona Sintetase (TryS) e Tripanotona Redutase (TR) no fenótipo de resistência ao SbIII em *Leishmania* spp.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Verificar os níveis de expressão de ODC, GCS, TryS e TR nas linhagens de *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens e resistentes ao SbIII;
- II. Clonar a sequência codificante dos genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr* em vetor de expressão pIR1-BSD;
- III. Obter clones transfectados com os genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr*, separadamente, em *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- IV. Avaliar os níveis de expressão das enzimas ODC, GCS, TryS e TR nos parasitos selvagens e transfectados;
- V. Analisar a susceptibilidade dos parasitos selvagens e transfectados com os genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr* ao antimônio trivalente (SbIII);
- VI. Avaliar o efeito de DFMO e BSO, inibidores específicos de ODC e GCS, respectivamente, no crescimento das linhagens selvagens e transfectadas com *odc* e *gcs* de *L. guyanensis* e *L. infantum*;
- VII. Verificar o efeito da inibição farmacológica de ODC e GCS no fenótipo de resistência ao SbIII de linhagens de *L. guyanensis* selvagem e transfectada com *odc* e *gcs*;
- VIII. Analisar o perfil de expressão de enzimas da via de síntese e redução da tripanotona e da via antioxidante em amostras de *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens e superexpressoras de TryS e TR.

4 Métodos

4.1 Obtenção das linhagens de *Leishmania* spp. e cultivo dos parasitos

Foram utilizadas quatro espécies de *Leishmania* selvagens e resistentes ao antimônio trivalente: *L. (V.) guyanensis* (IUMB/BR/85/M9945), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2904), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. (L.) infantum* (sin. *L. chagasi*) (MHOM/BR/74/PP75) (Tabela 2). As linhagens resistentes foram previamente obtidas por seleção *in vitro* por pressão contínua e crescente de SbIII (LIARTE; MURTA, 2010). Os parasitos apresentaram índices de resistência de 4 a 20 vezes maior comparado aos seus respectivos pares sensíveis. Formas promastigotas dessas espécies de *Leishmania* foram cultivadas à 26 °C em meio M199 (Gibco) suplementado com 40 mM HEPES pH 7.4; 1 µg/mL biotina; 5 µg/mL hemina; 2 µg/mL biopterina; 2 mM L-glutamina; 500 U penicilina; 50 µg/mL estreptomicina e 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado. Todos os experimentos foram realizados com os parasitos em fase exponencial de crescimento. Para a contagem do número de parasitos, os mesmos foram diluídos em Isoton II Diluent (Beckman Coulter™) e a contagem realizada em contador de partículas Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). A manutenção da cultura foi realizada através de 2-3 repiques semanais com inóculos médios de 1×10^6 parasitos/mL.

Tabela 2 - Susceptibilidade das linhagens de *Leishmania* selvagens e resistentes ao SbIII obtidas por Liarte e Murta (2010).

Espécie	Cepa	IC ₅₀ +IC (µM) Linhagem Selvagem	IC ₅₀ +IC (µM) Linhagem Resistente	Índice de Resistência
<i>L. (V.) guyanensis</i>	UMB/BR/85/M9945	0,09 ± 0,04	1,64 ± 0,14	19
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/2904	0,15 ± 0,15	3,04 ± 0,13	20
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	0,28 ± 0,15	1,71 ± 0,11	6
<i>L. (L.) infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>)	MHOM/BR/74/PP75	0,33 ± 0,09	1,40 ± 0,04	4

4.2 Extração de DNA genômico

O DNA das formas promastigotas de *Leishmania* spp. foi extraído pelo método fenol:clorofórmio, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). As culturas de parasitos em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 728 xg por 10 min a 4 °C e lavadas em PBS [NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM]. Os sedimentos contendo aproximadamente 2 x 10⁷ parasitos foram ressuspensos em tampão de extração [10 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA, 150 mM NaCl e 0,5% SDS, pH 8,0] em um volume igual ao volume do sedimento. Em seguida, foram adicionados à amostra 20 µg/mL de RNase e elas foram incubadas por 2 h a 37 °C. Posteriormente, Proteinase K (0,1 mg/mL) foi adicionada nas amostras e elas foram incubadas por mais 1 h a 37 °C. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novo tubo contendo 1/2 volume de Fenol e 1/2 volume de clorofórmio-álcool Isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas. A fase aquosa foi transferida para novo tubo contendo acetato de sódio 3 M, pH 5,2 (1/10 do volume) e 2,5 vezes o volume de etanol a precipitação do DNA foi realizada a 4 °C por 1 h. Posteriormente, o DNA foi lavado com etanol 70 % e ressuspensado em água livre de DNase e RNase. A concentração de DNA foi determinada por leitura em espectrofotômetro Nanodrop (ND – 100 Spectrophotometer V 3.2). O DNA foi armazenado a 4 °C.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR)

A reação da Cadeia da Polimerase foi utilizada para a amplificação da região codificante completa dos genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr*, que correspondem aos fragmentos de 1911, 2067, 1959 e 1457 pb, respectivamente. Esses genes amplificados foram usados para a clonagem, em vetor comercial p-GEM T-easy e em vetor de expressão em *Leishmania* pIR1-BSD, e nos ensaios de transfecção em

Leishmania spp. As seqüências dos iniciadores utilizados neste estudo estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Iniciadores usados na clonagem, no sequenciamento e na seleção dos clones transfectados com o marcador molecular que confere resistência a blasticidina (BSD).

Gene	Iniciadores	Seqüência dos iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
Ornitina Decarboxilase <i>L. braziliensis</i> M2904	ODC.C - Fw ODC.C - Rv	5'- <u>TAGATCTCCACC</u> ATGATGAAGATGGTTACCGCC-3' 5'-TTAGATCTCTATAAGGCAATAGAGCTCACC-3'	1911
	ODC.P - FW ODC.P - FW	5'-CAGTCTGTCTGCGCCGATGGA-3' 5'-CGTTCAGCAGGAGAAGCGTC-3'	-
Gama-Glutamilcisteína Sintetase <i>L. braziliensis</i> M2904	GCS.C – Fw GCS.C – Rv	5'- <u>TGGATCCCACC</u> ATGGGTCTCTTGACAACCTGG -3' 5'- <u>ATGGATCCT</u> TATGCGCTGCTCTCCTGTTTCTCAGC -3'	2067
	GCS.P – Fw GCS.P – Rv	5'-GGTCAGCCACCCGTGTATCTA-3' 5'-GAGCTGGTCGTACACGTAGCG-3'	-
Tripanotona Sintetase <i>L. braziensis</i> M2904	TryS.C - Fw TryS.C - Rv	5'- <u>TAGATCTCCACC</u> ATGCCGTCTTTGGAACAC-3' 5'-TTAGATCTCCACCATGTCGTCTCTGCCGCG-3'	1959
	TryS.P - Fw TryS.P - Rv	5'-ATCATCGATGATATTAACGTGGACG-3' 5'-CCTCCCGGGCGGCATAATAG-3'	-
Tripanotona Sintetase <i>L. infantum</i> JPCM5	TryS.C - Fw TryS.C - Rv	5'- <u>TAGATCTCCACC</u> ATGTCGTCTCTGCCGCG-3' 5'-TTAGATCTCCACCATGTCGTCTCTGCCGCG-3'	1959
	TryS.P - Fw TryS.P - Rv	5'-TCGATGACATTGACGCGGACG-3' 5'-TTCCAGTTCTCGCCCCGCTC-3'	-
Tripanotona Redutase <i>L. braziensis</i> M2904	TR.C - Fw TR.C - Rv	5'- <u>TAGATCTCCACC</u> ATGCCCCGCGCGTACGACCT-3' 5'-TTAGATCTTCCAAATTACAGCTGAGTT-3'	1457
	TR.P - Fw TR.P - Rv	5'-ATCTCGAGGTGCGCAAGAGCCTG-3' 5'-TCGCTCCAGCTGTTTCAT-3'	-
Resistência à Blasticidina	BSD – Fw BSD – Rv	3'-ATGGCCAAGCCTTTGTCTCA-3' 5'-TTAGCCCTCCCACACATAACCAGAG-3'	399

Fw – Iniciador “forward” senso 5’.

Rv – Iniciador “reverse” antisenso 3’ (reverso e complementar).

Gene.C – Seqüência Completa do gene (usado na clonagem, sequenciamento e seleção de clones).

Gene.P – Seqüência Parcial (usado para o sequenciamento).

Seqüência sublinhada: AGATCT: sítio de restrição de *Bg*II; GGATCC: sítio de restrição de *Bam*HI.

Seqüência negrito: CCACC: seqüência de Kozak.

Os iniciadores (Tabela 3) foram obtidos a partir da sequência nucleotídica completa dos genes *odc* (*LbrM.12.0300*), *gcs* (*LbrM.18.1700*), *trys* (*LbrM.27.2010*) e *tr* (*LbrM.05.0350*) de *L. braziliensis* M2904 e sequência de *trys* (*LinJ.27.1770*) de *L. infantum* JPCM5, obtidas de banco de dados (tritypdb.org). Às sequências dos iniciadores dos genes completo (sequência codificante) foi adicionado, em suas extremidades 5', sequências correspondentes à enzima de restrição (indicadas por sublinhado) *Bam*HI (GGATCC) para iniciadores do gene *gcs* e *Bg*III (AGATCT) para os iniciadores dos genes *odc*, *trys* e *tr*. Essas enzimas de restrição foram utilizadas nos processos de clonagem e subclonagem (itens 4.6 e 4.8). À sequência dos iniciadores da região senso (*Fw*) que foram utilizadas para amplificar o gene completo de *odc*, *gcs*, *trys* e *tr*, foi adicionada a sequência de Kozak (CCACC), importante para o início do processo de tradução nos parasitos transfectados (KOZAK, 1990). As reações de PCR foram realizadas utilizando o *Kit PCR Supermix High Fidelity* (INVITROGEN) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, a 9 µL do tampão de reação [22 U/ml DNA polimerase misturados em 66 mM Tris-SO₄ (pH 9,1 a 25 °C), 19,8 mM (NH₄)₂SO₄, 2,2 mM MgSO₄, 220 µM dNTP] foi adicionado 1 µL (10 pmoles) de cada um dos iniciadores e de 10-100 ng de DNA genômico de *Leishmania* spp., extraído conforme descrito no item 4.2.

As reações foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems). O programa de amplificação foi realizado conforme orientações descritas pelo fabricante, com exceção da etapa de anelamento que foi ajustada para cada conjunto de iniciador utilizado. Para a amplificação da sequência codificante completa do gene *odc*, o programa utilizado foi: desnaturação a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de amplificação correspondendo: desnaturação 94 °C por 60 seg; anelamento 55 °C por 30 seg e extensão 72 °C por 130 seg, e, após os ciclos, o passo final de extensão final de 72 °C por 5 min. Para a amplificação da sequência codificante completa do gene *gcs*, o programa utilizado foi: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min; 30 ciclos de amplificação compreendendo: desnaturação 94 °C por 30 seg, anelamento 60 °C por 2 min e extensão à 72 °C por 120 seg e, após os ciclos, a extensão final a 72 °C por 5 min. Para a amplificação da sequência codificante completa do gene *trys*, o programa utilizado foi: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94 °C por 30 seg, anelamento 61°C

por 30 seg e extensão a 72 °C por 120 seg) e extensão final a 72 °C por 5 min. Para a amplificação da sequência codificante completa do gene *tr*, o programa utilizado foi: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94 °C por 30 seg, anelamento 61 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 90 seg) e extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados na PCR foram armazenados a 4 °C até o uso.

4.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para a análise do resultado da PCR, o DNA foi separado por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). Inicialmente a agarose foi fundida em tampão de corrida TBE 1 X [9 mM de Tris, 2 mM de EDTA, 9 mM de ácido bórico] por aquecimento em forno de microondas e a solução resfriada foi colocada ao suporte de eletroforese horizontal até sua polimerização. Para a eletroforese, foi adicionado nas amostras tampão de amostra 1 X contendo o intercalante de DNA GelRed® como fluoróforo. O padrão de tamanho molecular de 1 kb *DNA Ladder PLUS* (INVITROGEN) foi aplicado em cada corrida à concentração de 0,5 µg por canaleta. A visualização das bandas por fluorescência foi analisada no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

4.5 Purificação do produto de PCR do gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR (item 4.3) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (item 4.4) e purificados usando o *Kit QIAquick Gel Extraction*, de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). Resumidamente, o fragmento de gel contendo o produto de PCR foi excisado do gel, colocado em um tubo e então dissolvido em tampão QG aquecendo por 10 min a 50 °C. A mistura contendo agarose e o produto de PCR foi então passada em coluna de sílica por centrifugação à 12.000 x *g* por 10 min. O produto de PCR aderido à coluna foi então lavado com tampão PE, que contém 80 % de volume de etanol, e em seguida, a

coluna foi centrifugada à $12.000 \times g$ por 1 min. Ao final, o DNA foi eluído em água livre de DNase e RNase. A concentração de DNA total foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop (ND – 1000 spectrophotometer V 3.2).

4.6 Preparação de Células Cálcio-Competentes

As bactérias *Escherichia coli* da linhagem TOP 10F' foram preparadas para a transformação por choque térmico. Primeiramente, foi preparado um pré-inóculo, no qual 50 μL das bactérias foram colocados em 5 mL de meio líquido Lúria-Bertani (LB) por 12h – 16 h a 37 °C, sob agitação a 200 RPM. Posteriormente, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para 100 mL de LB e submetido à agitação constante a 200 RPM, até atingir a densidade óptica (OD) entre 0,4 e 0,6 na absorbância de 600 nm, que acontece em aproximadamente 2 h de incubação. Atingido este crescimento, as bactérias foram incubadas no gelo por 10 min e, posteriormente, centrifugadas a $4.170 \times g$ a 4 °C por 10 min. O sedimento foi ressuscitado em 50 mL de solução de cloreto de cálcio (100 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7,0) para lavagem e, em seguida, centrifugado a $4.170 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado e lavado novamente com a solução de cloreto de cálcio, seguido de centrifugação por 15 min. O sedimento foi novamente ressuscitado em 1 mL solução de cloreto de cálcio contendo glicerol 10 %. As células foram aliqüotadas (60 μL /tubo) e armazenadas a -70 °C até o uso.

4.7 Clonagem em Vektor pGEM®-T Easy

Os genes purificados conforme descrito no item 4.5 foram inicialmente submetidos à reação de “TA-tailing”. Essa reação consiste em adicionar adeninas nas extremidades 5' do gene previamente amplificado. Para 10 μL de reação, foi adicionado 1 μL do tampão 10 X [200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl], 15 mM MgCl_2 , 2 mM de dATP, 6 μL do produto de PCR e 1 μL (5 U/ μl) de TaqPolymerase (INVITROGEN). A reação foi realizada a 70 °C por 30 min. Após essa reação os

genes foram ligados em plasmídeo de clonagem pGEM®-T Easy de acordo com o protocolo do fabricante (PROMEGA). Resumidamente, em um tubo foram adicionado 5 µL do tampão 2 x, 3 µL do produto de PCR purificado, 1 µL da enzima T4 DNA ligase e 1 µL do vetor de clonagem pGEM®-T Easy (50 ng) e a reação de ligação permaneceu em temperatura ambiente por 1 h.

O plasmídeo já ligado à sequência alvo foi utilizado para transformação em bactérias cálcio-competentes (item 4.6) por choque térmico. Para isso, uma alíquota de 8 µL da reação de ligação do gene ao vetor pGEM®-T Easy foi incubada com as células competentes por 30 min em gelo. Posteriormente, a amostra foi aquecida a 42 °C por 45 seg para o choque térmico. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 2 min, e então transferidos para 1 mL de meio LB sob agitação (200 RPM) por 1 h a 37 °C. Após esse tempo, as bactérias transformadas foram centrifugadas à 12.000 x g por 30 seg, e o sedimento ressuscitado em 100 µL de LB e plaqueado em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de Ampicilina (AMP), 4 µL de IPTG (Isopropylthio-B-D-Galactoside, 1 mM) e 40 µL de X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-B-Galactosídeo, 50 mg/mL). Após incubação a 37 °C por 14 h, as colônias brancas foram selecionadas e submetidas à PCR para confirmar a presença do gene de interesse, conforme descrito no item 4.3. As colônias positivas foram crescidas em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) durante 14 h e os plasmídeos foram purificados usando o *Kit Miniprep* (QIAGEN) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, ao sedimento de bactérias foi adicionado o tampão de ressuspensão e, em seguida, adicionado o tampão de lise. Após a homogeneização foi adicionado à amostra o tampão de neutralização. Em seguida, a amostra foi centrifugada à 17,900 x g por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi passado em coluna de sílica e novamente centrifugado nas condições previamente descritas. A coluna contendo os plasmídeos acoplados foi lavada e o DNA plasmidial foi eluído em água livre de DNase e RNase. O plasmídeo purificado foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (ND – 1000 spectrophotometer V 3.2). O plasmídeo foi então submetido à digestão com enzimas de restrição para a confirmação da clonagem. A enzima *Bam*HI (New England BioLabs) foi usada para verificar a correta clonagem com o gene *gcs* no plasmídeo e a enzima de restrição *Bgl*II (New England BioLabs) utilizada para verificar a

clonagem com os genes *odc*, *trys* e *tr*. As colônias positivas foram crescidas e criopreservadas em glicerol 25 % e armazenadas em freezer -70 °C.

4.8 Sequenciamento

O sequenciamento dos plasmídeos clonados com a sequência dos genes utilizados nesse estudo (genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr*) foi realizado com o objetivo de verificar a correta sequência nucleotídica do gene. Quatro clones de cada gene foram sequenciados usando os iniciadores indicados na Tabela 3 e também os iniciadores universais senso e antisenso M13 (reconhecem o plasmídeo pGEMT-easy). Os plasmídeos purificados das colônias selecionadas foram submetidos à reação de sequenciamento realizada pela Plataforma de Sequenciamento do René Rachou, pertencente à Rede de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas René Rachou (PDTIS - CPqRR). O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger (1975) utilizando o plasmídeo contendo o gene *gcs* em equipamento ABI 3730 DNA Analyzer seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, na reação de sequenciamento foi adicionado entre 25 a 50 ng do plasmídeo clonado com um dos genes desse estudo, o tampão de reação do kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, 3,2, 5 pmol do iniciador, *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard* (Applied Biosystems) e água livre de DNase e RNase nos volumes indicados pelo fabricante. O programa utilizado foi temperatura inicial de 96 °C por 1 min, alternando 35 ciclos de desnaturação à 96 °C por 15 seg, anelamento em temperaturas crescentes a partir de 50 °C aumentando 1 °C por seg, seguido por passo de extensão a 60 °C por 4 min. Para a análise dos sequenciamentos foram usados “softwares” livres ou ferramentas “online” de acesso gratuito: *FlinchTV 1.4.0* (Geospiza) para visualização dos picos, e exportação das sequências em formato FASTA, a ferramenta online BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para busca rápida da sequência correlata, BioEdit para geração da sequência consenso, o ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) para obter a sequência de aminoácidos das colônias sequenciadas a partir da sequência nucleotídica consenso obtida e, por fim, o

MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) para o alinhamento múltiplo das sequências consenso contra as sequências referências depositadas no banco de dados (tritypdb.org). Foram utilizadas como sequência referência sequências de *odc* de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.12.0300*) e *L. panamensis* L13 (*LPAL13_120007700*), e para análise de *gcs* sequências referência também de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.18.1700*) e *L. panamensis* L13 (*LPAL13_180019700*) foram utilizadas. As sequências referências para analisar o sequenciamento de *trys* foram as sequências de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.27.2010*) e *L. infantum* JPCM5 (*LinJ.27.1770*) e, para a análise do sequenciamento de *tr*, a sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.05.0350*) foi utilizada.

4.9 Subclonagem dos genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr* em Vetor de Expressão pIR1-BSD

O vetor de transfecção pIR1-BSD foi gentilmente cedido pelo Dr. Stephen Beverley (Washington University – EUA). Esse vetor de transfecção contém o gene responsável por conferir resistência à Blasticidina (BSD), que é a droga utilizada para a seleção de parasitos transfectados. Os detalhes das sequências contidas no vetor estão apresentadas na Figura 9, que está, como exemplo, ligada à sequência de *gcs* para demonstrar o local de ligação do inserto.

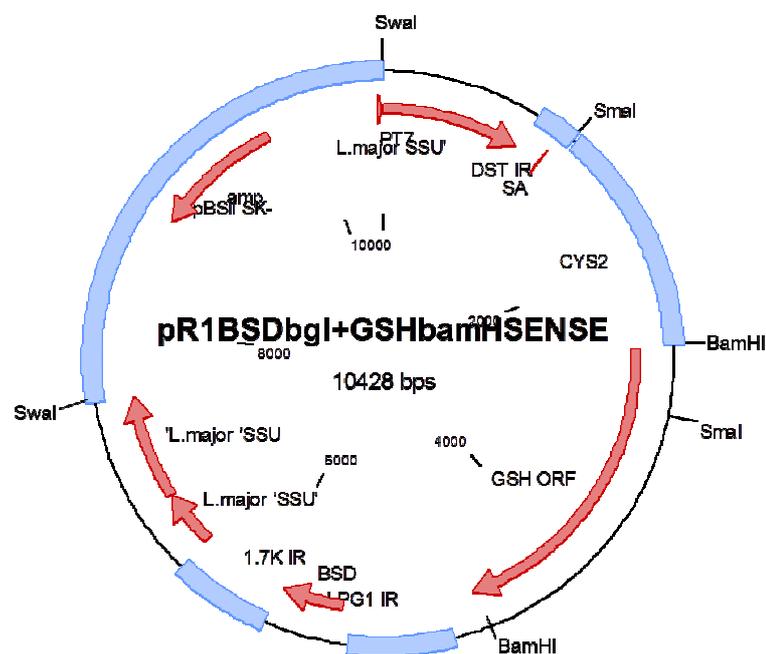


Figura 7 – Plasmídeo pR1-BSD contendo a região codificante do gene gama-glutamilcisteína sintetase na posição senso (10.428 pb). As regiões em azul indicam a pBSII SK (região do plasmídeo BlueScript II SK) com a região codificante do gene da β -Lactamase (AMP) e as regiões intergênicas: LPG1 (região intergênica do gene Lipofosfoglicano-1 (LPG1) de *L. major*), CYS2 (região intergênica do gene Cisteína Protease-2 (CYS2) de *L. mexicana*), 1.7K (região intergênica do minicírculo de 1.7 Kb de *L. major*). Indicado com as setas vermelhas estão os genes da *gcs* (GSH ORF), o gene da blasticina-S desaminase (BSD), o gene da β -Lactamase (AMP) e as regiões codificantes da subunidade pequena do RNA ribossomal (*L. major* SSU) de *L. major* correspondente ao local de integração do plasmídeo no genoma de *Leishmania* spp.

Para subclonagem do gene da *gcs* no vetor de expressão pR1-BSD, o plasmídeo contendo a sequência correta verificada pelo sequenciamento foi digerido com *Bam*HI (New England BioLabs) e para os demais genes, *odc*, *trys* e *tr*, a digestão foi realizada com *Bgl*II (New England BioLabs). Os fragmentos de 1911, 2067, 1959 e 1457 pb correspondente aos genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr*, respectivamente, foram separados em gel de agarose 1 % (item 4.4) e purificados conforme descrito no item 4.5. O vetor de transfecção também foi digerido com *Bam*HI para ser ligado ao gene *gcs* e, digerido com *Bgl*II, quando ligado aos genes *odc* ou *trys* ou *tr*. Em seguida, os plasmídeos digeridos com *Bam*HI ou *Bgl*II foram defosforilados utilizando a enzima *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal* – CIAP (PROMEGA), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os vetores foram então precipitados com adição de 3 volumes de etanol e 1:10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (v/v). O processo de precipitação foi realizado mantendo-se as

amostras por 30 min a -20 °C, sendo posteriormente centrifugadas à 15.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo os plasmídeos defosforilados foram então lavados duas vezes com etanol 70 % e centrifugados nas condições descritas anteriormente. Após a última lavagem, os plasmídeos defosforilados foram ressuspensos em água livre de DNase e RNase e dosado em espectrofotômetro *Nanodrop* (ND – 1000 spectrophotometer V 3.2). Posteriormente, os plasmídeos defosforilados foram submetidos à reação de ligação usando o *Kit Rapid DNA Ligation* (Roche), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados em reação de transformação em bactérias cálcio competentes por choque térmico, conforme descrito no item 4.7. As colônias selecionadas tiveram a subclonagem confirmada por PCR, usando iniciadores específicos para o gene *odc*, *gcs*, *trys* e *tr* (item 4.3) (Tabela 3) e digestão com *Bam*HI (gene *gcs*) ou *Bgl*II (genes *odc*, *trys* e *tr*). As colônias positivas foram crescidas em meio LB e os plasmídeos purificados usando o *Kit Miniprep* (QIAGEN) conforme descrito no item 4.7.

Para determinar a correta orientação do inserto (senso ou antisenso), o plasmídeo pIR1-BSD contendo a sequência codificante dos genes *odc* ou *tr* (pIR1-*Lg*ODC e pIR1-*Lb*TR) foram digeridos com *Sal*I (New England BioLabs) a 37 °C *overnight*. O plasmídeo pIR1-BSD contendo a sequência codificante dos genes *gcs* ou *trys* (pIR1-*Lg*GCS e pIR1-*Li*TRYS) foram digeridos com *Sma*I (New England BioLabs) a 25 °C *overnight*. Os fragmentos da digestão foram separados em gel de agarose 1 % conforme descrito no item 4.4. Para cada reação de digestão foram adicionados 100 – 200 ng de plasmídeo recombinante, 10 U da enzima *Sma*I (*gcs* e *trys*) ou *Sal*I (*odc* e *tr*), tampão CutSmart® (para *Sal*I) ou 1X NEBuffer 3.1 (para *Sma*I) (New England BioLabs), diluídos a 1 X, 0,2 µL de BSA (10 mg/mL) e água livre de DNase e RNase. Após a confirmação da correta orientação da inserção do inserto (senso), as construções obtidas com todos os genes (pIR1-*Lg*ODC, pIR1-*Lg*GCS, pIR1-*Li*TRYS e pIR1-*Lb*TR) e o pIR1-BSD (sem inserto) foram digeridos com *Swa*I (New England BioLabs) à 37 °C *overnight*. Após a digestão, os plasmídeos linearizados foram precipitados em etanol e acetato de sódio 3 M, pH 5,2 conforme descrito anteriormente, lavados e quantificados em espectrofotômetro

Nanodrop (ND – 1000 spectrophotometer V 3.2) e armazenados em freezer -20 °C para serem posteriormente usado nos ensaios de transfecção.

4.10 Transfecção Estável em Formas Promastigotas de *Leishmania* spp.

Os ensaios de transfecção foram realizados segundo o protocolo descrito por Robinson e Beverley (2003), que utiliza o método de eletroporação de alta voltagem. Formas promastigotas de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, foram crescidas conforme descrito no item 4.1 e transfectadas, independentemente, com as construções com os genes de interesse (pIR1-LgODC, pIR1-LgGCS, pIR1-LiTRY5 e pIR1-LbTR) e, o vetor sem inserto (pIR1-BSD), sendo este último usado como controle da transfecção e do vetor (MOCK). Aproximadamente 2×10^8 parasitos foram centrifugados à 2.000 x g por 10 min a 4 °C e o sedimento lavado duas vezes e ressuspendido com tampão Citomix [120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄; 25 mM de HEPES; 2 mM EDTA e 5 mM MgCl₂; pH 7,6]. A suspensão contendo os parasitos foi submetida à eletroporação com 10 µg do plasmídeo recombinante linearizado (item 4.9). Os parasitos foram eletroporados com 2 pulsos de 1500 V e 25 µF, com intervalo de 10 seg entre eles utilizando equipamento GenePulser XCell (BioRad). Em seguida, os parasitos foram incubados por 24 h com 10 mL de meio M199 (Gibco) (item 4.1). Após o crescimento e reestabelecimento da cultura, os parasitos transfectados foram centrifugados à 2.200 x g por 10 min à temperatura ambiente e ressuspendido em 1 mL de meio M199. A cultura (200 µL) foi plaqueada em meio M199 (Gibco) ágar semi-sólido contendo a droga de seleção blastocidina (BSD) à 10 µg/mL, e incubados a 26 °C por 15 – 20 dias. Após o crescimento, colônias individuais foram transferidas para 1 mL de meio M199 (Gibco) sem BSD em placa de 24 poços. Após 3 – 7 dias de crescimento, 1 mL de cada colônia crescida foi transferida para garrafas de cultura (25 cm²) contendo 10 mL de meio M199 (Gibco) acrescido da droga de seleção BSD (10 µg/mL).

Para confirmar a presença da construção nos parasitos transfectados, os clones selecionados foram crescidos e submetidos à extração do DNA genômico

pelo método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico conforme descrito no item 4.2. O DNA extraído dos parasitos transfectados foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop* (ND – 1000 spectrophotometer V 3.2) e submetido à reação de PCR (item 4.3) com iniciadores específicos para o gene confere resistência à BSD (Tabela 3), com o intuito de confirmar a presença desse marcador de resistência, e conseqüentemente, a presença do plasmídeo nos parasitos transfectados. Após a confirmação, os parasitos transfectados foram criopreservados em solução de congelamento [70 % meio M199 (Gibco), 20 % SFB, 10 % DMSO] e armazenados a -70 °C.

4.11 Eletroforese de DNA em Gel de Poliacrilamida

Para análise do resultado da PCR do BSD (item 4.10), uma alíquota do produto de reação foi homogeneizada em tampão de amostra 1 x [Azul de Bromofenol 0,25 %, Xilenocianol 0,25 %, Glicerol 30 %] e em seguida submetida à análise em gel de poliacrilamida à 6 %. O gel é constituído por uma solução base [20 % de bis-acrilamida, 20 % de TBE 5 X, 60 % de água destilada] na qual é adicionado para a polimerização do gel 12,5 µL de persulfato de amônio (APS) 10 % e 1,25 µL de TEMED (N, N, N', N' – tetrametil – etilenodiamina). Após a eletroforese (Bio-Rad) em voltagem fixa de 100 V, o gel foi incubado por 10 min em solução de fixação [10 % etanol, 0,5 % de ácido acético glacial]. Em seguida, o gel foi incubado em solução de nitrato de prata 0,2 % por 10 min e lavado duas vezes em água por 2 min. Após as lavagens, o gel foi incubado em solução de revelação [0,75 M de NaOH, 0,1 M de formaldeído] até a revelação das bandas. Após o aparecimento das bandas, o gel foi novamente incubado em solução de fixação para parar a reação de revelação. A imagem do gel foi capturada em equipamento *ImageQuant* LAS 4000 (GE Healthcare).

4.12 Extração de Proteínas Totais

O sedimento contendo as formas promastigotas das diferentes amostras de *Leishmania* spp. foram submetidas à extração de proteínas conforme protocolo descrito por Steindel (1993). A cada 3×10^8 parasitos foram adicionados 200 μ L de Tampão de Lise pH 8,0 [50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 % detergente NONIDET P-40] contendo inibidores de proteases (Roche). As amostras foram incubadas em gelo durante 10 min e as proteínas solúveis totais foram extraídas submetendo os parasitos à lise por choque térmico (3 ciclos de congelamento – usando nitrogênio líquido (N_2) (-196°C) – e descongelamento – à 37 °C). Em seguida, os parasitos lisados foram centrifugados à 12.000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante contendo as proteínas solúveis totais foi transferido para um novo tubo. As proteínas totais foram dosadas pelo método descrito por Bradford (1976), aliqüotadas e armazenadas a -70 °C para posterior uso.

4.13 *Western Blot*

A expressão das enzimas ODC, GCS, TRYS e TR nas linhagens susceptíveis e resistentes ao SbIII (LIARTE; MURTA, 2010) das espécies *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, assim como as linhagens *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* transfectadas com o vetor vazio pIR1-BSD e as construções com os genes pIR1-LgODC, pIR1-LgGCS, pIR1-LiTRYs e pIR1-LbTR foram analisadas por *Western Blot*. Os anticorpos utilizados nesse estudo estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 – Relação dos anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blot*.

Gene alvo	Massa Molecular do gene	Antígeno de	Produtor	Uso	Condições de incubação	Origem
ODC	70 kDa	<i>L. donovani</i>	Coelho	1:500	4 °C, overnight	Cedido Dr. Buddy Ullman (Oregon Health & Science University, USA)
GCS	78 kDa	<i>L. guynensis</i>	Coelho	1:200	T.A., 2 horas	Produzido em nosso laboratório
AdoMetS	43 kDa	<i>L. braziliensis</i>	Coelho	1:500	T.A., 2 horas	
SOD-A	26 kDa	<i>T. cruzi</i>	Coelho	1:500	4 °C, overnight	
TryS	74 kDa	<i>L. infantum</i>	Mouse	1:1000	4 °C, overnight	Cedido pelo Dr. Marcelo Comini (Institut Pasteur de Montevideo - Uruguay)
TR	53 kDa	<i>T. cruzi</i>	Coelho	1:1000	4 °C, overnight	
TXNPx	20 kDa	<i>T. brucei</i>	Coelho	1:2000	4 °C, overnight	
TXN	16 kDa	<i>T. brucei</i>	Coelho	1:2000	4 °C, overnight	

ODC – Ornitina Decarboxilase; GCS – Gama-Glutamilmisteína Sintetase; AdoMetS – S-Adenosilmetionina Sintetase; SOD-A – Ferro Superóxido Dismutase – A; TryS – Tripanotona Sintetase; TR – Tripanotona Sintetase; TXNPx – Triparedoxina Peroxidase; TXN – Triparedoxina Peroxidase.

O perfil das proteínas totais extraídas (item 4.12) foi obtido por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12 % (Laemmli, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Trans-blot*[®] Bio-Rad) à 100 V fixo por 2 h, em tampão de transferência [25 mM Tris; 192 mM glicina; metanol 20 %] a 4 °C utilizando o sistema de transferência BIORAD. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS-T [100 mM Tris-HCl; 1,5 M de NaCl pH 7,5 e 0,05 % Tween 20] acrescido de leite em pó desnatado 5 % por 1 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas por TBS-T por 10 min. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpos primários (Tabela 4) nas condições e proporções apropriadas para cada anticorpo, sempre sob agitação. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 min (3 lavagens de 10 min) e incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG (1:10.000) (GE Healthcare) de coelho ou mouse conjugados com peroxidase. Os anticorpos secundários foram diluídos em TBS-T acrescido com leite em pó desnatado a 3 %. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 35 min (3 lavagens de 5 min e 2 lavagens de 10 min) e a revelação foi realizada pelo método quimioluminescente utilizando o Kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham), de acordo com o protocolo do

fabricante. Para detecção da quimioluminescência e armazenamento das imagens foi utilizado o equipamento *ImageQuant* LAS 4000 (GE Healthcare). A normalização, quando realizada, utilizou-se o anticorpo primário monoclonal anti- α -tubulina de camundongo (1:5.000) (Sigma[®]) e o anticorpo secundário conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:10.000) (GE Healthcare). Na ausência da normalização por α -tubulina, o gel de poliacrilamida usado na transferência foi corado com Azul de Coomassie R-250 para controle da quantidade de proteína adicionada.

4.14 Análise Densitométrica

A análise densitométrica das bandas visualizadas nos ensaios de *Western Blot* e capturadas pelo aparelho *ImageQuant* LAS 4000 (GE Healthcare) foi realizada pelo programa CP Atlas. Cada membrana foi analisada duas vezes e a média das densitometrias utilizada para realizar os cálculos das razões.

4.15 Efeito dos inibidores DFMO e BSO no crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Para verificar o efeito dos inibidores específicos DFMO e BSO inibidores das enzimas ODC e GCS, respectivamente, no crescimento dos parasitos, formas promastigotas de *L. guyanensis* e *L. infantum* selvagens e transfectados com os genes *odc* e *gcs* foram incubados com diversas concentrações desses inibidores e, posteriormente à incubação, o crescimento da cultura foi avaliado. Para isso, 2×10^6 parasitos/mL na forma promastigota foram semeados em placa de 24 poços contendo concentrações variadas dos inibidores, sempre em triplicata. As placas foram mantidas à 26 °C por 48 h e o IC₅₀ foi determinado contando o número de parasitos crescidos na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações dos inibidores DFMO (5 a 100 μ M) e BSO (1,25 a 20 mM). Para a

contagem do número de parasitos, os mesmos foram diluídos em *Isoton II Diluent* (Beckman Coulter™) e a contagem realizada em contador de partículas Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). Foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata, para cada inibidor nos ensaios com *L. guyanensis*. Para *L. infantum* foi realizado apenas um experimento em triplicata para ambos inibidores. O IC₅₀ (concentração que inibe 50 % do crescimento dos parasitos) foi determinado utilizando a equação de interpolação linear (HUBER; KOELLA, 1993).

4.16 Teste de Susceptibilidade dos Parasitos ao SbIII

As linhagens de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* não transfectadas e transfectadas com o vetor sem inserto ou com as regiões codificantes dos genes *odc*, *gcs*, *trys* e *tr*, foram submetidos à análise de susceptibilidade ao SbIII. Resumidamente, 2×10^6 parasitos/mL na formas promastigota foram semeados em placa de 24 poços, e então incubados com concentrações crescentes de SbIII (1,17 e 1497,3 μ M) por 48 h a 26 °C. O IC₅₀ foi determinado contando o número de parasitos crescidos na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de SbIII. Para a contagem do número de parasitos, 20 μ L de cultura foram diluídos em 10 mL de solução *Isoton II Diluent* (Beckman Coulter™) e a contagem realizada em contador de partículas Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). O cálculo do IC₅₀ foi realizado utilizando a equação de Dose-Resposta (inibição) fornecida pelo programa GraphPad Prism 6. Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes, em triplicata, para cada espécie e gene analisado.

4.17 Efeito dos inibidores DFMO e BSO no fenótipo de resistência e sensibilidade ao SbIII

Com o intuito de avaliar o efeito dos inibidores DFMO e BSO no fenótipo de resistência ao SbIII, formas promastigotas (2×10^6 parasitos/mL) de parasitos

selvagens e transfectados com os genes *odc* e *gcs* de *L. guyanensis* foram incubados ou não com esses inibidores, na concentração do IC₅₀ obtida para a linhagem selvagem: 50 µM de DFMO ou 10 mM de BSO a 26 °C por 24 h. Posteriormente foram adicionadas concentrações crescente de SbIII (4,7 e 74,9 µM) e os parasitos foram deixados por mais 24 h a 26 °C. Posteriormente, o crescimento dos parasitos nas condições supracitadas foi avaliado pela contagem do número de parasitos. Para isso, os mesmos foram diluídos em *Isoton II Diluent* (Beckman Coulter™) e a contagem realizada em contador de partículas Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). Foram realizados no mínimo três experimentos independentes, em triplicata, para cada espécie e gene analisado.

4.18 Ensaio de Susceptibilidade Com Doses Subletais de BSO e SbIII em *L. guyanensis* selvagem e superexpressora de GCS

Para verificar o efeito aditivo de doses não letais de BSO (5 mM para linhagem selvagem e transfectada com GCS e 15 mM apenas para a linhagem transfectada com GCS) e SbIII (9,3 µM) foram utilizadas nos ensaios de competição. Para isso, 2×10^6 parasitos/mL de formas promastigotas de *L. guyanensis* (selvagem e superexpressora de GCS) foram semeados em placa de 24 poços, e então incubados com BSO (5 mM ou 15 mM) ou SbIII (9,3 µM) ou combinações de BSO e SbIII. Os parasitos foram deixados por 48 h a 26 °C e o IC₅₀ foi determinado pela contagem do número de parasitos. Para isso, 20 µL de cultura foram diluídos em 10 mL de solução *Isoton II Diluent* (Beckman Coulter™) e a contagem realizada em contador de partículas Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). As porcentagens relativas do crescimento foram obtidas e comparadas entre si por meio do teste *t* de student utilizando o programa GraphPad Prism 6.

4.19 Análises Estatísticas

Os experimentos foram analisados pelo programa GraphPad Prisma 6. Inicialmente foi determinada se as amostras seguiam distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram analisados pelo teste de ANOVA *one-way* e pós teste de Dunnett. O teste *t* de student também foi utilizado para comparar os IC₅₀ obtidos. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O IC₅₀ do SbIII foi calculado utilizando a equação de Dose-Resposta (inibição) do GrapPad Prism 6 e, no caso dos ensaios com inibidores DFMO e BSO, o IC₅₀ foi calculado por interpolação de linear de dados (HUBER; KOELLA, 1993).

5 Resultados

5.1 Análise da Expressão das Enzimas das Vias de Síntese e Redução da Tripanotiona em Populações de *Leishmania* spp. Sensíveis e Resistentes ao SbIII

Verificamos o nível de expressão das enzimas Ornitina Decarboxilase (ODC), Gama-glutamilcisteína Sintetase (GCS), Tripanotiona Sintetase (TryS) e Tripanotiona Redutase (TR) em linhagens de *Leishmania guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR) previamente obtidas por seleção *in vitro* contínua e com concentrações crescente de SbIII (LIARTE; MURTA, 2010).

O anticorpo policlonal anti-*Ld*ODC reconheceu um polipeptídeo de 70 kDa de tamanho esperado nas linhagens resistentes ao SbIII de *L. guyanensis* (*LgSbR*) e *L. amazonensis* (*LaSbR*) (Figura 10). Entretanto esse anticorpo não reconheceu a proteína de tamanho correspondente nos pares dessas linhagens selvagens (*LgWT* e *LaWT*) impedindo uma análise densitométrica comparativa (Figura 10). Em *L. braziliensis*, tanto para a linhagem selvagem (*LbWT*) quanto para a linhagem resistente (*LbSbR*), nenhum polipeptídeo de tamanho esperado foi reconhecido por esse anticorpo nas condições estabelecidas para este experimento. O gel de proteína total corado com Azul de Coomassie demonstra que o conteúdo protéico dessas linhagens está íntegro (Figura 10). O anticorpo anti-*Ld*ODC reconheceu um polipeptídeo de 70 kDa de tamanho esperado nas linhagens de *L. infantum* selvagem (*L_IWT*) e resistente (*L_ISbR*) ao SbIII. A comparação dos níveis de expressão usando o gel corado com Azul de Coomassie como normalizador, demonstrou que a expressão de ODC em *L_ISbR* está cerca de 1,6 vezes diminuída quando comparada com *L_IWT* (Figura 10).

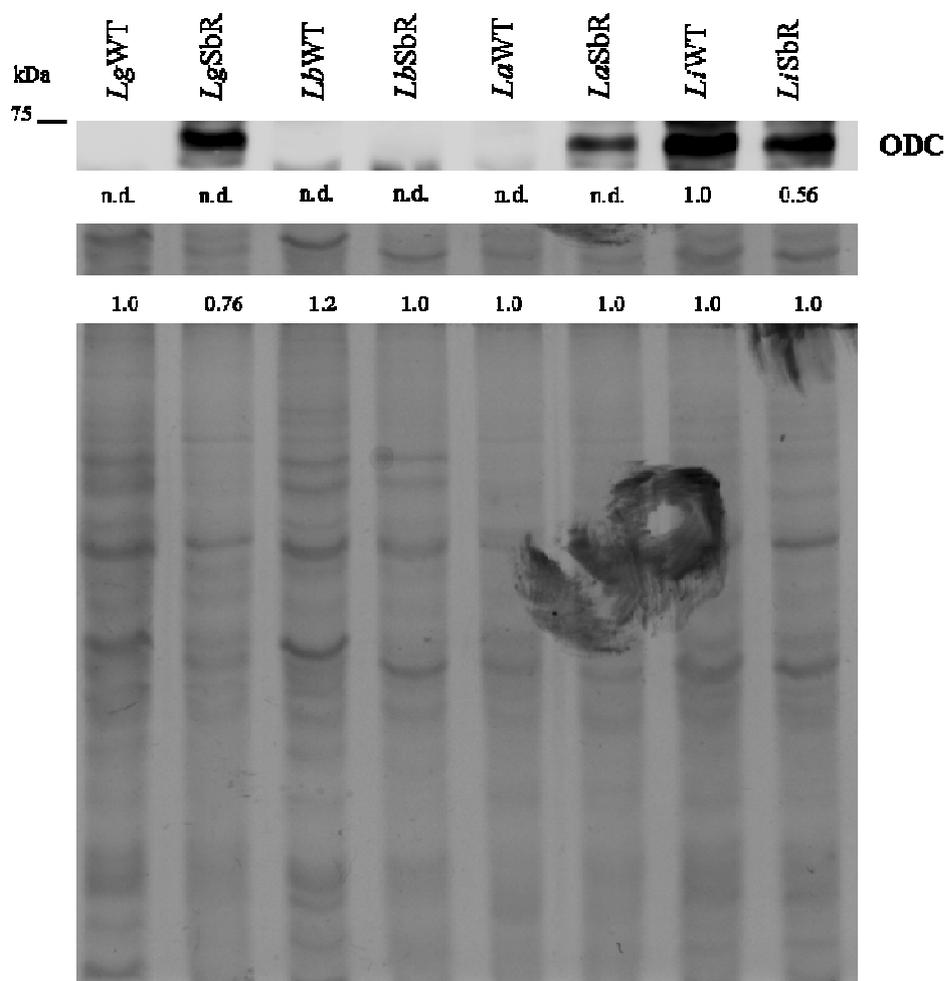


Figura 8 – Nível de expressão de Ornitina Decarboxilase (ODC) em linhagens de *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR). As proteínas totais (20 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida 12 %, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-*Ld*ODC. A normalização foi realizada usando géis de proteína total (pós-transferência) corados com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas e os índices de expressão estão descritos na figura.

Análise da expressão da enzima GCS, mostrou que o anticorpo policlonal anti-*Lg*GCS reconheceu um polipeptídeo de 78 kDa de tamanho esperado nas linhagens analisadas (Figura 11). A expressão da GCS na linhagem *L. guyanensis* resistente (*Lg*SbR) foi 4,5 vezes maior em relação à linhagem selvagem (*Lg*WT) (Figura 11). No entanto, *L. braziliensis*, não apresentou nenhuma diferença quanto à expressão de GCS entre as linhagens selvagem (*Lb*WT) e resistente (*Lb*SbR) (Figura 11). Ambas as linhagens resistentes de *L. amazonensis* e *L. infantum*,

apresentaram redução de 11 e 1,4 vezes, respectivamente, na expressão de GCS quando comparadas às suas respectivas linhagens selvagens (Figura 11).

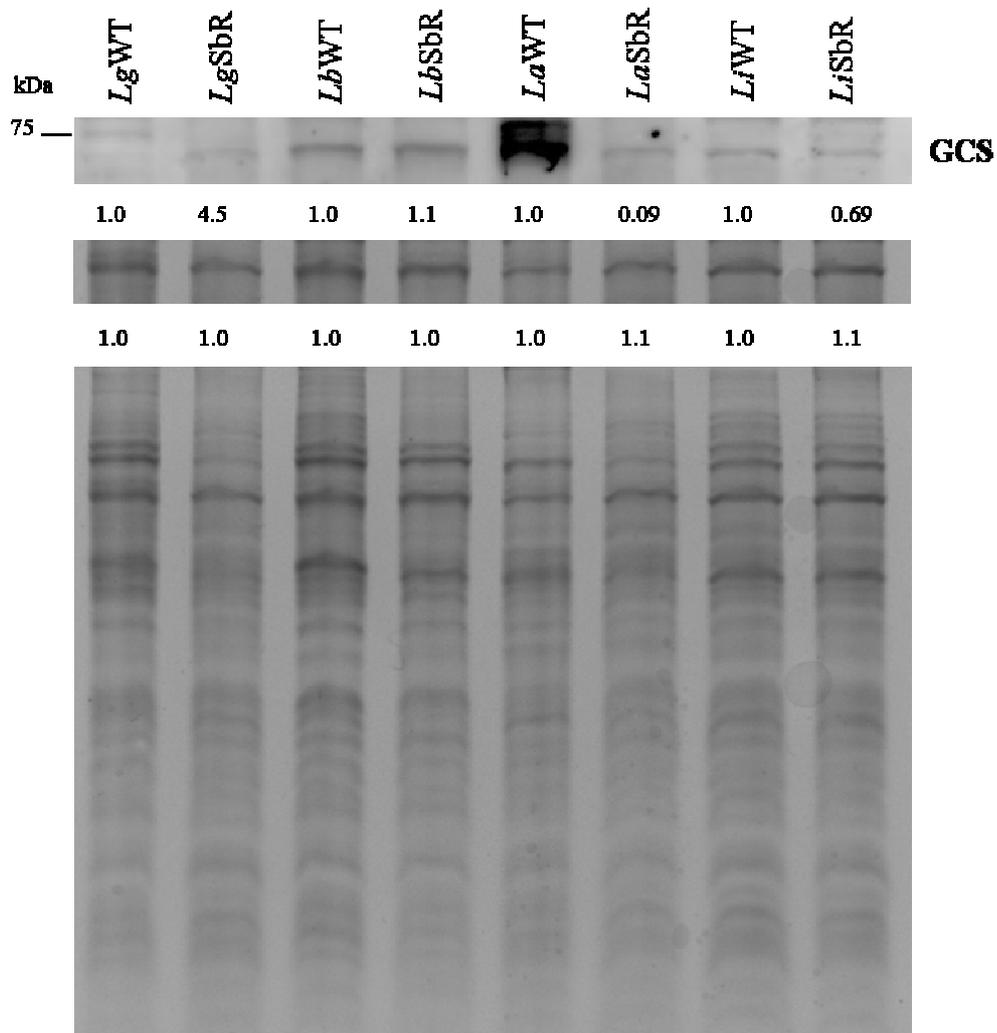


Figura 9 – Nível de expressão de Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS) em *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR). As proteínas totais (20 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida 12 %, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-LgGCS. A normalização foi realizada usando géis de proteína total (pós-transferência) corados com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas e os índices de expressão estão descritos na figura.

O anticorpo policlonal anti-*L*TryS reconheceu um polipeptídeo de 74 kDa de tamanho esperado em todas as linhagens analisadas (Figura 12). A expressão de TryS nas linhagens de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* resistentes ao

SbIII apresentaram aumento de 1,8, 2,4 e 1,7 vezes, respectivamente, quando comparados com a suas respectivas linhagens selvagens (Figura 12). Por outro lado, a expressão de TryS foi similar entre as linhagens de *L. infantum* selvagem (*L*WT) e resistente (*L*iSbR) ao SbIII (Figura 12).

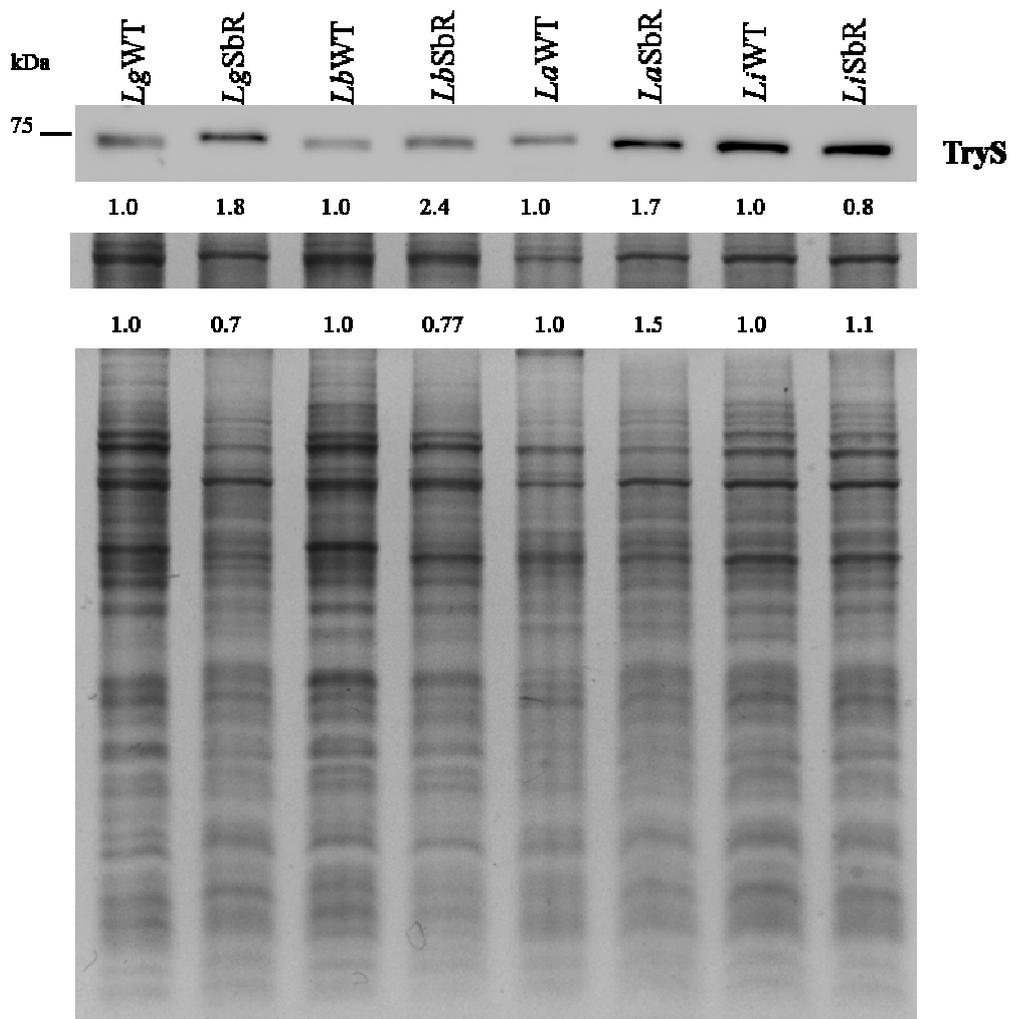


Figura 10 – Nível de expressão de Tripanotona Sintetase (TryS) em *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR). As proteínas totais (20 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida 12 %, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-*Li*TryS. A normalização foi realizada usando géis de proteína total (pós-transferência) corados com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas e os índices de expressão estão descritos na figura.

Ensaio de *Western Blot* usando o anticorpo policlonal anti-*TcTR* mostrou que ele reconheceu polipeptídeos de aproximadamente 53 kDa de tamanho esperado em todas as linhagens analisadas (Figura 13). Pequenas variações no tamanho desse polipeptídeo foram observadas entre as linhagens, podendo estar relacionada à alguma modificação pós-traducional, ou mesmo à expressão de alguma isoforma de TR. A linhagem de *L. guyanensis* resistente ao SbIII (*LgSbR*) apresentou um grande aumento de expressão da TR de aproximadamente 400 vezes quando comparado com a respectiva linhagem selvagem (Figura 13). Nenhuma diferença na expressão da TR foi observada entre as linhagens selvagens e resistentes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (Figura 13).

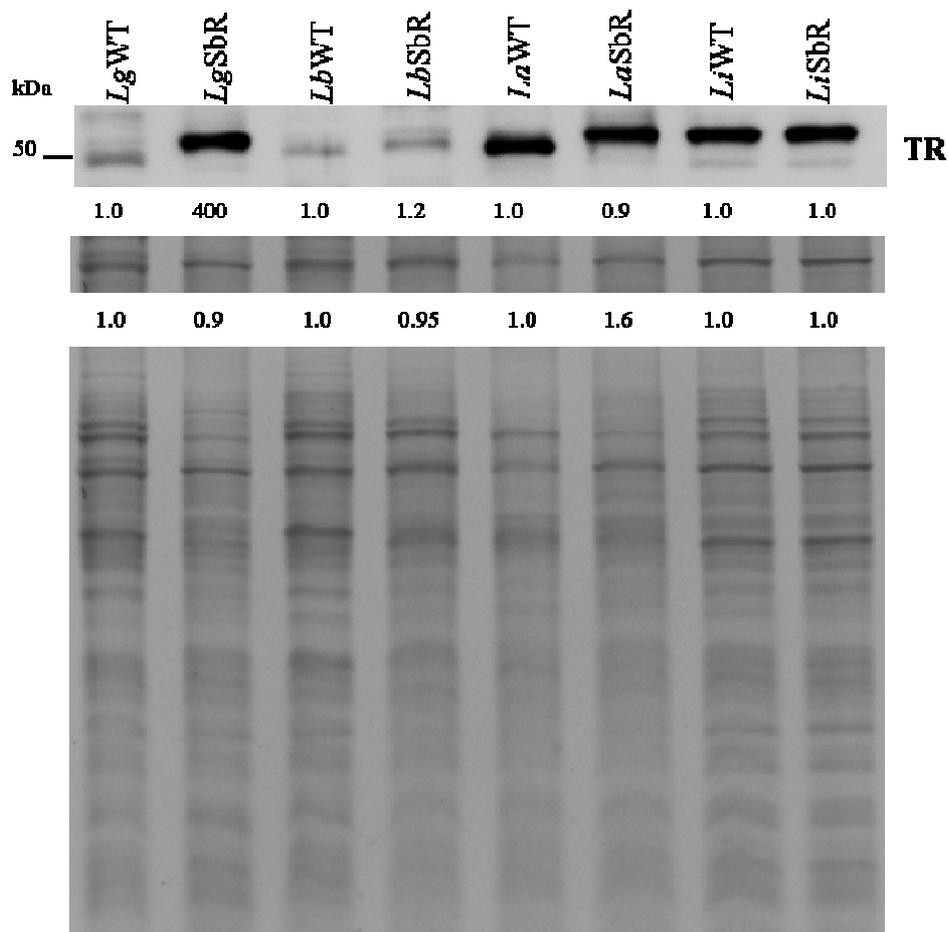


Figura 11 – Nível de expressão de Tripanotona Redutase (TR) em *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagens (WT) e resistentes ao SbIII (SbR). As proteínas totais (20 µg) foram separadas em gel de policrilamida 12 %, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-*TcTR*. A normalização foi realizada usando géis de proteína total (pós-transferência) corados com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas e os índices de expressão estão descritos na figura.

Com o intuito de normalizar os dados de expressão obtidos, as membranas foram incubadas com anticorpo anti- α -tubulina (Dados não mostrados). No entanto, variações nos níveis de α -tubulina foram observadas entre as linhagens selvagens e resistentes analisadas. Dessa forma, o gel de proteína totais corado com Azul de Comassie R-250 foi usado para normalizar a quantidade de amostra utilizada.

A tabela 5 resume os dados obtidos pelas análises de *Western Blot* e nos permite observar que a expressão de todas as enzimas analisadas ODC, GCS, TryS e TR em *L. guyanensis* resistente ao SbIII estavam aumentadas quando comparada com a linhagem selvagem. Esse resultado indica que esta linhagem de *L. guyanensis* possui mecanismo de resistência ao SbIII intimamente associado ao aumento da expressão de enzimas da via de síntese e de redução da tripanotona. Em *LbSbR*, foi observado aumento apenas em TryS, sugerindo a participação dessa enzima no fenótipo de resistência ao antimônio. *L. amazonensis* resistente ao SbIII, apresentou resultados com variações na expressão, seja no aumento ou redução da expressão das enzimas analisadas. *LaSbR* apresentou aumento na expressão de ODC e TryS e, diminuição da expressão de GCS. *L. infantum* resistente apresentou redução da expressão de ODC e GCS e nenhuma alteração na expressão de TryS e TR.

Tabela 5 – Resumo da expressão de enzimas da via de síntese e redução de tripanotona em linhagens selvagens e resistentes ao SbIII de *Leishmania* spp. do Novo Mundo.

	ODC	GCS	TryS	TR
LgSbR	Aumento	Aumento	Aumento	Aumento
LbSbR	n.d.	Igual	Aumento	Igual
LaSbR	Aumento	Redução	Aumento	Igual
LiSbR	Redução	Redução	Igual	Igual

n.d.=Não Determinado

Dessa forma, uma vez determinados os perfis de expressão dessas enzimas nas linhagens selvagens e resistentes ao SbIII e tendo em mãos as informações sobre características moleculares e a importância epidemiológica dessas espécies no Brasil, nesse estudo foram escolhidas as espécies *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e

L. infantum para realizar a caracterização molecular e funcional de ODC, GCS, TryS e TR.

5.2 Ornitina Decarboxilase (ODC)

5.2.1 Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de ODC

O gene que codifica a ODC (*LbrM.12.0300*) já havia sido previamente clonado no vetor de expressão em *Leishmania* pIR1-BSD pelo aluno de mestrado Antônio Phelipe Zóboli (Dissertação, Zoboli, A. P., 2012). Assim, a construção já clonada foi novamente sequenciada e utilizada nos procedimentos de transfecção. O sequenciamento do gene *odc* clonado a partir do DNA genômico de *L. guyanensis*, mostrou identidade de 98 % e cobertura de 100 % para a sequência nucleotídica quando comparada à sequência de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.12.0300*) (Apêndice I), sendo essa diferença devido ao polimorfismo de 31 nucleotídeos (Tabela 6). A sequência de ODC de *L. guyanensis* apresentou 99 % de identidade e 100 % de cobertura quando comparada à sequência nucleotídica de *L. panamensis* L13 (*LPAL13_120007700*) (Apêndice 3), sendo essa diferença devido à 14 nucleotídeos diferentes (Tabela 6). As comparações envolvendo as três espécies de *Leishmania* foram realizadas com o intuito de verificar as diferenças entre as sequências de ODC destas espécies e também analisar os polimorfismos na sequência de ODC de *L. guyanensis*, cujo genoma não está disponível até o presente momento em banco de dados. No entanto, o sequenciamento do genoma de *L. guyanensis* se encontra em andamento e está sendo realizado pelo Swiss Institute of Bioinformatics desde 2014.

A sequência de aminoácidos gerada a partir da sequência nucleotídica de *L. guyanensis* apresentou identidade e cobertura de 97 e 100 %, respectivamente, quando comparada com a sequência de *L. braziliensis*, apresentando 19 aminoácidos diferentes posicionados ao longo da cadeia polipeptídica (Tabela 6)

(Apêndice II). A sequência de aminoácidos de ODC de *L. panamensis* comparado com ODC de *L. guyanensis* apresentou 99% de identidade e 100 % de cobertura devido à diferença de 9 aminoácidos (Tabela 6) (Apêndice IV). A espécie *L. guyanensis* é filogeneticamente mais próxima de *L. panamensis* do que de *L. braziliensis*, apresentando, portanto, maior identidade entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos de *L. panamensis*.

Tabela 6 – Identidade, cobertura e diferenças entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de ODC de *L. guyanensis* quando comparada às sequências referências do *Tritypdb.org*.

Sequência Amplificada	Sequências Referência (tritypdb.org)			
	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)		<i>L. panamensis</i> (MHOM/COL/81/L13)	
	Sequência nucleotídica	Sequência de aminoácidos	Sequência nucleotídica	Sequência de aminoácidos
	Identidade 98%	Identidade 97%	Identidade 99%	Identidade 99%
	Cobertura 100%	Cobertura 100%	Cobertura 100%	Cobertura 100%
	Posição da Diferença	Posição da Diferença	Posição da Diferença	Posição da Diferença
Ornitina	113-912-1110=T por C	38=I por T	304-1660-1664-1674=A por G	102=S por G
Decarboxilase	189-544-603=G por C	102=S por G	475=G por T	159=A por S
<i>L. guyanensis</i>	304-1664-1705=A por G	155=A por V	516=T por C	201=G por A
(IUMB/BR/85/M9 945)	429-475-1843=G por T	159-615=A por S	602=G por C	395=S por N
	464-1330-1508-1543-1841-1845=C por T	182=A por P	867-1184-1489=G por A	497=D por N
	573=C por G	201=G por A	969=C por A	503=Y por F
	665-867-927-1184-1489-1667-1779=G por A	222-556=G por D	1508-1659=A por T	554=M por V
	793-969=C por A	265=Q por K		555=E por G
	1044=A por C	395=S por N		
	1343-1659=A por T	445-614=T por I		
		448=D por V		
		497=D por N		
		503=S por F		
		515=P por S		
		555=E por G		
		569=T por A		

Abreviações da Sequência Nucleotídica: C=citosina; T=timina; A=adenina; G=guanina.

Abreviações da Sequência de Aminoácidos: G=glicina; A=alanina; L=leucina; V=valina; I=isoleucina; P=prolina; F=fenilalanina; S=serina; T=treonina; C=cisteína; Y=tirosina; N=asparagina; Q=glutamina; D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico; R=arginina; K=lisina; H=histidina; W=triptofano; M=metionina.

Uma vez conferida a correta sequência do gene *odc*, o inserto referente a esse gene foi ligado no plasmídeo de transfecção em *Leishmania* pIR1-BSD e a construção pIR1-LgODC foi obtida. Essa construção foi linearizada usando a enzima de restrição *Swal* e, em seguida, transfectada em formas promastigotas de *LgWT*, *LbWT* e *LWT*. Após 24 horas, os parasitos foram plaqueados em meio M199 semi-sólido contendo blasticidina (BSD) e os clones transfectados foram então obtidos e

avaliados. Foi também obtido, para todas as espécies, um parasito controle transfectado contendo apenas o plasmídeo sem o gene de interesse. Para confirmar a presença do plasmídeo nos parasitos transfectados, PCR específica para o gene *bsd* (gene que codifica a enzima blasticidina S-deaminase, responsável por inativar a blasticidina) foi realizada. Os clones avaliados apresentaram uma banda de 399 pb correspondente ao gene *bsd* (Figura 14).

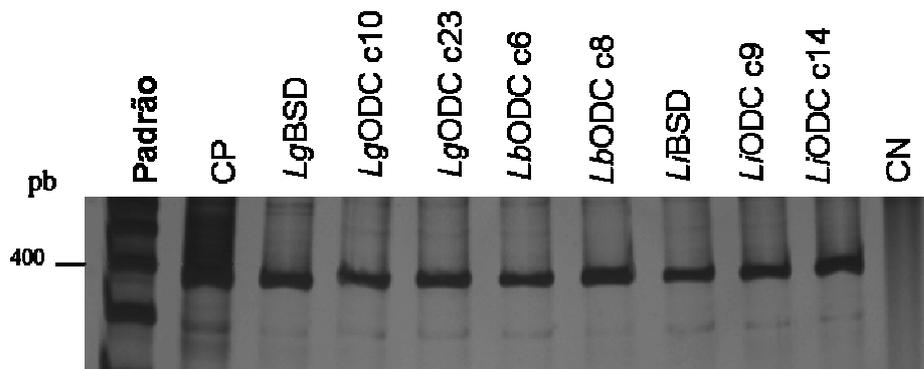


Figura 12 – Amplificação do gene *bsd* nos clones de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-LgODC. Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida 6 % corado com nitrato de prata. Em todos os géis é possível observar o fragmento de 399 pb, indicando a presença do gene que confere resistência à blasticidina. Como controle positivo foi utilizado 10 ng de plasmídeo pIR1-BSD purificado.

5.2.2 Nível de Expressão de ODC nos Clones Transfectados

Os clones positivos para o marcador de seleção BSD foram submetidos a ensaios de *Western Blot* para verificar se a transfecção possibilitou o aumento de expressão da enzima ODC nos clones selecionados. Dois clones transfectados de cada espécie foram escolhidos para estudo e os resultados demonstraram aumento da expressão dessa enzima nos clones quando comparados com as respectivas linhagens selvagens não transfectadas (Figura 15 A, B e C).

Os clones de *L. guyanensis* superexpressores de ODC, clones 10 (*LgODC c10*) e clone 23 (*LgODC c23*) demonstraram um aumento de 1,7 vezes na expressão de ODC quando comparados à linhagem selvagem (*LgWT*) e à linhagem transfectada apenas com o plasmídeo vazio (*LgBSD*) (Figura 15 A). Já os clones de *L. braziliensis* superexpressores de ODC, clones 6 (*LbODC c6*) e 8 (*LbODC c8*),

apresentaram índices de expressão de 74,7 e 58,6 vezes maiores, respectivamente, quando comparados à linhagem selvagem (Figura 15 B). Em *L. infantum*, foi observado um aumento na expressão de ODC de 1,7 e 2,0 vezes para os clones 9 (*LiODC c9*) e 14 (*LiODC c14*), respectivamente, quando comparados aos controles (*LlWT* e *LiBSD*) (Figura 15 C).

Ao comparar os índices de aumento de expressão de ODC entre as espécies transfectadas, verificamos que *L. braziliensis* apresentou índices de expressão maiores (58,6 a 74,7 vezes) quando comparado com *L. guyanensis* e *L. infantum* que apresentaram índices de expressão similares (1,7 a 2 vezes). Esse resultado mostra que cada espécie de *Leishmania* modula de maneira diferencial a expressão da enzima ODC.

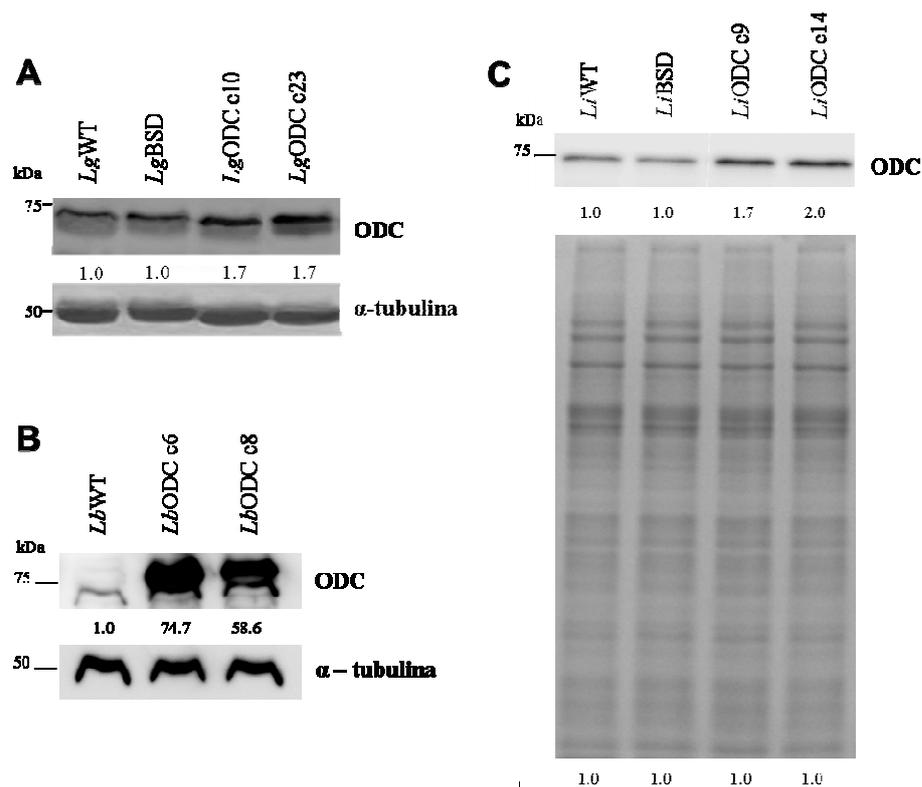


Figura 13 – Nível de expressão de Ornitina Decarboxilase em (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*). Nesses ensaios foram analisadas para todas as espécies, as linhagens selvagens - (A) *LgWT*, (B) *LbWT* e (C) *LlWT*, transfectadas com o vetor sem o inserto - (A) *LgBSD* e (C) *LiBSD*, e transfectadas com o gene *odc* - (A) *LgODC c10* e *c23*; (B) *LbODC c6* e *c8* e (C) *LiODC c9* e *c14*. As proteínas totais (20 ou 40 µg) foram separadas em gel de poliácridamida 12 % e transferidas para membranas de nitrocelulose. Um polipeptídeo de aproximadamente 70 kDa foi reconhecido pelo anticorpo anti-*LdODC* em todas as amostras. A normalização foi realizada para (A) e (B) com o anticorpo anti- α -tubulina que reconhece um polipeptídeo de 50 kDa e para (C) usando gel de proteína total (pós-transferência) contendo 20 µg corado com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas.

5.2.3 Efeito do Inibidor DFMO no Crescimento das Formas Promastigotas de *L. guyanensis* e *L. infantum*

Com o intuito de verificar se a superexpressão de ODC obtida correspondia à enzimas na forma ativa, analisamos o crescimento das linhagens de *L. guyanensis* e *L. infantum* transfectadas com o gene *odc* na presença de diferentes concentrações de α -difluorometilornitina (DFMO), um inibidor específico de ODC (Figura 16 A e B).

Os resultados mostraram que o DFMO foi capaz de reduzir o crescimento de todas as linhagens avaliadas. Porém, as linhagens superexpressoras de ODC foram mais resistentes ao DFMO do que os seus respectivos pares selvagens (Figura 16 A e B). Os valores de IC_{50} foram calculados utilizando a fórmula de Interpolação Linear (HUBER; KOELLA, 1993). Observamos que o IC_{50} do DFMO para o clone superexpressor de ODC *LgODC* c10 (109 μ M) foi cerca de 2,0 vezes maior que o IC_{50} do DFMO para *LgWT* (49,25 μ M) (Tabela 8).

Para *L. infantum*, no entanto, não foi possível calcular o IC_{50} uma vez que concentrações maiores desse inibidor precisam ser avaliadas. Ainda sim, observamos que a superexpressão de ODC na linhagem *LiODC* c9 forneceu certa proteção ao efeito do DFMO, demonstrada pela diferença estatística encontrada na concentração de 50 μ M (Figura 16 B).

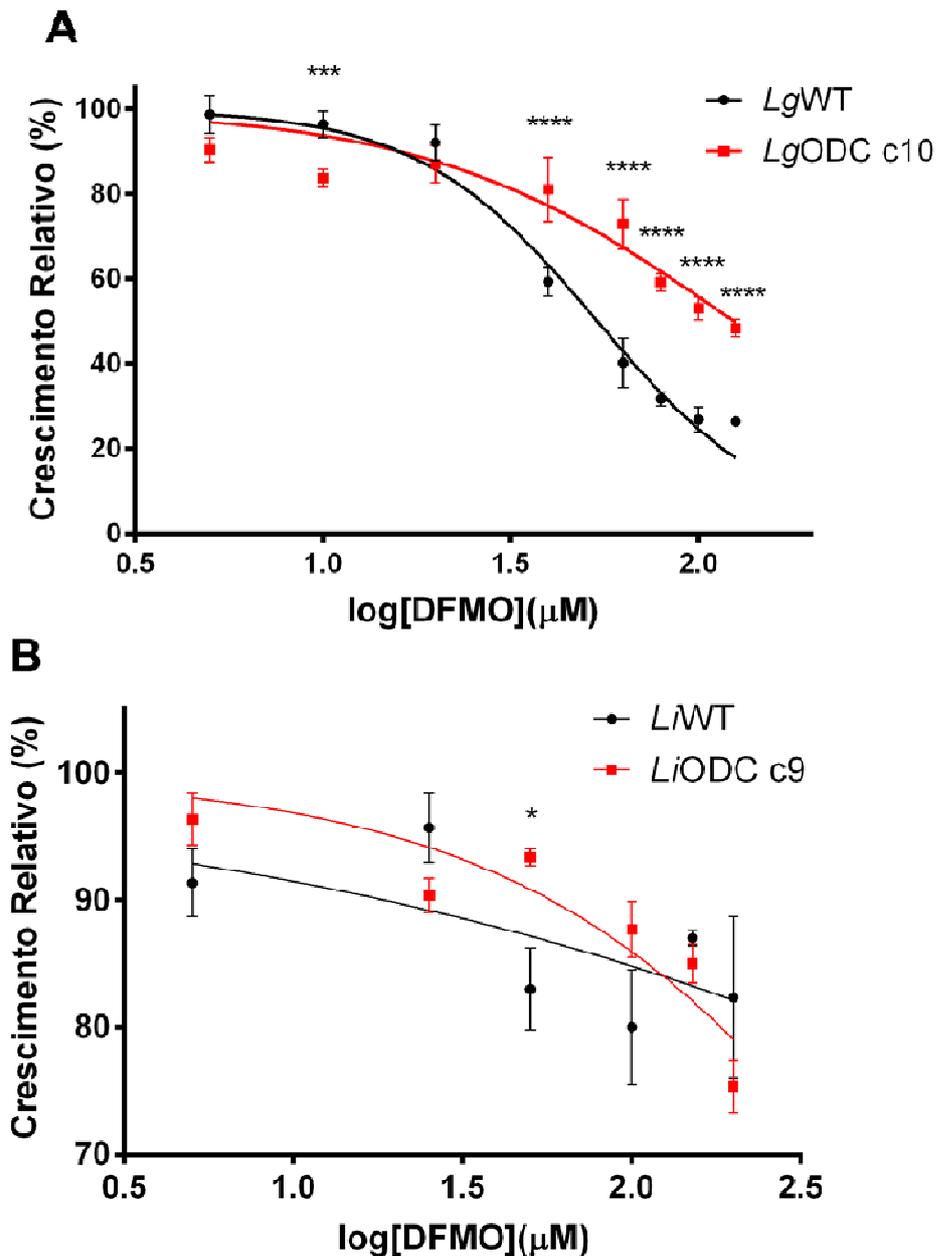


Figura 14 – Curva de crescimento de (A) *L. guyanensis* selvagem (*LgWT*) e transfectada com o gene *odc* (*LgODC c10*) e (B) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagem (*LiWT*) e transfectada com o gene *odc* (*LiODC c9*) na presença de DFMO. Os parasitos foram incubados com crescentes concentrações de DFMO (5 a 200 μM) por 48 h. O crescimento dos parasitos foi quantificado em contador de partículas Z1 Coulter Counter. Os valores médios e o desvio padrão de (A) dois experimentos independentes e (B) um experimento são demonstrados. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de student usando o programa GraphPad Prism 6.0. Asteriscos representados pelos valores de *p*: * $p=0,0346$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

5.2.4 Teste de Susceptibilidade ao SbIII em Linhagens Superexpressoras de ODC

Uma vez confirmado que as linhagens transfectadas com o gene *odc* superexpressam a enzima ODC ativa, os parasitos selvagens e superexpressores foram submetidos à teste de susceptibilidade ao SbIII. Nesse ensaio, as linhagens foram incubadas por 48 horas na presença de diferentes concentrações de SbIII.

Os clones superexpressores de ODC de *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, foram mais resistentes ao SbIII quando comparados às respectivas linhagens selvagens. Essa resistência é demonstrada pelo maior crescimento das linhagens superexpressoras de ODC na presença de SbIII quando comparada aos controles (linhagens selvagens e transfectadas com o vetor vazio) (Figura 17 A e B). Os clones de *L. guyanensis* superexpressores de ODC (*LgODC* c10 com IC_{50} 58,76 μ M e c23 com IC_{50} 55,21 μ M) foram de 2,2 e 2,3 vezes mais resistentes ao SbIII do que a respectiva linhagem selvagem (25,93 μ M) (Tabela 7). *L. braziliensis* foi a espécie mais sensível ao SbIII. O IC_{50} obtido para a linhagem selvagem foi de 4,47 μ M, enquanto que os clones superexpressores para *LbODC* c6 e c8 apresentaram IC_{50} de 10,9 e 6,6 μ M, apresentando índices de resistência de 2,4 e 1,5 vezes, respectivamente (Tabela 7). É importante salientar que os clones transfectados de *L. braziliensis* mesmo apresentando grande aumento na expressão de ODC (58,6 e 74,7 vezes), os índices de susceptibilidade ao SbIII foram similares aos obtidos para *L. guyanensis*. Esse resultado demonstra que o parasito controla a expressão e atividade da enzima conforme sua necessidade metabólica.

A superexpressão de ODC em *L. infantum* não foi capaz de modificar o fenótipo de resistência ao SbIII nessa espécie, uma vez que o crescimento dos parasitos na presença de diferentes concentrações de SbIII foi similar para todas as linhagens avaliadas (*LMT*, *LiBSD*, *LiODC* c9 e c14) (Figura 17 C). De todas as espécies avaliadas, *L. infantum* foi a mais tolerante ao tratamento com SbIII, exibindo IC_{50} de 272,9 μ M para *LMT*, 268 μ M para *LiBSD*, 262,5 μ M para *LiODC* c9 e 262,4 μ M para *LiODC* c14 (Tabela 7). Em termos de comparação o IC_{50} do SbIII para *LMT* é 10,5 e 61 vezes maior do que os IC_{50} de SbIII para as espécies *LgWT* e *LbWT*, respectivamente. Isso demonstra que *L. infantum* é mais tolerante ao SbIII.

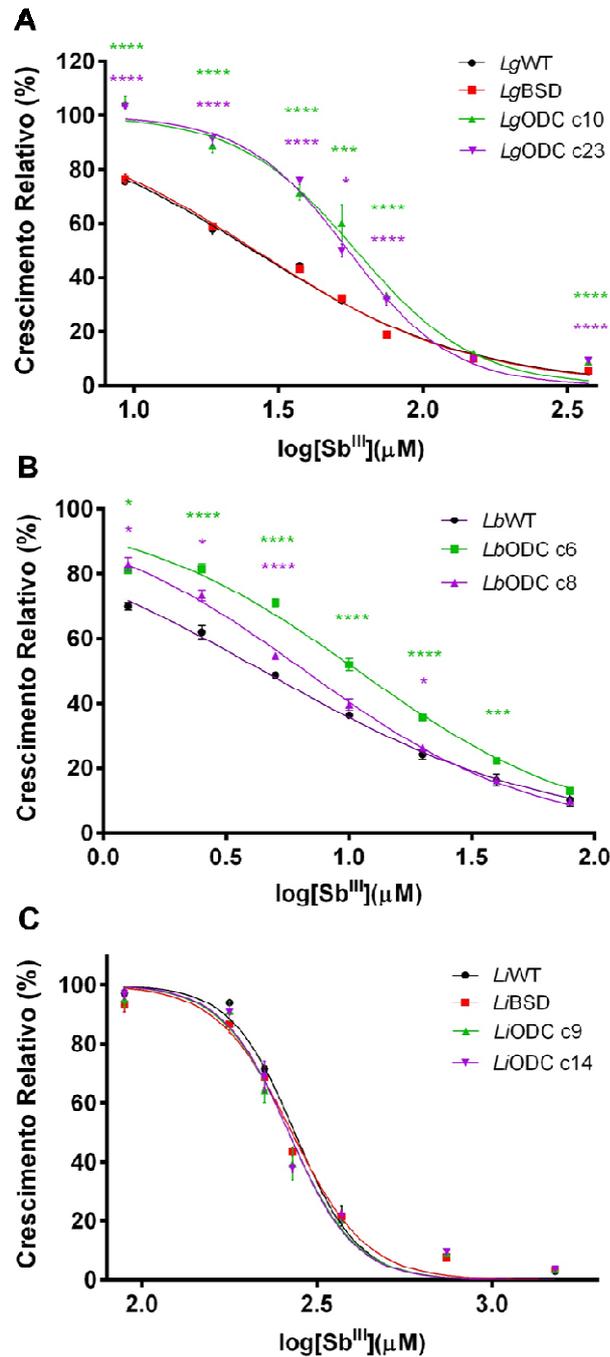


Figura 15 – Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) ao SbIII. Os ensaios foram realizados para todas as espécies usando as linhagens selvagens - (A) *Lg*WT, (B) *Lb*WT e (C) *L*WT, transfetadas com o vetor sem o inserto - (A) *Lg*BSD e (C) *L*iBSD, e transfetadas com o gene *odc* - (A) *Lg*ODC c10 e c23; (B) *Lb*ODC c6 e c8 e (C) *L*iODC c9 e c14. Os parasitos foram incubados na presença de SbIII (1,17 a 1497,3 μM) por 48 horas e as porcentagens do crescimento dos parasitos foram determinadas usando Z1 Coulter Counter. Valores médios e desvio padrão de três experimentos independentes estão mostrados. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Tabela 7 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), superexpressoras de ODC de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) em relação à expressão de ODC e susceptibilidade ao SbIII.

Linhagem	Índice de aumento de expressão Western Blot (Clone/WT)	IC ₅₀ SbIII (µM) (Intervalo de Confiança)	Teste t	Índice de Resistencia (Clone/WT)
LgWT	-	25,93 (24,45 to 27,51)	-	-
LgBSD	1,0	26,44 (25,08 to 27,86)	N.s. $p=0,3372$	1,0
LgODC c10	1,7	58,76 (53,99 to 63,95)	** $p=0,0014$	2,2
LgODC c23	1,7	55,21 (52,16 to 58,44)	** $p=0,0025$	2,3
LbWT	-	4,477 (4,142 to 4,840)	-	-
LbODC c6	>10	10,92 (9,885 to 12,06)	** $p=0,0012$	2,4
LbODC c8	>10	6,634 (6,241 to 7,053)	** $p=0,0048$	1,5
LWT	-	272,9 (261,9 to 284,5)	-	-
LiBSD	1,0	268,0 (256,8 to 279,7)	n.d.	1
LiODC c9	2,0	262,5 (249,1 to 276,6)	n.d.	1
LiODC c14	2,2	262,4 (250,6 to 274,7)	n.d.	1

N.s.= Não Significativo
n.d.=Não Determinado

5.2.5 Teste de Susceptibilidade de Linhagens Superexpressoras de ODC ao SbIII na Presença do Inibidor DFMO

Para verificar se a inibição de ODC utilizando DFMO causava reversão do fenótipo de resistência ao SbIII, avaliamos o crescimento de linhagens de *L. guyanensis* selvagem e superexpressora de ODC previamente incubadas com DFMO (24 horas) e posteriormente crescidas por mais 24 horas com diferentes concentrações de SbIII.

Os parasitos selvagens previamente tratados com DFMO (50 µM) tiveram redução de 60 % no crescimento na ausência de SbIII. Já os parasitos superexpressores de ODC (LgODC c10) apresentaram redução de apenas 16 % no crescimento após esse tratamento (Figura 18).

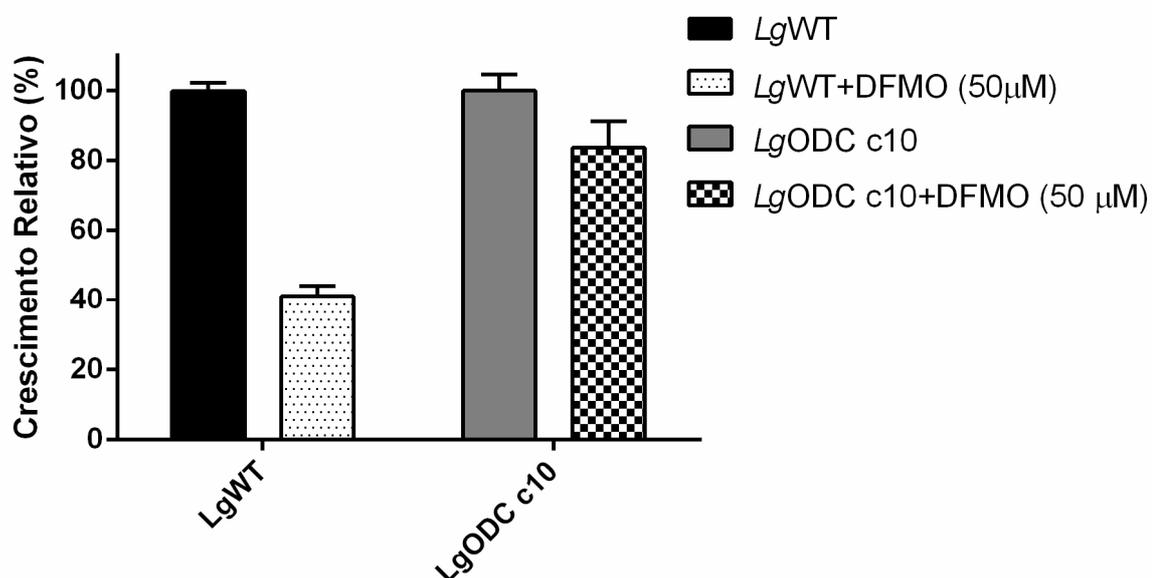


Figura 16 – Efeito do inibidor DFMO (50 μM) no crescimento de *L. guyanensis* selvagem (*LgWT*) e transfectada com o gene *odc* (*LgODC c10*). Formas promastigotas de *LgWT* e de *LgODC c3* foram incubados ou não com DFMO (50 μM) por 48 h. Após esse tempo, o crescimento dos parasitos foi quantificado em contador de partículas Z1 Coulter Counter. Os valores médios e o desvio padrão de três experimentos independentes são demonstrados.

Na presença de SbIII e DFMO, o crescimento da linhagem selvagem (*LgWT*) foi baixo, permanecendo em torno de 30 % independentemente da concentração de SbIII utilizada (Figura 19). Para *LgODC c10* na presença de DFMO, o aumento da concentração de SbIII levou a um decréscimo sucessivo do crescimento desta linhagem. No entanto, o superexpressor ainda obteve, em todos os pontos de SbIII avaliados, um crescimento maior do que o da linhagem selvagem (Figura 19). Dessa forma, o pré-tratamento com DFMO (50 μM) deixou *LgWT* 648 vezes mais sensível ao tratamento com SbIII e *LgODC c10* ficou apenas 1,5 vezes mais sensível a esse composto (Tabela 8). Esse resultado confirma que o aumento na expressão de ODC é diretamente associado ao fenótipo de resistência ao SbIII em *L. guyanensis*.

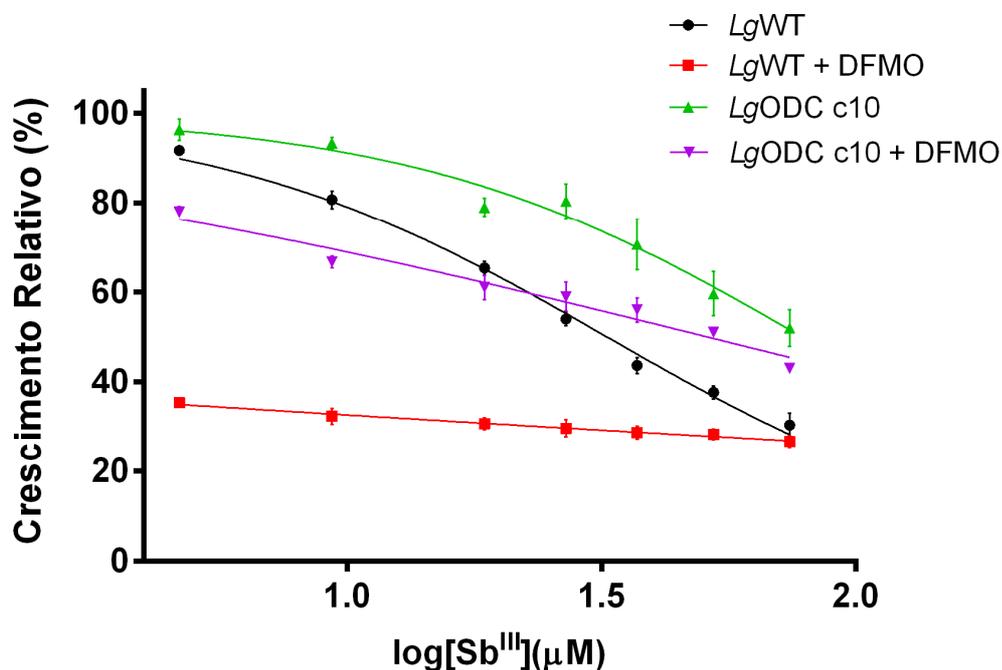


Figura 17 – Efeito do inibidor DFMO no fenótipo de resistência ao SbIII de *L. guyanensis* transfectada com o gene *odc*. Formas promastigotas de *LgWT* e de *LgODC c10* foram pré-incubados ou não com DFMO (50 μM) por 24 h. Após esse tempo, os parasitos foram incubados com crescentes concentrações de SbIII por mais 24 h (4,7 a 74,9 μM). O crescimento dos parasitos foi quantificado em contador de partículas Z1 Coulter Counter. Os valores médios e o desvio padrão de três experimentos independentes são demonstrados.

Tabela 8 – IC₅₀ do DFMO e do SbIII em linhagens de *L. guyanensis* pré-tratadas ou não com DFMO.

Linhagem	IC ₅₀ DFMO (μM)	Índice de resistência DFMO	IC ₅₀ SbIII (μM) 24 h	IC ₅₀ SbIII (μM) na presença de DFMO (50 μM) 24 h	Índice de sensibilidade ao SbIII
LgWT	49,25	-	32,4	0,05	648
LgODC c10	109	2,2	78,4	50,9	1,5

5.3 Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS)

5.3.1 Amplificação, Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de GCS

Para amplificar a sequência codificante do gene *gcs*, foi utilizado como molde o DNA genômico de *L. guyanensis*. O fragmento amplificado do DNA de *L. guyanensis* para o gene *gcs* foi demonstrado por uma banda única de aproximadamente 2.000 pb, o que é condizente com o tamanho do fragmento esperado (2067 pb) para o gene *gcs* de *L. braziliensis* M2904 e de *L. panamensis* L13 (Figura 20).

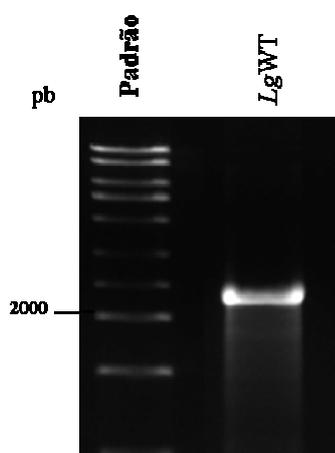


Figura 18 – Amplificação da região codificante completa do gene da Gama-Glutamilcisteína Sintetase a partir do DNA genômico de *L. guyanensis* M9945. Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de PCR corado com GelRed[®]. Uma banda única correspondendo ao gene da *gcs* com aproximadamente 2067 pb pode ser observada. Padrão: Padrão de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder (Promega).

Posteriormente, o produto de amplificação foi clonado no vetor pGEMT-easy e, após transformação em bactéria *E. coli* TOP10F', quatro colônias foram selecionadas para o sequenciamento. A análise das sequências nucleotídicas do gene *gcs* mostrou que a colônia selecionada apresentou 97 % de similaridade e 100

% de cobertura em sua sequência nucleotídica quando comparada com a sequência de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.18.1700*) (Apêndice V). Comparando a sequência de aminoácidos, a sequência de *L. guyanensis* obteve 94 % de similaridade e 100 % de cobertura em relação à sequência de *L. braziliensis* M2904 (Apêndice VI). Ao todo foram observados 60 nucleotídeos e 39 aminoácidos diferentes na sequência de *gcs* de *L. guyanensis* quando comparada à sequência de *L. braziliensis* (Tabela 9).

O alinhamento com a sequência nucleotídica e de aminoácidos do gene *gcs* de *L. panamensis* L13 (*LPAL13_180019700*) mostrou para ambas sequências, similaridade e cobertura de 99 e 100 %, respectivamente (Apêndice VII e VIII). Essas diferenças estão associadas às diferenças em 8 nucleotídeos e 3 aminoácidos nas sequências de *L. guyanensis* em comparação às sequências de *L. panamensis* (Tabela 9).

Assim, as diferenças encontradas entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos são características de *L. guyanensis*.

Tabela 9 – Identidade, cobertura e diferenças entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos de GCS de *L. guyanensis* quando comparada às sequências referências do *Tritypdb.org*.

Sequência Amplificada	Sequências Referência (tritypdb.org)			
	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)		<i>L. panamensis</i> (MHOM/COL/81/L13)	
	Sequência nucleotídica	Sequência de aminoácidos	Sequência nucleotídica	Sequência de aminoácidos
	Identidade 97%	Identidade 94%	Identidade 99%	Identidade 99%
	Cobertura 100%	Cobertura 100%	Cobertura 100%	Cobertura 100%
	Posição da Diferença	Posição da Diferença	Posição da Diferença	Posição da Diferença
Gama-Glutamilcistei na Sintetase <i>L. guyanensis</i> (IUMB/BR/85/M9945)	24-81-698-792-1261=C por G	9=I por A	6-690=G por T	168=P por L
	25-239-315-349-788-1161-1997=A por G	38=H por N	503=C por T	186=I por T
	26-364-418-557-664-723-726-921-1400-1651=T por C	72=G por S	557-2061=T por C	313=C por S
	45-262-863-899-1208-1601-1724=A por C	80=K por R	843=A por G	
	112-232-974=C por A	88-403=I por L	937=T por A	
	214-659-772-794-834-1464-1507-1521=G por A	117=K por E	1332-2067=G por A	
	336-503-800-1146-1638-1950=C por T	119=S por I		
	356-690=G por T	122-604=W por R		
	464-766-937-1438-1810-1998=T por A	140=F por L		
	712-1368=T por G	155=V por D		
	798-1011-1013=A por T	168=P por L		
	1851=G por C	186=I por T		
		220=S por N		
		222-551=C por R		
		233=T por S		
	238=S por A			
	256-313=C por S			
	258=A por T			
	263=E por G			
	265=C por Y			
	267=A por V			
	288-534=K por T			
	300=N por T			
	325=A por D			
	338=N por I			
	387=I por M			
	421=Q por E			
	456=D por E			
	467=M por T			
	480=S por T			
	488=M por I			
	503=V por I			
	575=E por A			
	666=N por R			

Diferenças: posição na sequência (separadas por traço)=nucleotídeo/aminoácido de *L. braziliensis*/*L. panamensis* POR nucleotídeo/aminoácido de *L. guyanensis*

Abreviações da Sequência Nucleotídica: C=citosina; T=timina; A=adenina; G=guanina.

Abreviações da Sequência de Aminoácidos: G=glicina; A=alanina; L=leucina; V=valina; I=isoleucina; P=prolina; F=fenilalanina; S=serina; T=treonina; C=cisteína; Y=tirosina; N=asparagina; Q=glutamina; D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico; R=arginina; K=lisina; H=histidina; W=triptofano; M=metionina.

Assim, uma vez confirmada que o produto amplificado correspondia ao gene *gcs*, esse fragmento foi ligado ao plasmídeo de transfecção de *Leishmania* pIR1-BSD. Em seguida, a construção foi linearizada e transfectada em formas promastigotas de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Após a seleção dos

clones resistentes ao BSD em meio M199 semi-sólido contendo esta droga, estes clones foram submetidos à PCR com iniciadores específicos para o gene que confere resistência ao BSD (gene *bsd*). Os resultados obtidos mostraram que os clones selecionados, tanto transfectados com o vetor vazio quanto com o vetor contendo o gene *gcs*, apresentaram amplificação de uma banda única de 399 pb, que corresponde a amplificação do fragmento do gene *bsd* (Figura 21). Esse resultado confirma a eficiência do procedimento de transfecção e seleção dos clones usando o antibiótico blasticidina.

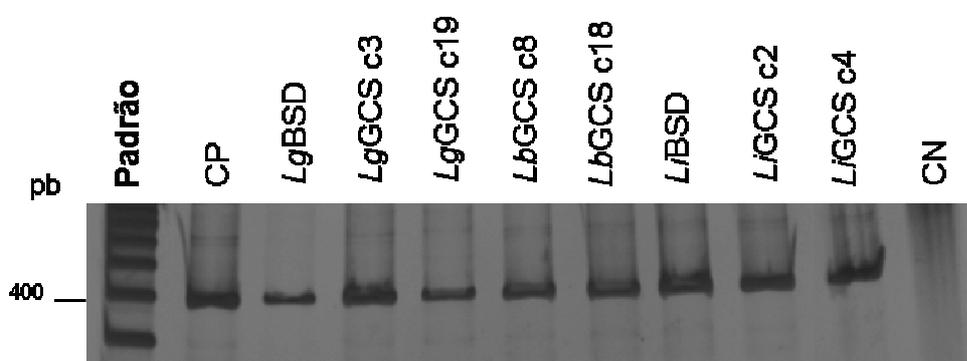


Figura 19 – Amplificação do gene *bsd* nos clones de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-LgGCS. Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida 6 % corado com nitrato de prata. Em todos os géis é possível observar o fragmento de 399 pb, indicando a presença do gene que confere resistência à blasticidina. Como controle positivo foi utilizado 10 ng de plasmídeo pIR1-BSD purificado.

5.3.2 Nível de Expressão de GCS nos Clones Transfectados

Os clones positivos para a PCR foram submetidos aos ensaios de *Western Blot* para avaliar o nível de expressão de GCS nos parasitos transfectados em relação à expressão dos parasitos selvagens usando anticorpo policlonal anti-LgGCS (Figura 22 A, B e C).

Em *L. guyanensis*, a análise da expressão da enzima GCS para os clones 3 (LgGCS c3) e 19 (LgGCS c19) transfectados com o gene *gcs* foram 2,2 e 2,3 vezes maiores do que os níveis de expressão obtidos para *L. guyanensis* selvagem, respectivamente (Figura 22 A). Para *L. braziliensis*, os níveis de expressão de GCS

para os clones 8 (*LbGCS c8*) e 18 (*LbGCS c18*) foram 41,5 e 45,1 vezes maiores quando comparados à linhagem *LbWT*, respectivamente (Figura 22 B). Em *L. infantum*, os níveis de expressão de GCS para os clones 2 e 4 (*LiGCS c2* e *LiGCS c4*) foram 23,8 e 24,0 vezes maiores quando comparados ao controle *LWT* (Figura 22 C). Nenhuma das linhagens contendo apenas o vetor vazio, ou seja, *LgBSD* e *LiBSD*, variaram os índices de expressão quando comparados à respectiva linhagem parental. Isso demonstra que a presença do plasmídeo ou o procedimento de transfecção e seleção dos clones, não alteram o fenótipo de expressão das enzimas analisadas (Figura 22 A e C).

Assim como para a expressão do gene *odc*, a superexpressão de GCS foi espécie-depende, ou seja, cada espécie transfectada obteve um nível próprio de aumento de expressão, mesmo utilizando o mesmo plasmídeo (*pIR1-BSD*) para todas as espécies. É interessante também observar que, *L. braziliensis* e *L. infantum* que receberam o gene heterólogo clonado a partir de *L. guyanensis*, obtiveram índices maiores de expressão de GCS do que os clones de *L. guyanensis* que tiveram a transfecção homóloga. Outra observação interessante é que os clones de *L. infantum* superexpressores de GCS apresentaram uma expressão 10 vezes maior do que os seus clones superexpressores de ODC. Dessa forma, os níveis de expressão também podem variar de acordo com o gene que está sendo superexpresso dentro de uma mesma espécie. Já *L. braziliensis* apresentou alto nível de expressão para ambos genes transfectados ODC (58,6 e 74,7 vezes) e GCS (41 e 45 vezes).

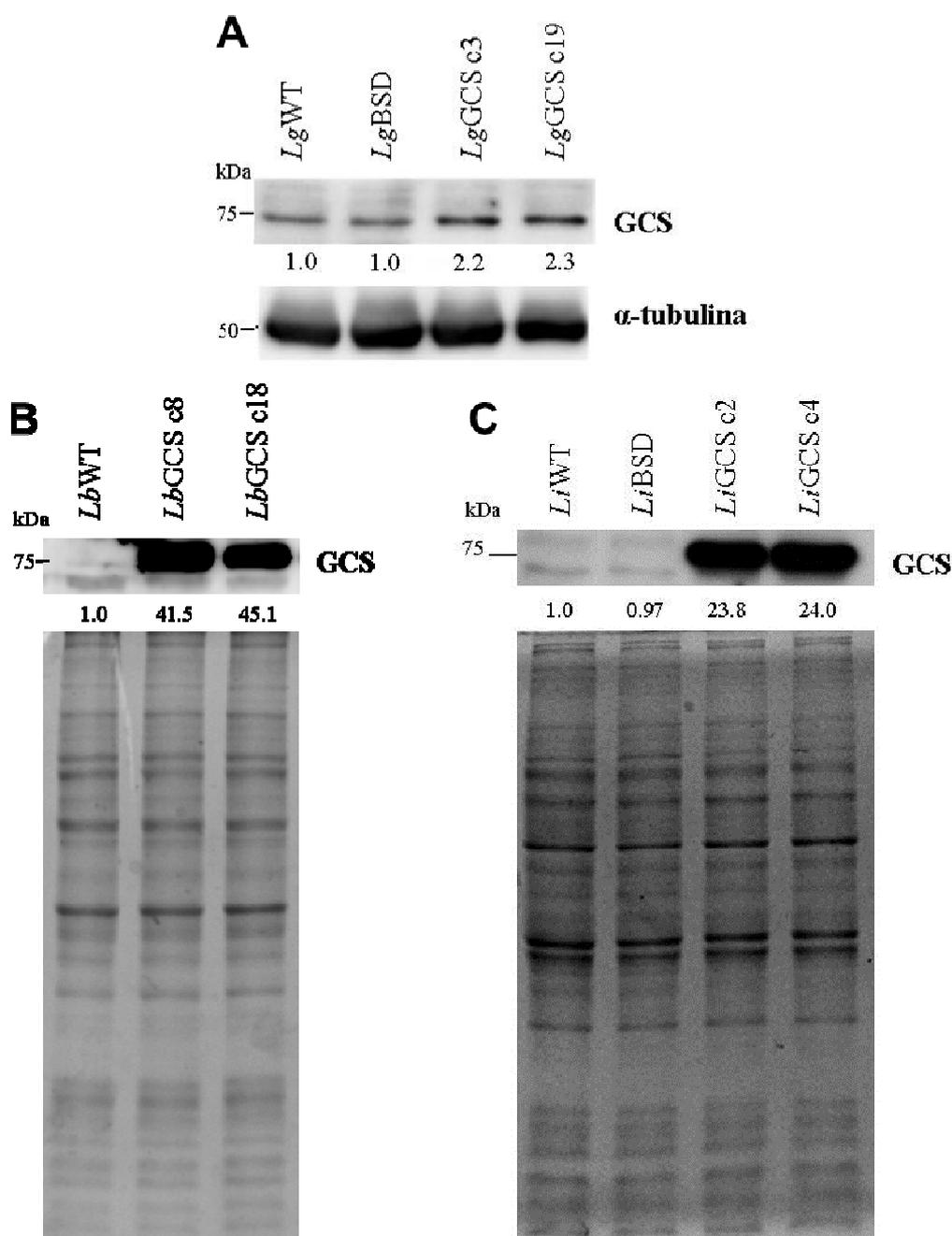


Figura 20 – Nível de expressão de Gama-Glutamilcisteína Sintetase em (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*). Nesses ensaios foram analisadas para todas as espécies, as linhagens selvagens - (A) *Lg*WT, (B) *Lb*WT e (C) *Li*WT, transfetadas com o vetor sem o inserto - (A) *Lg*BSD e (C) *Li*BSD, e transfetadas com o gene *gcs* - (A) *Lg*GCS c3 e c19; (B) *Lb*GCS c8 e c18 e (C) *Li*GCS c2 e c4. As proteínas totais (20 ou 40 μ g) foram separadas em gel de poliacrilamida 12 % e transferidas para membranas de nitrocelulose. Um polipeptídeo de aproximadamente 78 kDa foi reconhecido pelo anticorpo anti-*Lg*GCS em todas as amostras. A normalização foi realizada, para (A) com o anticorpo anti- α -tubulina que reconhece um polipeptídeo de 50 kDa e para (B) e (C) usando gel de proteína total (pós-transferência) contendo 20 μ g corado com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas.

5.3.3 Efeito do Inibidor BSO no Crescimento das Formas Promastigotas de *L. guyanensis* e *L. infantum*

A incubação com o inibidor específico *L*-buthionina-sulfoximina (BSO) foi realizado para verificar se o aumento de expressão de GCS correspondia ao aumento de atividade dessa enzima. Assim, as linhagens de *L. guyanensis* e *L. infantum* selvagens e clones superexpressores de GCS foram crescidas na presença de diferentes concentrações de BSO.

Para todas as linhagens analisadas, maiores índices de inibição do crescimento foram obtidos com maiores concentrações de BSO (Figura 23 A e B). Porém, para inibir o crescimento das linhagens superexpressoras de GCS (*LgGCS* c3 e *LiGCS* c2) em uma mesma porcentagem à observada para as linhagens selvagens, foram necessárias concentrações mais altas de BSO (Figura 23 A e B). Esse resultado confirma que a superexpressão de GCS contém enzimas ativas. A linhagem superexpressora de GCS (*LgGCS* c3) foi pelo menos 3 vezes mais resistente ao BSO (IC_{50} do BSO > 30 mM) do que a linhagem selvagem *LgWT* (IC_{50} do BSO de 10 mM). Não foi possível calcular o valor exato do IC_{50} do BSO, uma vez que ele não pode ser diluído em concentrações altas (maiores que 250 mM), o que impede seu uso em concentrações necessárias nos experimentos. Para *L. infantum*, o IC_{50} do BSO obtido para *LiWT* foi 4 mM e para *LiGCS* c2 foi de 33,5 mM, cerca de 8,3 vezes maior do que o observado para a linhagem selvagem.

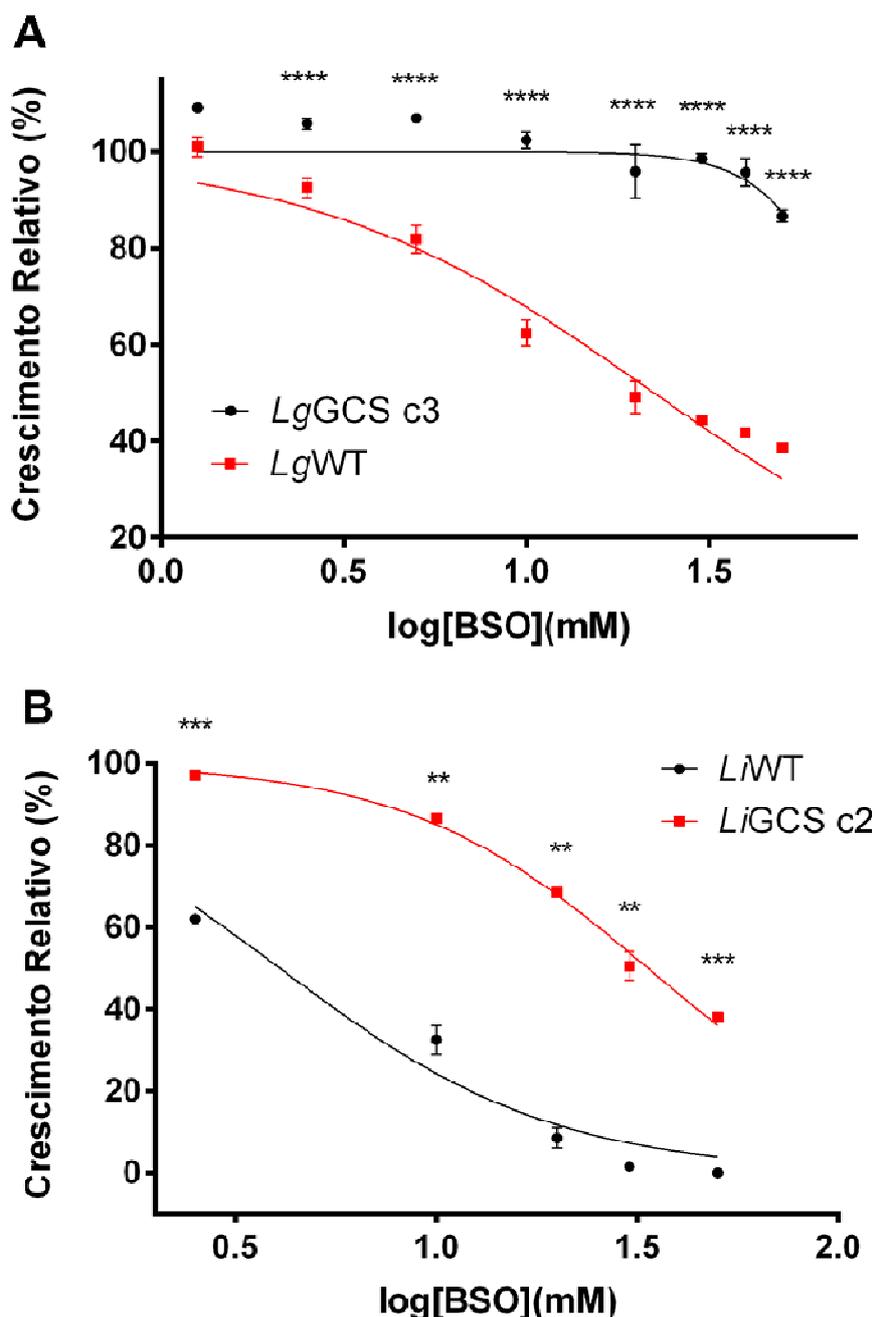


Figura 21 – Curva de crescimento de (A) *L. guyanensis* selvagem (*LgWT*) e transfectada com o gene *gcs* (*LgGCS c3*) e (B) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) selvagem (*LWT*) e transfectada com o gene *gcs* (*LiGCS c2*) na presença de BSO. Os parasitos foram incubados com crescentes concentrações de BSO (1,25 a 50 mM) por 48 h. O crescimento dos parasitos foi quantificado em contador de partículas Z1 Coulter Counter. Os valores médios e o desvio padrão de (A) dois experimentos independentes e (B) um experimento são demonstrados. Para análise estatística foi utilizado o ANOVA *one-way* usando o programa GraphPad Prism 6.0. Asteriscos representados pelos valores de *p*: * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3.4 Teste de Susceptibilidade de Linhagens Superexpressoras de GCS ao SbIII

Após a confirmação da superexpressão e atividade da enzima GCS pela utilização do inibidor BSO, os clones superexpressores foram então submetidos ao teste de susceptibilidade ao SbIII. Para isso, os parasitos selvagens, transfectados com o vetor vazio e os superexpressores de GCS tiveram seus crescimentos avaliados na presença de diferentes concentrações de SbIII.

A superexpressão de GCS em *L. guyanensis* e *L. braziliensis* foi capaz de gerar resistência ao SbIII (Figura 24 A e B). O IC₅₀ do SbIII dos clones superexpressores de GCS de *L. guyanensis*, *LgGCS* c3 (87,9 µM) e c19 (111,2 µM) foram, respectivamente, 3,4 e 4,3 vezes maiores do que o IC₅₀ de SbIII para *LgWT* (25,9 µM).

Para a espécie *L. braziliensis*, a superexpressão de GCS aumentou em torno de 2,3 e 2,5 vezes a resistência ao SbIII (Figura 24 B). Os IC₅₀ dos clones superexpressores de GCS (*LbGCS* c8 e *LbGCS* c18) foram 11,22 µM e 10,41 µM, respectivamente e o IC₅₀ da linhagem selvagem *LbWT* foi 4,47 µM (Tabela 10). Nos ensaios de *Western Blot*, *L. braziliensis* foi a espécie que apresentou maior taxa de superexpressão de GCS entre as três espécies transfectadas. Porém, o aumento de resistência ao SbIII foi em torno de 2 vezes, valor menor do que aquele obtido para os clones superexpressores de GCS de *L. guyanensis* (3,4 e 4,3). Os superexpressores de *L. infantum* também obtiveram grande aumento na expressão de GCS (cerca de 20 vezes), porém a superexpressão de GCS não alterou o fenótipo de susceptibilidade ao SbIII (Figura 24 C). Para *LWT*, o IC₅₀ apresentado foi 258,1 µM, muito similar aos valores obtidos para os clones superexpressores de GCS (*LiGCS* c2 e c4) que foram 259 µM e 257,5 µM, respectivamente (Tabela 10).

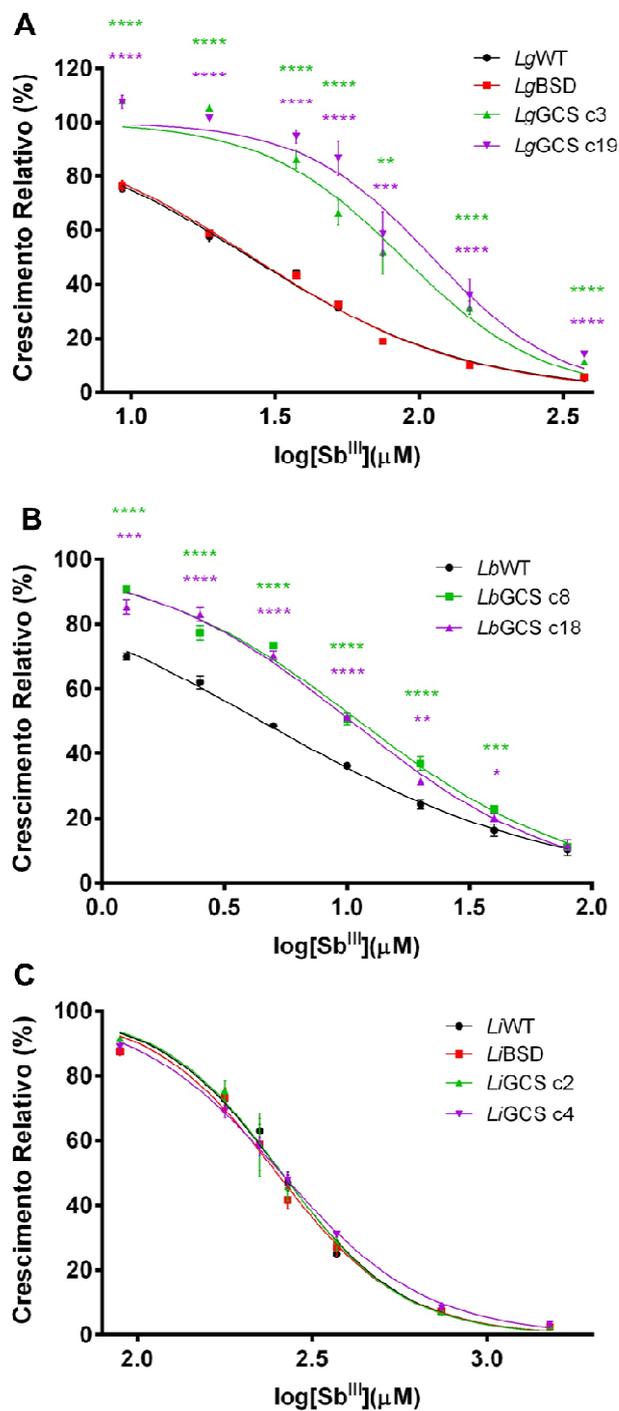


Figura 22 – Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) ao SbIII. Os ensaios foram realizados para todas as espécies usando as linhagens selvagens - (A) LgWT, (B) LbWT e (C) LiWT, transfetadas com o vetor sem o inserto - (A) LgBSD e (C) LiBSD e transfetadas com o gene *gcs* - (A) LgGCS c3 e c19; (B) LbGCS c8 e c18 e (C) LiGCS c2 e c4. Os parasitos foram incubados na presença de SbIII (1,17 a 1497,3 μM) por 48 horas e as porcentagens do crescimento dos parasitos foram determinadas usando Z1 Coulter Counter. Valores médios e desvio padrão de três experimentos independentes estão mostrados. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Tabela 10 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), superexpressoras de GCS de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) em relação à expressão de GCS e susceptibilidade ao SbIII.

Linhagem	Índice de aumento de expressão Western Blot (Clone/WT)	IC ₅₀ SbIII (µM) (Intervalo de Confiança)	Teste t	Índice de Resistencia (Clone/WT)
<i>Lg</i> WT	-	25,93 (24,45 to 27,51)	-	-
<i>Lg</i> BSD	1,0	26,44 (25,08 to 27,86)	N.s. $p=0,3372$	1,01
<i>Lg</i> GCS c3	2,2	87,93 (75,64 to 101,8)	** $p=0,0065$	3,4
<i>Lg</i> GCS c19	2,3	111,2 (92,93 to 133,1)	* $p=0,0431$	4,3
<i>Lb</i> WT	-	4,47 (4,142 to 4,840)	-	-
<i>Lb</i> GCS c8	41,5	11,22 (10,29 to 12,24)	** $p=0,0030$	2,5
<i>Lb</i> GCS c18	45,1	10,41 (9,586 to 11,30)	*** $p=0,0003$	2,3
<i>L</i> WT	-	258,1 (247,8 to 268,9)	-	-
<i>Li</i> BSD	1,0	250,3 (235,6 to 265,9)	n.d.	0,97
<i>Li</i> GCS c2	23,8	259,0 (242,7 to 276,3)	n.d.	1
<i>Li</i> GCS c4	24,0	257,5 (247,5 to 267,9)	n.d.	1

N.s.= Não Significativo
n.d.=Não Determinado

5.3.5 Teste de Susceptibilidade de Linhagens Superexpressoras de GCS ao SbIII na presença de BSO

Com o intuito de verificar o efeito do inibidor BSO no fenótipo de resistência ao SbIII, linhagens de *L. guyanensis* selvagem e superexpressora de GCS, foram submetidas ao teste de susceptibilidade ao SbIII na presença ou ausência de BSO.

O pré-tratamento com BSO (10 mM) fez com que o crescimento da linhagem selvagem *Lg*WT na ausência de SbIII fosse reduzido em aproximadamente 30 % e

enquanto que o clone superexpressor *LgGCS c3* não alterou o crescimento na presença de 10 mM desse inibidor (Figura 25).

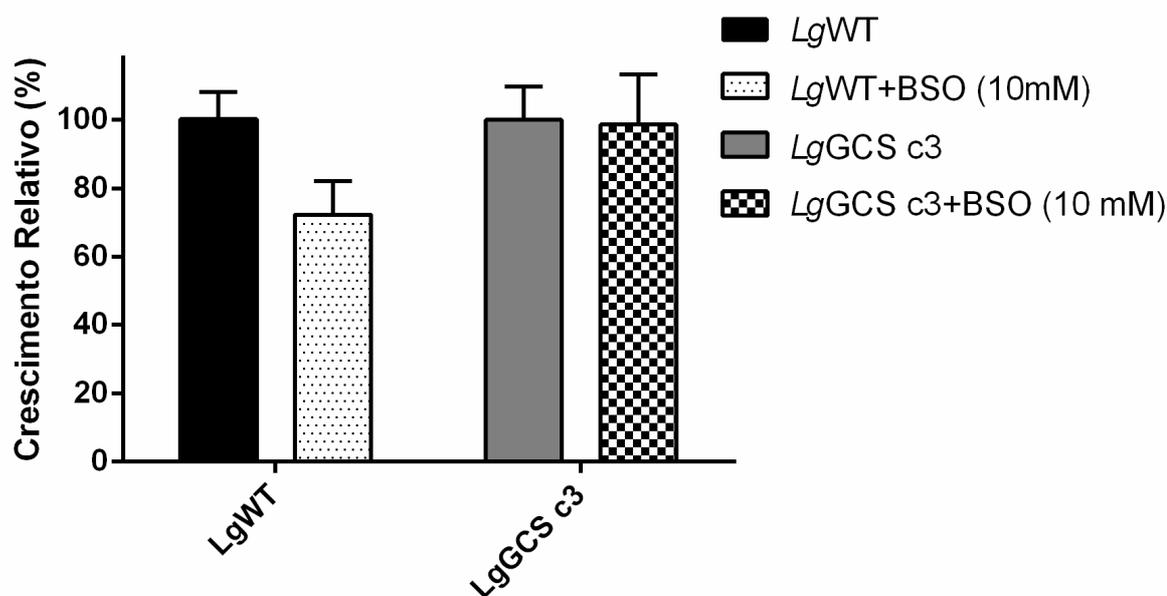


Figura 23 – Efeito do inibidor BSO (10 mM) no crescimento de *L. guyanensis* selvagem (*LgWT*) e transfectada com o gene *gcs* (*LgGCS c3*). Formas promastigotas de *LgWT* e de *LgGCS c3* foram incubados ou não com BSO (10 mM) por 48 h. Após esse tempo, o crescimento dos parasitos foi quantificado em contador de partículas Z1 Coulter Counter. Os valores médios e o desvio padrão de três experimentos independentes são demonstrados.

Na presença de SbIII e BSO, o crescimento da linhagem selvagem foi praticamente nulo, permanecendo em torno de 20 % independentemente da concentração de SbIII utilizada. Já a incubação de BSO e SbIII em conjunto, reduziu o crescimento de *LgGCS c3*, porém em percentuais bem menores do que essa mesma combinação reduziu no crescimento de *LgWT*. Na maior concentração de SbIII utilizada (794,9 μ M), *LgGCS c3* ainda permaneceu com um crescimento 2 vezes maior do que *LgWT* (Figura 26). O pré-tratamento com BSO e a posterior incubação com SbIII, aumentou em 20 vezes a susceptibilidade de *LgWT* ao SbIII e em 4,1 vezes a susceptibilidade do clone superexpressor de GCS *LgGCS c3* (Tabela 11). Dessa forma, a inibição farmacológica de GCS foi capaz de sensibilizar tanto a linhagem superexpressora de GCS quanto selvagem à ação do SbIII,

demonstrando que em *L. guyanensis*, o aumento de GCS está diretamente envolvido no fenótipo de resistência ao SbIII.

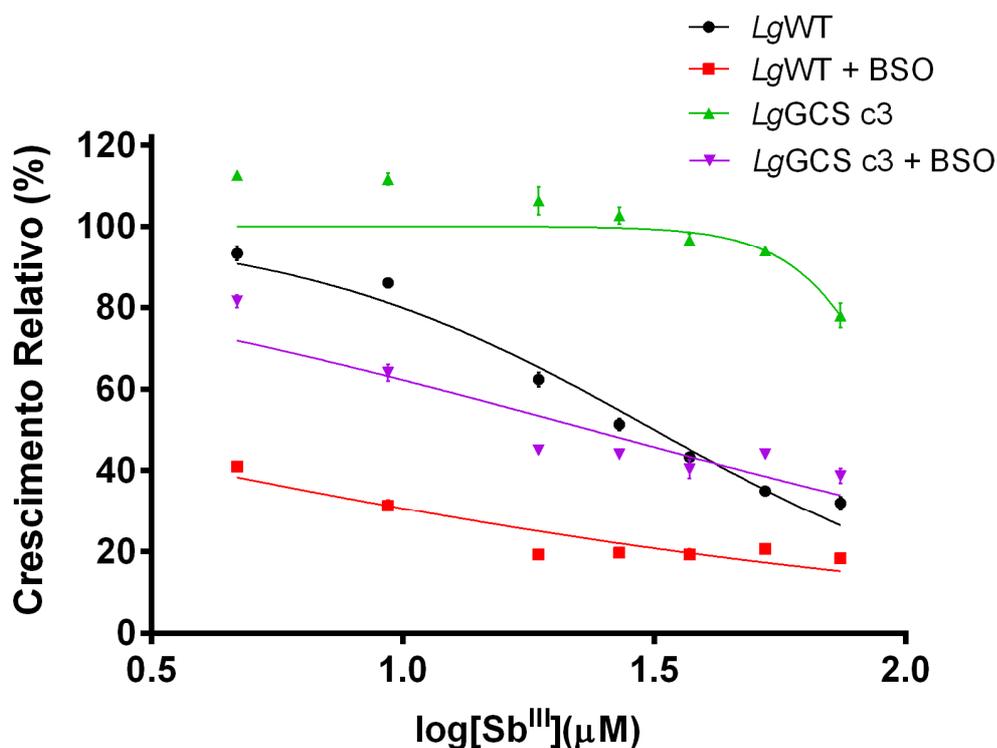


Figura 24 – Efeito do inibidor BSO no fenótipo de resistência ao SbIII de *L. guyanensis* transfectada com o gene *gcs*. Formas promastigotas de *LgWT* e de *LgGCS c3* foram pré-incubados ou não com BSO (10 mM) por 24 h. Após esse tempo, os parasitos foram incubados com crescentes concentrações de SbIII por mais 24 h (4,7 a 74,9 μM). O crescimento dos parasitos foi quantificado em contador de partículas Z1 Coulter Counter. Os valores médios e o desvio padrão de três experimentos independentes são demonstrados.

Tabela 11 – IC₅₀ do BSO e do SbIII em linhagens de *L. guyanensis* pré-tratadas ou não com BSO.

Linhagem	IC ₅₀ BSO (mM)	Índice de resistência BSO	IC ₅₀ SbIII (μM) 24 h	IC ₅₀ SbIII (μM) na presença de BSO (10mM) 24 h	Índice de sensibilidade ao SbIII
<i>LgWT</i>	10	-	32,4	1,6	20
<i>LgGCS c3</i>	> 30	> 3,0	99,3	24	4,1

5.3.6 Efeito da combinação de baixas concentrações de SbIII e BSO no crescimento de *L. guyanensis* Selvagem e Superexpressora de GCS

Adicionalmente ao teste de susceptibilidade ao SbIII na presença de BSO foi realizado um teste de susceptibilidade usando concentrações baixas de SbIII e BSO para verificar o efeito combinado dessas drogas no crescimento de *L. guyanensis* selvagem e superexpressora de GCS.

Quando administrado separadamente, o SbIII (9,3 μ M) reduziu em apenas cerca de 22 e 15 % o crescimento das linhagens selvagem e transfectada com GCS, respectivamente. O BSO individualmente, quando utilizado na concentração de 5 mM, inibiu o crescimento de *LgWT* em 20 % e não alterou o crescimento de *LgGCS c3*. Quando utilizado na concentração de 15 mM, o BSO diminuiu em 6 % o crescimento de *LgGCS c3*. A administração conjunta de SbIII (9,3 μ M) e BSO à 5 mM, reduziram 88 % o crescimento de *LgWT* e 45 % o crescimento da linhagem superexpressora *LgGCS c3*. Já quando *LgGCS c3* foi incubada em conjunto com SbIII e uma concentração 3 vezes maior de BSO (15 mM), a redução no crescimento passou de 45 para 73% (Figura 27). No entanto, mesmo com uma concentração 3 vezes maior de BSO (15 mM), a linhagem superexpressora de GCS cresceu mais do que sua respectiva linhagem selvagem tratada apenas com 5mM de BSO. Esse resultado ressalta a importância da atividade de GCS na resistência ao SbIII e reforça que o efeito aditivo de SbIII e BSO pode contribuir para a eliminação de *L. guyanensis* com o uso de concentrações menores de ambas as drogas.

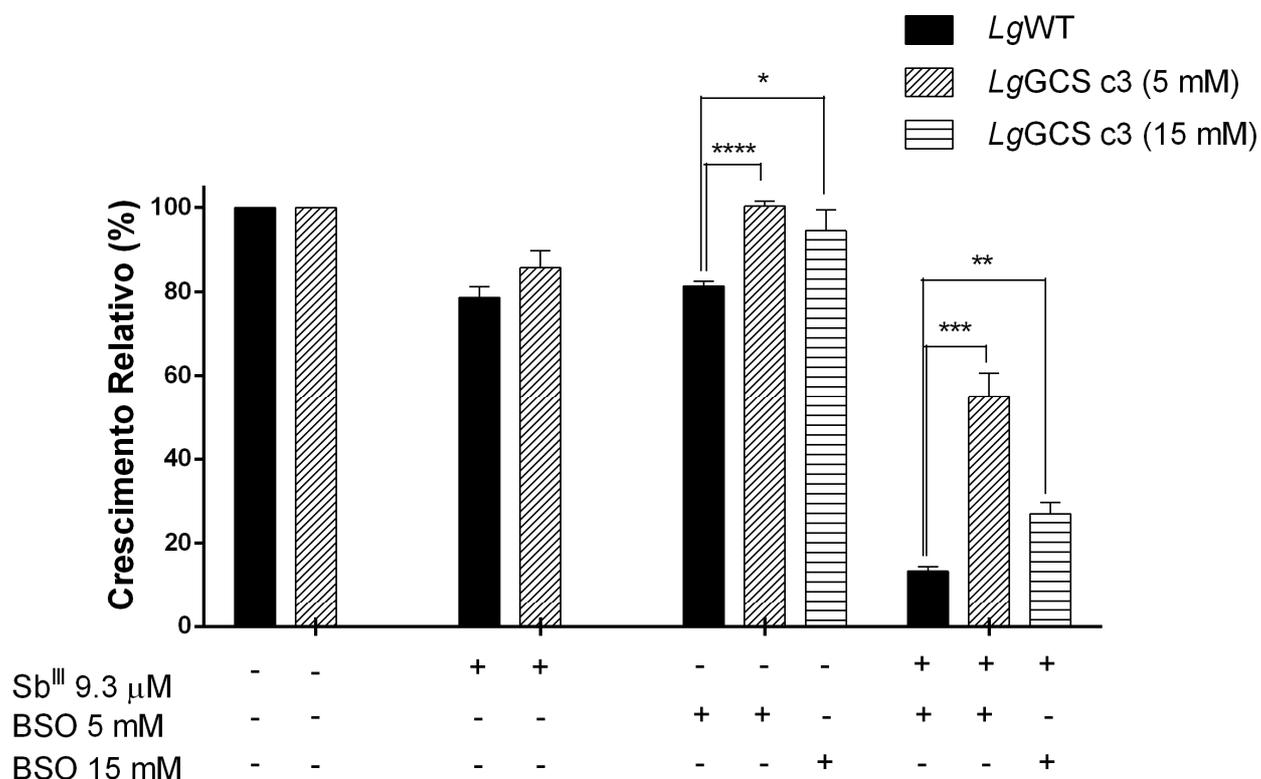


Figura 25 – Efeito do BSO no crescimento de *L. guyanensis* selvagem e superexpressora de GCS tratadas com concentrações subletais de SbIII. Formas promastigotas (2×10^6 parasitos/mL) em fase log de crescimento foram semeadas em placas de 24 poços contendo meio M199. Os parasitos foram expostos ou não ao SbIII (9,3 μM) sozinho ou com 5 mM (para *LgWT* e *LgGCS c3*) ou 15 mM (*LgGCS c3*) de BSO. A incubação foi realizada por 48 horas. O crescimento dos parasitos foi quantificado em contador de partículas Z1 Coulter Counter. Os valores médios e o desvio padrão de três experimentos independentes são demonstrados. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de student usando o programa GraphPad Prism 6.0. Asteriscos representados pelos valores de *p*: * *p*=0,0173; ** *p*<0,01; *** *p*<0,001; **** *p*<0,0001.

5.4 Tripanotona Sintetase (TryS)

5.4.1 Amplificação, Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de TryS

A partir do DNA genômico de *L. braziliensis* M2904 e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) PP75, a sequência codificante de TryS foi amplificada. Tanto em *L. braziliensis* M2904 quanto em *L. infantum* JPCM 5, TryS possui 1959 pb. O

fragmento amplificado a partir do DNA de *L. braziliensis* e *L. infantum*, usando pares iniciadores específicos para cada espécie, gerou uma banda única em cada reação e com os tamanhos esperados de aproximadamente 2000 pb (Figura 28).

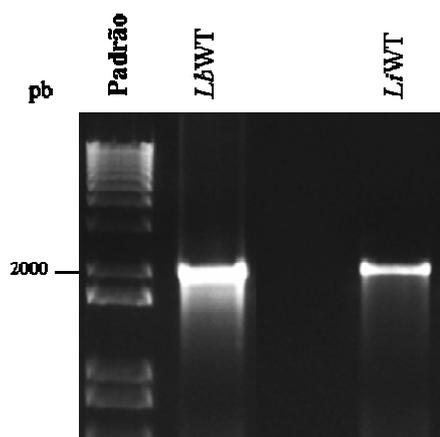


Figura 26 – Amplificação da região codificante completa do gene da Tripanotina Sintetase a partir do DNA genômico de *L. braziliensis* M2904 (*LbWT*) e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) PP75 (*LfWT*). Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de PCR corado com GelRed®. Uma banda única correspondendo ao gene *trys* com aproximadamente 1959 pb pode ser observada. Padrão: Padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

O produto amplificado de ambas espécies foi ligado ao vetor pGEMTeasy e transformado em bactéria *E. coli* TOP10F'. Após a transformação, quatro colônias contendo plasmídeos clonados com o gene *trys* de cada espécie foram encaminhadas para o sequenciamento.

A sequência nucleotídica e de aminoácidos do gene *trys* de *L. braziliensis* M2904 apresentou 100 % de similaridade e cobertura quando comparada com a sequência de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.27.2010*) do banco de dados (Apêndice IX e X) (Tabela 12). Esse resultado era esperado uma vez que o DNA utilizado como molde na PCR é da mesma cepa de *L. braziliensis* sequenciada e disponível no banco de dados. Já a sequência amplificada do DNA de *L. infantum* PP75, ao ser alinhada com a sequência TryS de *L. infantum* JPCM5 (*LinJ.27.1770*) do Velho Mundo, apresentou similaridade e cobertura de 99 e 100 %, respectivamente, para ambas sequências nucleotídica e de aminoácidos. Na sequência nucleotídica houve apenas uma troca na posição 65 que culminou em uma troca na sequência de um aminoácido na posição 22 (Apêndice XI e XII) (Tabela 12).

Tabela 12 – Identidade, cobertura e diferenças entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos de TryS de *L.braziliensis* e *L. infantum* quando comparada às sequências referências do *Tritypdb.org*.

Sequência Amplificada	Sequências Referência (tritypdb.org)			
	<i>L.braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)		<i>L. infantum</i> JPCM 5 (MCAN/ES/98/LLM-877)	
	Sequência nucleotídica	Sequência de aminoácidos	Sequência nucleotídica	Sequência de aminoácidos
Tripanotona Sintetase <i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)	Identidade 100% Cobertura 100%	Identidade 100% Cobertura 100%	Não se aplica	Não se aplica
Tripanotona Sintetase <i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i>) (MHOM/BR/74/PP75)	Não se aplica	Não se aplica	Identidade 99% Cobertura 100% Posição da Diferença 65=T por C	Identidade 99% Cobertura 100% Posição da Diferença 22= V por A

Diferenças: posição na sequência (separadas por traço)=nucleotídeo de *L. infantum* JPCM5 POR nucleotídeo *L. infantum* PP75

Abreviações da Sequência Nucleotídica: C=citosina; T=timina; A=adenina; G=guanina.

Abreviações da Sequência de Aminoácidos: G=glicina; A=alanina; L=leucina; V=valina; I=isoleucina; P=prolina; F=fenilalanina; S=serina; T=treonina; C=cisteína; Y=Tirosina; N=asparagina; Q=glutamina; D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico; R=arginina; K=lisina; H=histidina; W=triptofano; M=metionina.

Com a confirmação de que o produto amplificado correspondia ao gene *trys* para ambas as espécies, esses fragmentos foram ligados, individualmente, ao vetor de expressão em *Leishmania* pIR1-BSD. A seleção da construção foi obtida com sucesso apenas para ligação com a sequência do gene *trys* de *L. infantum*. Dessa forma, essa construção foi linearizada e transfectada em formas promastigotas de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Após 24 horas da transfecção, os parasitos transfectados foram plaqueados em meio M199 semi-sólido contendo a droga de seleção blasticidina. Os clones selecionados foram submetidos à PCR com iniciadores específicos para o gene *bsd* e os resultados mostraram que todos os clones selecionados apresentaram amplificação de uma banda de 399 pb correspondente à amplificação do gene *bsd* (Figura 29).

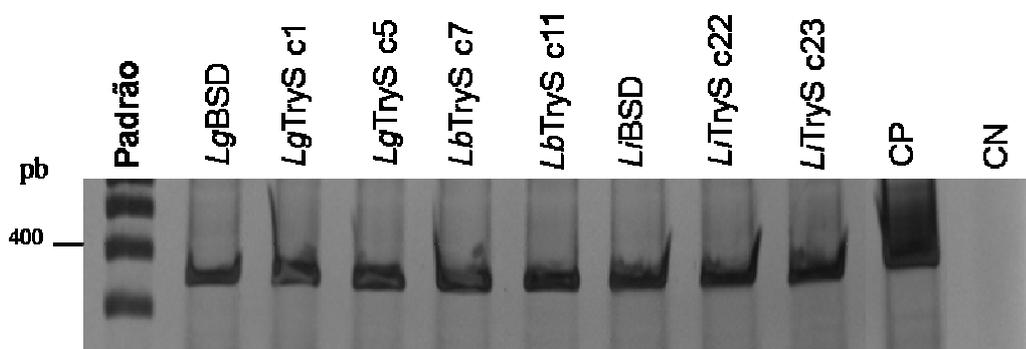


Figura 27 – Amplificação do gene *bsd* nos clones de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-LiTryS. Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida 6 % corado com nitrato de prata. Em todos os géis é possível observar o fragmento de 399 pb, indicando a presença do gene que confere resistência à blasticidina. Como controle positivo foi utilizado 10 ng de plasmídeo pIR1-BSD purificado.

5.4.2 Nível de Expressão de TryS nos Clones Transfectados

Ensaio de *Western Blot* utilizando proteína total solúvel de parasitos selvagem e transfectadas com o gene *trys* foram realizados para avaliar o nível de expressão de TryS. O anticorpo policlonal anti-LiTryS utilizado nos ensaios reconheceu em todas as amostras um polipeptídeo de aproximadamente 74 kDa, correspondente a massa molecular de tamanho esperado (Figura 30 A, B e C).

As linhagens de *L. guyanensis* transfectadas com o gene *trys*, clones LgTryS c1 e c5, tiveram um aumento na expressão de TryS de 1,4 vezes, quando comparados com a expressão da linhagem selvagem dessa espécie (Figura 30 A). Em *L. braziliensis*, os níveis de expressão de TryS para os clones 7 (LbTryS c7) e 11 (LbTryS c11) foram 15,7 e 14,3 vezes maiores, respectivamente, quando comparados à linhagem selvagem, LbWT (Figura 30 B). Os níveis de expressão obtidos para *L. infantum* transfectada com o gene *trys* (clones LiTryS c22 e c23) foram 1,3 e 1,7 vezes maiores quando comparados ao controle selvagem LWT (Figura 30 C).

Mais uma vez, esses resultados, assim como para a expressão do gene *odc* e *gcs*, permitem observar que a superexpressão de TryS variou em cada uma das espécies, sendo espécie-dependente, ainda que com a utilização da mesma construção

em todas as transfecções (Figura 30 A, B e C). As espécies *L. guyanensis* e *L. infantum*, apresentaram índices de aumento de expressão semelhantes, cerca de 1,5 vezes, enquanto que *L. braziliensis* obteve um aumento médio de 15 vezes.

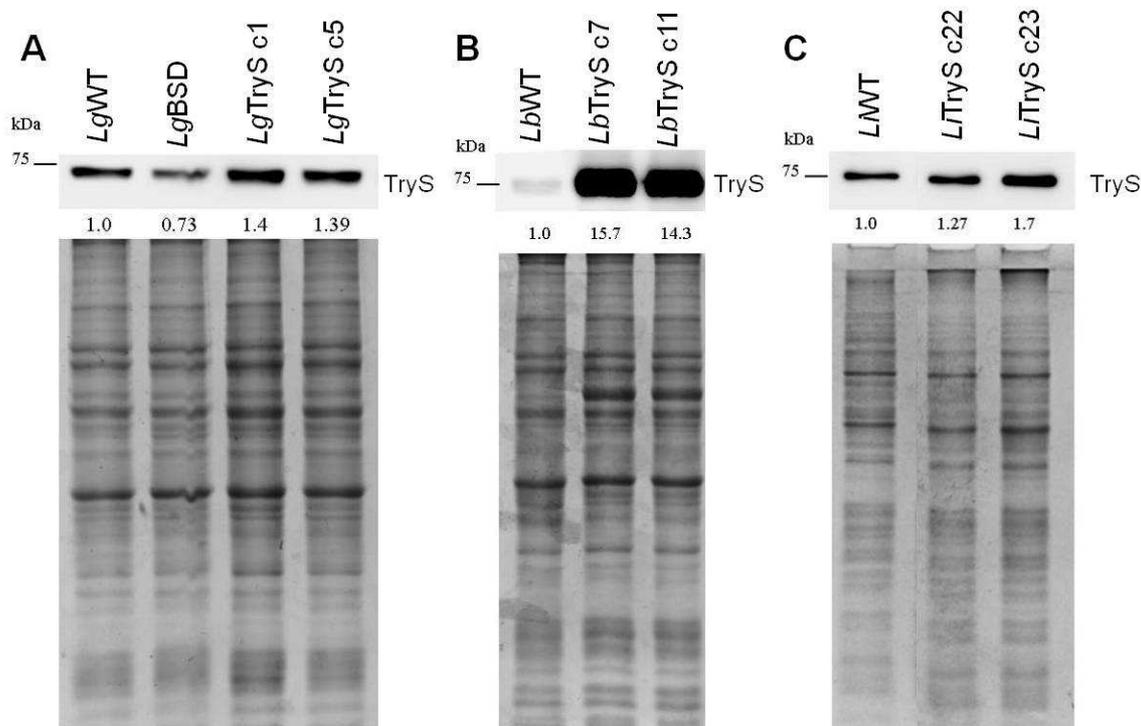


Figura 28 – Nível de expressão de Tripanotona Sintetase em (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*). Nesse estudo foram analisadas para todas as espécies, as linhagens selvagens - (A) *LgWT*, (B) *LbWT* e (C) *LmWT*, transfectadas com o vetor sem o inserto - (A) *LgBSD*, e transfectadas com o gene *gcs* - (A) *LgTryS c1* e *c5*; (B) *LbTryS c7* e *c11* e (C) *LiTryS c22* e *c23*. As proteínas totais (20 µg) foram separadas em gel de poliácridamida 12 % e transferidas para membranas de nitrocelulose. Um polipeptídeo de aproximadamente 74 kDa foi reconhecido pelo anticorpo anti-*LiTryS* em todas as amostras. A normalização foi realizada usando gel de proteína total (pós-transferência) contendo 20 µg corado com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas.

5.4.3 Teste de Susceptibilidade ao SbIII em Linhagens Superexpressoras de TryS

Após a confirmação do aumento de expressão de TryS nos clones transfectados, as linhagens selvagens e transfectadas com *trys* foram submetidas à ensaio de susceptibilidade ao SbIII. As curvas de susceptibilidade ao SbIII para as três espécies demonstraram que há pouca alteração no fenótipo de susceptibilidade

ao SbIII (Figura 31 A, B e C). Em *L. guyanensis* e *L. infantum* a superexpressão de TryS apresentou um discreto aumento de aproximadamente 1,3 e 2,0 vezes, respectivamente, na resistência ao SbIII comparado com os respectivos pares selvagens (Tabela 13). Por outro lado, em *L. braziliensis* a superexpressão de TryS diminuiu a resistência ao SbIII em aproximadamente 2,5 vezes. Os valores de IC₅₀ do SbIII obtidos para cada linhagem estão descritos na Tabela 13. Análise estatística dos dados mostrou diferença significativa entre os valores de IC₅₀ obtidos para os clones de *L. braziliensis* e *L. infantum*.

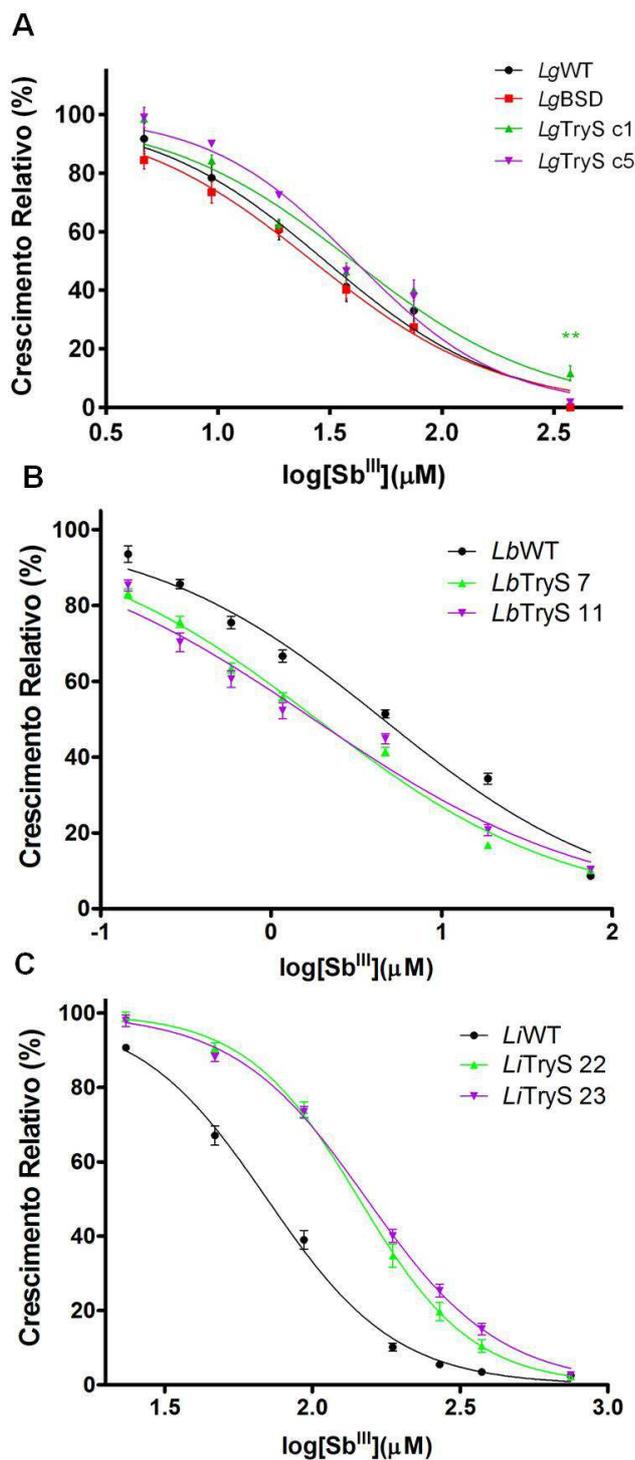


Figura 29 – Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) ao SbIII. Os ensaios foram realizados para todas as espécies usando as linhagens selvagens - (A) *Lg*WT, (B) *Lb*WT e (C) *Li*WT, transfectadas com o vetor sem o inserto - (A) *Lg*BSD, e transfectadas com o gene *trys* - (A) *Lg*TryS c1 e c5; (B) *Lb*TryS c7 e c11 e (C) *Li*TryS c22 e c23. Os parasitos foram incubados na presença de SbIII (1,17 a 748,65 μM) por 48 horas e as porcentagens do crescimento dos parasitos foram determinadas usando Z1 Coulter Counter. Valores médios e desvio padrão de três experimentos independentes estão mostrados. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Tabela 13 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), superexpressoras de TryS de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) em relação à expressão de TryS e susceptibilidade ao SbIII.

Linhagem	Índice de aumento de expressão Western Blot (Clone/WT)	IC ₅₀ SbIII (µM) (Intervalo de Confiança)	Teste t	Índice de Resistencia (Clone/WT)
LgWT	-	30,17 (25,01 to 36,39)	-	-
LgBSD	0,73	26,42 (23,49 to 29,72)	N.s. $p=0,5284$	0,87
LgTryS c1	1,4	40,08 (34,51 to 46,55)	N.s. $p=0,2659$	1,3
LgTryS c5	1,4	40,83 (36,17 to 46,08)	N.s. $p=0,1405$	1,35
LbWT	-	4,534 (4,015 to 5,121)	-	-
LbTryS c7	15,7	1,854 (1,698 to 2,025)	** $p=0,0010$	0,4
LbTryS c11	14,3	1,776 (1,525 to 2,069)	** $p=0,0013$	0,4
LWT	-	70,26 (67,24 to 73,42)	-	-
LITryS c22	1,3	143,9 (137,1 to 151,0)	*** $p=0,0005$	2,0
LITryS c23	1,7	152,7 (146,9 to 158,6)	*** $p=0,0001$	2,2

N.s.= Não Significativo

5.5 Tripanotiona Redutase (TR)

5.5.1 Amplificação, Sequenciamento, Transfecção Estável e Seleção de Clones Superexpressores de TR

A amplificação de um fragmento único de aproximadamente 1500 pb correspondendo ao gene *tr* (1457 pb) foi realizado a partir de iniciadores específicos usando como molde o DNA genômico de *L. braziliensis* M2904 (Figura 32).

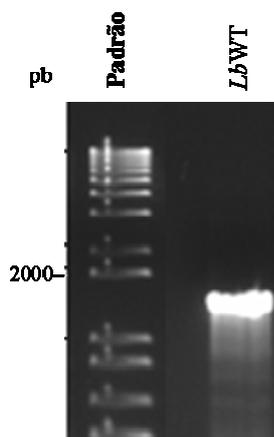


Figura 30 – Amplificação da região codificante completa do gene da Tripanotina Redutase a partir do DNA genômico de *L. braziliensis* M2904. Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de PCR corado com GelRed®. Uma banda de aproximadamente 1500 pb de maior intensidade correspondendo ao gene *tr* pode ser observada. A região codificante do gene *tr* possui 1457 pb. Padrão: Padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Promega).

O produto amplificado de 1457 pb do gene *tr* foi inserido no vetor pGEMTeasy e transformado em bactéria *E. coli* TOP10F'. Após a transformação, quatro colônias contendo plasmídeos clonados com o gene *tr* foram sequenciados. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos de TR apresentaram 100 % de similaridade e cobertura comparada com as sequências de *L. braziliensis* M2904 (*LbrM.05.0350*) depositada no banco de dados (tritypdb.org) (Apêndice XIII e XIV). Esse resultado confirma a correta sequência do gene *tr* amplificada. Posteriormente, o gene *tr* foi inserido no plasmídeo de transfecção pLR1-BSD, linearizado e a construção foi transfectada em formas promastigotas de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os parasitos transfectados foram plaqueados em meio M199 semi-sólido contendo a droga de seleção BSD. PCR com iniciadores específicos para o gene *bsd* (399 pb) demonstrou um fragmento de aproximadamente 400 pb em todos os clones analisados (Figura 33). A amplificação desse fragmento confirma a presença do plasmídeo nas linhagens de *Leishmania* spp. transfectadas.

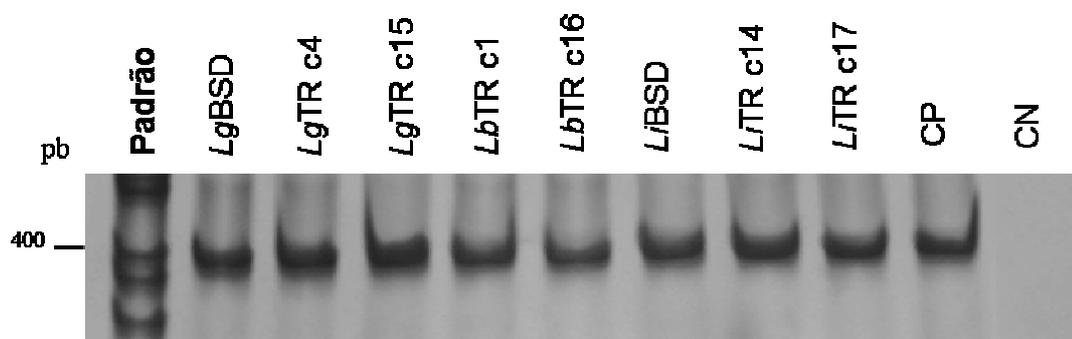


Figura 31 – Amplificação do gene *bsd* nos clones de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) transfectados com pIR1-BSD ou pIR1-BSD-*LbTR*. Os produtos de PCR foram separados em gel de policrilamida 6 % corado com nitrato de prata. Em todos os géis é possível observar o fragmento de 399 pb, indicando a presença do gene que confere resistência à blasticidina. Como controle positivo foi utilização 10 ng de plasmídeo pIR1-BSD purificado.

5.5.2 Nível de Expressão de TR nos Clones Transfectados

Após a confirmação do sucesso da transfecção, os parasitos foram submetidos à ensaios *Western Blot* para verificar se houve aumento no nível de expressão de TR nos parasitos transfectados com o gene *tr*.

A análise da expressão demonstrou que tanto em *L. guyanensis* quanto em *L. braziliensis*, o anticorpo anti-*TcTR* reconheceu além do polipeptídeo de tamanho esperado de 53 kDa, um outro com maior massa molecular (Figura 34 A e B). Esse outro polipeptídeo provavelmente corresponde à uma isoforma de TR presente apenas nos superexpressores. O polipeptídeo de maior massa molecular está mais expresso nas linhagens de *L. guyanensis* e *L. braziliensis* transfectadas com TR, confirmando a superexpressão desse gene nas linhagens analisadas. Já para *L. infantum*, o anticorpo anti-*TcTR* reconheceu apenas um polipeptídeo de tamanho esperado de 53 kDa (Figura 34 C). Os clones de *L. infantum*, superexpressores de TR (clones 14 e 17) apresentaram aumento de expressão da enzima TR cerca de 2 vezes quando comparado à linhagem não transfectada (Figura 34 C). Os controles transfectados apenas com o vetor vazio não variaram os índices de expressão quando comparados à respectiva linhagem parental (Figura 34 A e C).

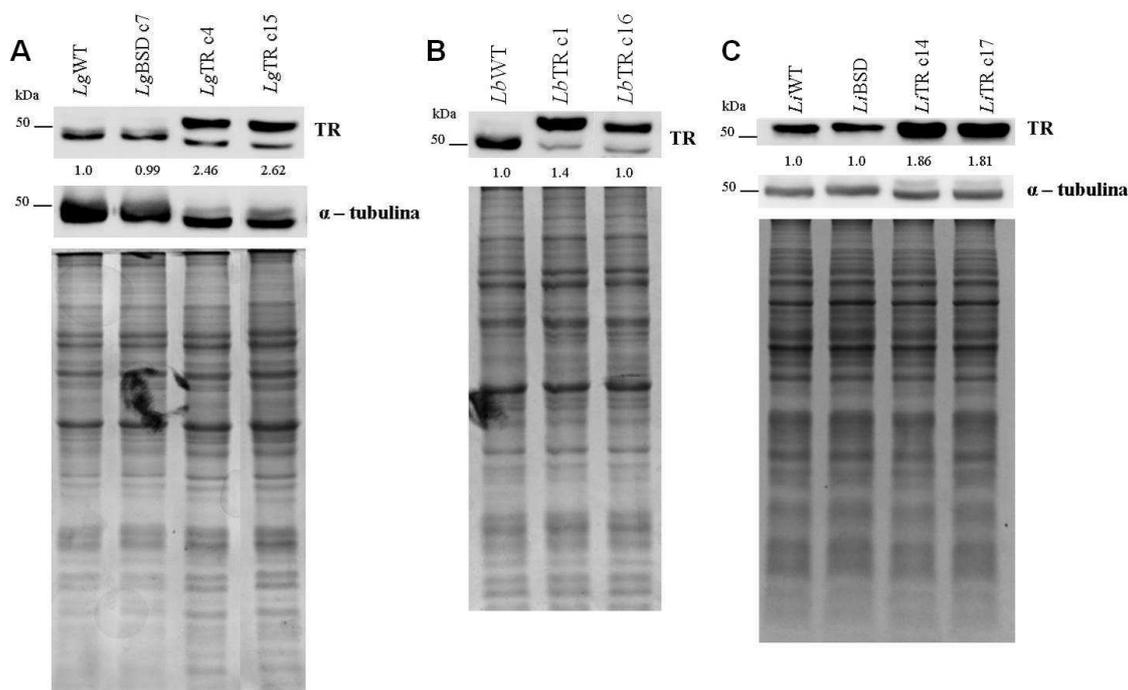


Figura 32 – Nível de expressão de Tripanotiona Redutase em (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*). Neste estudo foram analisadas para todas as espécies, as linhagens selvagens - (A) *LgWT*, (B) *LbWT* e (C) *LfWT*, transfectadas com o vetor sem o inserto - (A) *LgBSD* e (C) *LfBSD*, e transfectadas com o gene *tr* - (A) *LgTR c4* e *c15*; (B) *LbTR c1* e *c16* e (C) *LfTR c14* e *c17*. As proteínas totais (20 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida 12 % transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-*TcTR*. A normalização foi realizada usando gel de proteína total (pós-transferência) contendo 20 µg corado com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas usando o programa CP Atlas.

Na tentativa de confirmar a expressão de isoformas de TR nas linhagens de *L. guyanensis* e de *L. braziliensis* transfectadas foram realizados ensaios de eletroforese bi-dimensional (2D) e *Western Blot* (Apêndice XV e XVI). Apesar de diferenças serem observadas entre as linhagens selvagens e transfectadas com TR, nenhum resultado confirmou a expressão de isoformas de TR. Dessa forma, a identificação por Espectrometria de Massas deve ser realizada nos spots diferencialmente expressos para confirmar a presença de isoformas de TR nos clones superexpressores de *L. guyanensis* e *L. braziliensis*.

5.5.3 Teste de Susceptibilidade ao SbIII em Linhagens Superexpressoras de TR

Uma vez confirmado o aumento de expressão de TR nos clones transfectados, as linhagens selvagem e transfectadas com TR foram submetidas ao teste de susceptibilidade ao SbIII.

A superexpressão de TR em *L. guyanensis* não gerou nenhuma modificação no fenótipo de susceptibilidade ao SbIII nos clones analisados (Figura 35 A). Os valores de IC₅₀ do SbIII para os controles foram similares aos dos clones transfectados com o gene *tr* (Tabela 14). O IC₅₀ do SbIII para os controles *LgWT* e *LgBSD* foram de 30,17 e 26,42 µM, respectivamente. Já para os clones superexpressores de TR dessa espécie, o IC₅₀ foi praticamente idêntico ao da linhagem selvagem, sendo de 30,72 e 29,34 µM para *LgTR c4* e *c15*, respectivamente (Tabela 14).

Em *L. braziliensis*, apenas um dos clones superexpressores de TR (clone 16), apresentou aumento de 4,1 vezes na resistência ao SbIII, apresentando IC₅₀ de 22,22 µM enquanto o IC₅₀ da linhagem selvagem (*LbWT*) foi de 5,4 µM (Figura 35 B). O outro clone superexpressor de TR (clone 1) apresentou valor de IC₅₀ de 5,4 µM, igual ao da linhagem selvagem (Tabela 14). Análise de atividade da enzima TR desses clones serão futuramente determinadas para melhor explicar essa diferença de susceptibilidade ao SbIII.

Os clones de *L. infantum* superexpressores de TR (*c 14* e *17*) se mostraram 1,3 e 1,4 vezes mais resistentes ao tratamento com SbIII, respectivamente, quando comparados aos parasitos controles selvagem e transfectado com o vetor vazio (Figura 35 C). Os valores de IC₅₀ do SbIII dos clones *LiTR c14* e *c17* foram 218,6 e 220,9 µM, respectivamente. Já o IC₅₀ dos controles *LiWT* e *LiBSD* foram 162,5 e 160,1 µM, respectivamente (Tabela 14).

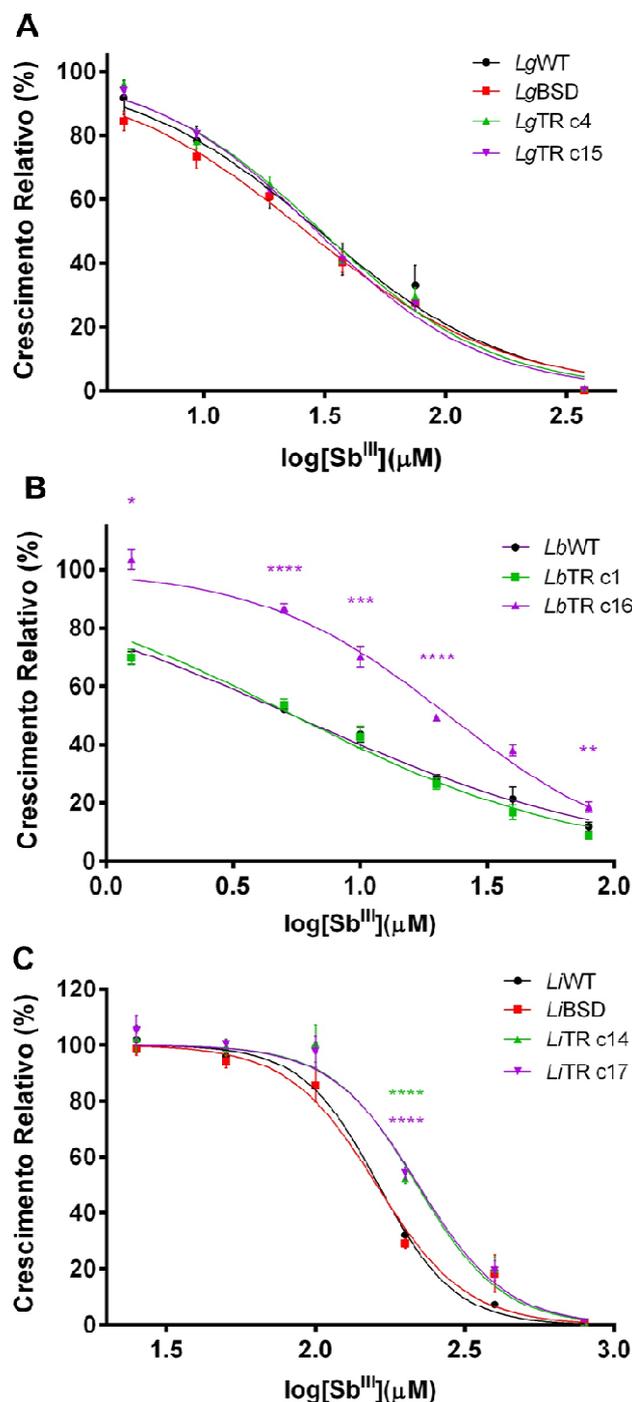


Figura 33 – Susceptibilidade de formas promastigotas de (A) *L. guyanensis*, (B) *L. braziliensis* e (C) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) ao SbIII. Os ensaios foram realizados para todas as espécies usando as linhagens selvagem - (A) *Lg*WT, (B) *Lb*WT e (C) *L*WT, transfectadas com o vetor sem o inserto - (A) *Lg*BSD e (C) *L*iBSD, e transfectadas com o gene *tr* - (A) *Lg*TR c4 e c15; (B) *Lb*TR c1 e c16 e (C) *L*TR c14 e c17. Os parasitos foram incubados com SbIII (1,17 a 748,65 μM) por 48 horas e as porcentagens do crescimento dos parasitos foram determinadas usando Z1 Coulter Counter. Valores médios e desvio padrão de três experimentos independentes estão mostrados. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Tabela 14 – Caracterização de linhagens selvagens (WT), superexpressoras de TR de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) em relação à expressão de TR e susceptibilidade ao SbIII.

Linhagem	Índice de aumento de expressão Western Blot (Clone/WT)	IC ₅₀ SbIII (µM) (Intervalo de Confiança)	Teste t	Índice de Resistencia (Clone/WT)
LgWT	1 isoforma	30,17 (25,01 to 36,39)	-	-
LgBSD	1 isoforma	26,42 (23,49 to 29,72)	N.s. $p=0,6509$	0,87
LgTR c4	2 isoformas	30,72 (28,21 to 33,46)	N.s. $p=0,9696$	1
LgTR c15	2 isoformas	29,34 (27,70 to 31,08)	N.s. $p=0,8403$	1
LbWT	1 isoforma	5,431 (4,630 to 6,369)	-	-
LbTR c1	2 isoformas	5,454 (4,671 to 6,369)	N.s. $p=0,9414$	1
LbTR c16	2 isoformas	22,22 (20,06 to 24,61)	*** $p=0,0003$	4,1
LWT	-	162,5 (152,4 to 173,2)	-	-
LiBSD	1,0	160,1 (145,5 to 176,2)	N.s. $p=0,9252$	1
LiTR c14	1,8	218,6 (200,4 to 238,3)	* $p=0,0465$	1,3
LiTR c17	1,8	220,9 (205,0 to 238,0)	* $p=0,0336$	1,4

N.s.= Não Significativo

5.6 Análise da Expressão Global de Enzimas da Via Antioxidante de *Leishmania* spp. em Linhagens Superexpressoras de TryS e TR

Ensaio de *Western Blot* foram realizados no intuito de entender como o aumento de expressão de TryS e TR, em *L. braziliensis* e *L. infantum*, poderiam alterar a expressão de enzimas da defesa antioxidante e enzimas da via de síntese da tripanotona. As enzimas analisadas em ambos superexpressores de TryS e TR foram: Gama-glutamilcisteína Sintetase (enzima da via da glutatona); S-Adenosilmetionina Sintetase (AdoMetS) (enzima da via das poliaminas); Ferro Superóxido Dismutase-A (SOD-A), Triparedoxina (TXN) e Triparedoxina Peroxidase (TXNPx) (todas implicadas no processo de detoxificação de espécies reativas de oxigênio).

5.6.1 Análise de Expressão Global em *L. braziliensis* Superexpressora de TryS e TR

Os resultados do teste de susceptibilidade ao SbIII demonstraram que o aumento da expressão de TryS em *L. braziliensis* levou a um aumento de 1,6 e 1,7 vezes na sensibilidade ao SbIII (Figura 31 C). É interessante ressaltar que a superexpressão de TryS mostrou redução da expressão de TR em mais de 80% (cerca de 4,4 vezes de redução) quando comparada à *LbWT*. Esse resultado mostra que o aumento de TryS, regula negativamente a expressão de TR nesses clones. Enzimas da via de síntese de tripanotiona, GCS e AdoMetS, que atua na síntese de S-Adenosilmetionina, estavam com expressão aumentadas apenas no clone 11 de *L. braziliensis* superexpressor de TryS (*LbTryS c11*). Ambos os clones de *L. braziliensis* superexpressores de TryS não alteraram a expressão das enzimas SOD-A e TXNPx. Por outro lado, a enzima TXN, estava reduzida no clone 7 e praticamente inalterada no clone 11 superexpressor de TryS (Figura 36).

O clone 7 de *L. braziliensis* superexpressor de TryS que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a diminuição da resistência ao SbIII teve redução da expressão das enzimas TR e TXN e não teve alteração na expressão das outras enzimas GCS, AdoMetS, SOD-A e TXNPx analisadas (Tabela 15).

A superexpressão da TR em *L. braziliensis* aumentou a resistência ao SbIII em apenas um dos clones analisados clone 16, sendo que o fenótipo ficou inalterado no clone 1 (Tabela 15). Análise de *Western Blot* mostrou que ambos clones superexpressores de TR tiveram o mesmo perfil de expressão das enzimas analisadas. Eles apresentaram diminuição da expressão de TryS e SOD-A e nenhuma alteração na expressão das outras enzimas analisadas. A superexpressão de TR levou a uma diminuição de TryS de cerca 3,3 e 6 vezes nos clones 1 e 16, respectivamente. É interessante ressaltar que conforme descrito anteriormente, os superexpressores de TryS também reduziram a expressão de TR. Esses resultados em conjunto, indicam que estas duas enzimas são reguladas de maneira oposta. O clone 16 superexpressor de TR apresentou redução de 1,7 vezes na expressão da SOD-A comparado com a linhagem selvagem, enquanto que o clone *LbTR c1*, manteve inalterada a expressão dessa enzima.

A incubação com o anticorpo α -tubulina foi realizado com o intuito de fazer a normalização da membrana e validar os resultados de expressão diferencial obtidos. No entanto, observamos diferenças na expressão dessa proteína de citoesqueleto entre as amostras analisadas. Diante disso, a normalização dos dados de *L. braziliensis* e *L. infantum* foi realizada usando o gel de proteína total corado com Azul de Coomassie (Figura 36).

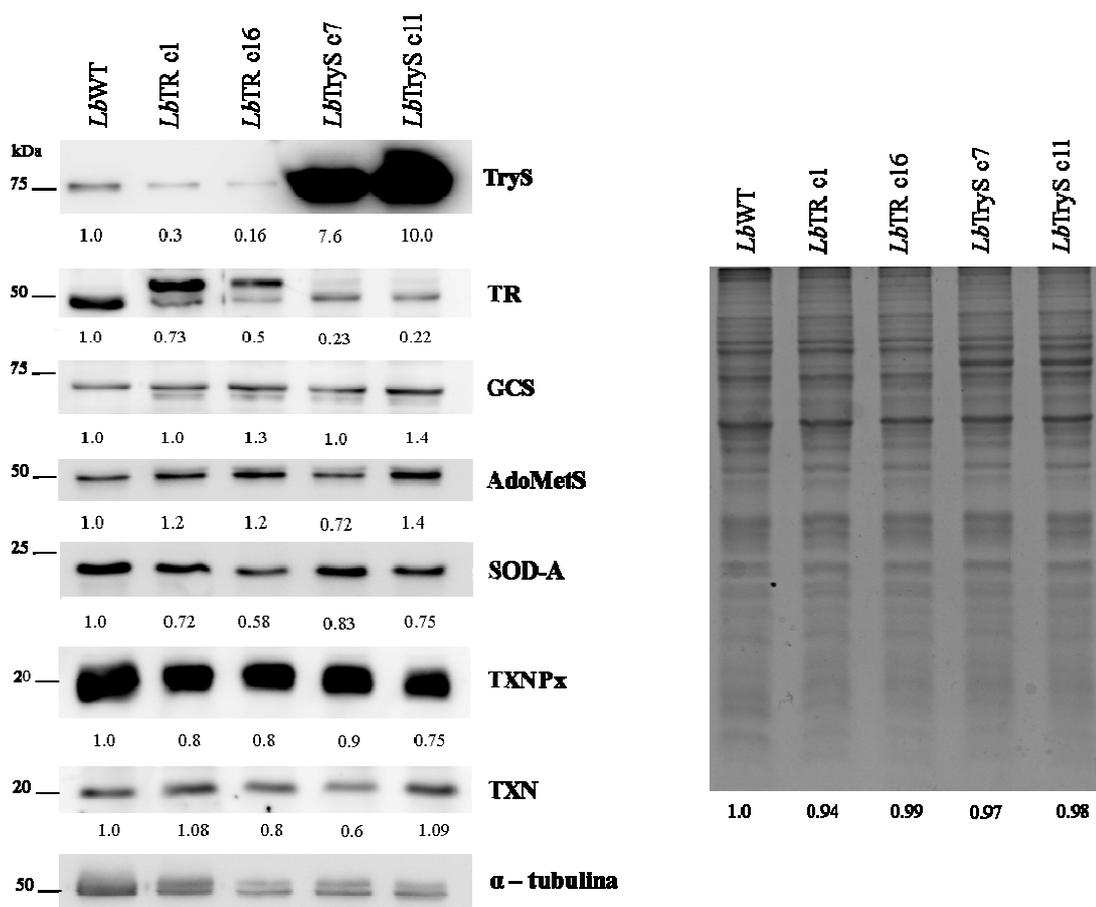


Figura 34 – Nível de expressão de enzimas da via antioxidante e síntese de tripanotona em *L. braziliensis* superexpressando Tripanotona Sintetase (*LbTryS* c7 e c11) ou Tripanotona Redutase (*LbTR* c1 e c16). Foram analisados os níveis de expressão diferencial de Tripanotona Sintetase (TryS) de aproximadamente 74 kDa usando o anticorpo policlonal anti-*LbTryS*; Tripanotona Redutase (TR) de aproximadamente 53 kDa usando o anticorpo policlonal anti-*TcTR*; Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS) de aproximadamente 78 kDa usando o anticorpo anti-*LgGCS*; S-Adenosilmetionina Sintetase (AdoMetS) de aproximadamente 43 kDa utilizando o anticorpo anti-*LbAdoMetS*; Ferro Superóxido Dismutase-A (SOD-A) de aproximadamente 26 kDa usando anticorpo anti-*TcSOD-A*; Triparedoxina Peroxidase (TXNPx) de aproximadamente 20 kDa utilizando o anticorpo anti-*TbTXNPx* e Triparedoxina (TXN) de aproximadamente 16 kDa utilizando o anticorpo anti-*TbTXN*. As proteínas totais (20 μ g) foram separadas em gel de policrilamida 12 % e transferidas para membranas de nitrocelulose. A normalização foi realizada utilizando gel de proteína total (pós-transferência) contendo 20 μ g corado com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas. *LbWT*=linhagem selvagem de *L. braziliensis*.

Tabela 15 – Índice de expressão diferencial de enzimas da via antioxidante em linhagens de *L. braziliensis* transfectadas com Tripanotiona Sintetase (*LbTryS* c7 e c11) ou Tripanotiona Redutase (*LbTR* c1 ou c16).

	<i>LbTryS</i> c7	<i>LbTryS</i> c11	<i>LbTR</i> c1	<i>LbTR</i> c16
TryS	-	-	Redução	Redução
TR	Redução	Redução	-	-
GCS	Igual	Aumento	Igual	Igual
AdoMetS	Igual	Aumento	Igual	Igual
SOD-A	Igual	Igual	Igual	Redução
TXNPx	Igual	Igual	Igual	Igual
TXN	Redução	Igual	Igual	Igual

TryS = Tripanotiona Sintetase; TR = Tripanotiona Redutase; GCS = Gama-Glutamilcisteína Sintetase; AdoMetS = S-Adenosilcisteína Sintetase; SOD-A = Ferro Superóxido Dismutase-A; TXNPx = Triparedoxina Peroxidase; TXN = Triparedoxina.

5.6.2 Análise de Expressão Global em *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressora de TryS e TR

Os clones analisados de *L. infantum* superexpressando TryS, apresentaram pequeno aumento (1,2 e 1,4 vezes) na resistência ao tratamento com SbIII, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 31 C).

Ambos clones superexpressores de TryS apresentaram expressões reduzidas de AdoMetS e TXNPx e a expressão das outras enzimas não foram alteradas (Figura 37). Como a expressão da enzima TXN foi muito baixa em *L. infantum*, não foi possível comparar a expressão diferencial dessa enzima entre as linhagens selvagem e clones transfectados tanto com TryS quando com TR (Figura 37). O anticorpo anti-*LbAdoMetS* reconheceu dois polipeptídeos de aproximadamente 43 kDa nas linhagens selvagem e superexpressora de TR, mas nos clones superexpressores de TryS apenas um polipeptídeo foi reconhecido, sugerindo expressão reduzida dessa enzima devido ausência do polipeptídeo de maior massa molecular (Figura 37). Mas esses dados precisam ser melhor validados por meio de ensaios de atividade enzimática ou eletroforese Bidimensionais/Western Blot. A TXNPx, responsável pela detoxificação direta de espécies reativas de oxigênio (ROS), está com expressão 3,4 e 2,4 vezes reduzida nos clones *LbTryS* c22 e c23, respectivamente (Figura 37).

Os superexpressores de TR de *L. infantum*, clones *LfTR* c14 e c17, apresentaram um aumento de 1,6 e 2,0 vezes na expressão de TXNPx, respectivamente (Figura 37). Esses parasitos não alteraram a expressão das outras enzimas avaliadas.

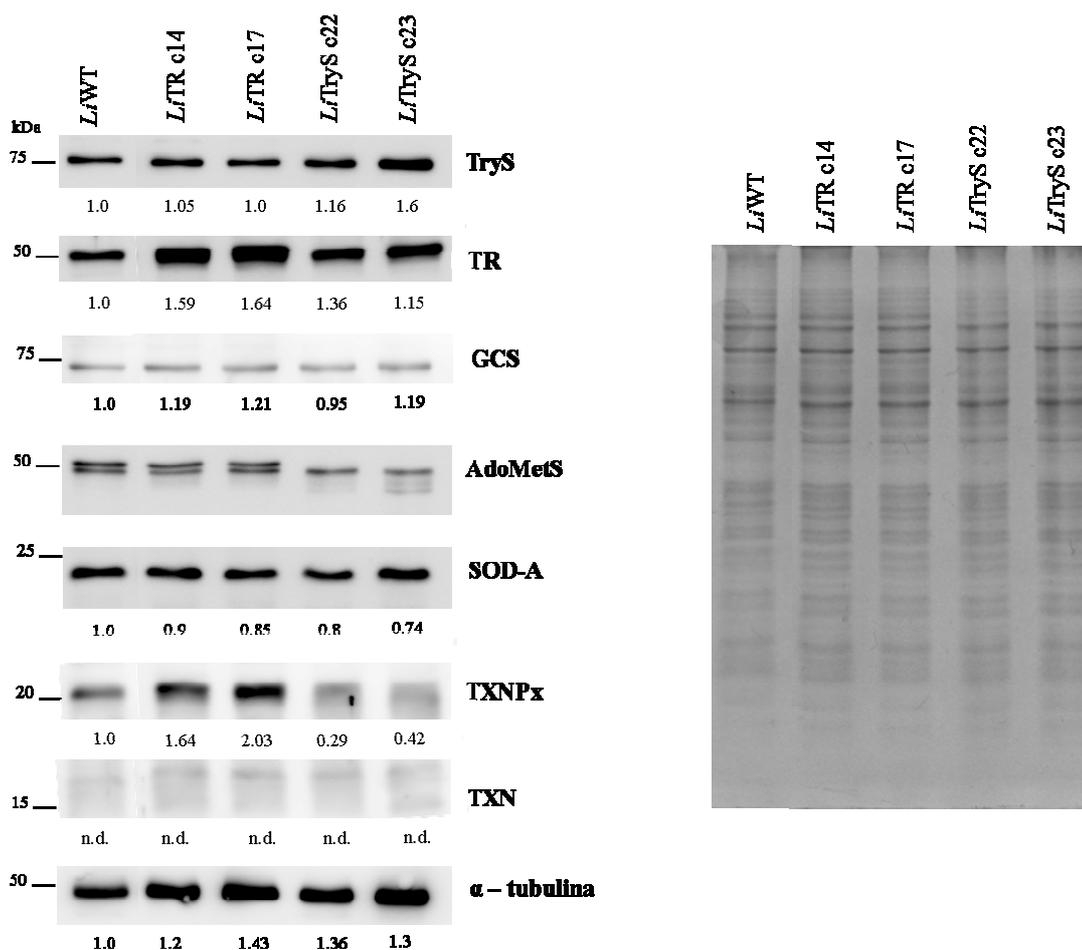


Figura 35 – Nível de expressão de enzimas da via antioxidante e síntese de tripanotiona em *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressando Tripanotiona Sintetase (*LfTryS* c22 e c23) ou Tripanotiona Redutase (*LfTR* c14 e c17). Foram analisados os níveis de expressão diferencial de Tripanotiona Sintetase (TryS) de aproximadamente 74 kDa usando o anticorpo policlonal anti-*LfTryS*; Tripanotiona Redutase (TR) de aproximadamente 53 kDa usando o anticorpo policlonal anti-*TcTR*; Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS) de aproximadamente 78 kDa usando o anticorpo anti-*LgGCS*; S-Adenosilmetionina Sintetase (AdoMetS) de aproximadamente 43 kDa utilizando o anticorpo anti-*LbAdoMetS*; Ferro Superóxido Dismutase-A (SOD-A) de aproximadamente 26 kDa usando anticorpo anti-*TcSOD-A*; Triparedoxina Peroxidase (TXNPx) de aproximadamente 20 kDa utilizando o anticorpo anti-*TbTXNPx* e Triparedoxina (TXN) de aproximadamente 16 kDa utilizando o anticorpo anti-*TbTXN*. As proteínas totais (20 μ g) foram separadas em gel de poliacrilamida 12 % e transferidas para membranas de nitrocelulose. A normalização foi realizada utilizando gel de proteína total (pós-transferência) contendo 20 μ g corado com Azul de Coomassie R-250. As análises de densitometria óptica das bandas foram realizadas em programa CP Atlas. *LfWT*=linhagem selvagem de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*).

Comparando as espécies de *Leishmania* avaliadas observamos que diferente de *L. braziliensis*, *L. infantum* não apresenta regulação oposta em relação à superexpressão de TR e TryS, onde o aumento de uma resultava na diminuição da outra. Em *L. infantum* a superexpressão de uma enzima não altera a expressão da outra (Tabela 16). Entre os superexpressores de TryS e TR podemos observar ainda que quando houve alteração ela foi de redução da expressão nos superexpressores de TryS e de aumento de expressão nos superexpressores de TR.

Tabela 16 – Índice de expressão diferencial de enzimas da via antioxidante em linhagens de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) transfectadas com Tripanotiona Sintetase (*L*TryS c22 e c23) ou Tripanotiona Redutase (*L*TR c14 ou c17).

	<i>L</i> TryS c22	<i>L</i> TryS c23	<i>L</i> TR c14	<i>L</i> TR c17
TryS	-	-	Igual	Igual
TR	Igual	Igual	-	-
GCS	Igual	Igual	Igual	Igual
AdoMetS	Redução	Redução	Igual	Igual
SOD-A	Igual	Igual	Igual	Igual
TXNPx	Redução	Redução	Aumento	Aumento
TXN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

TryS = Tripanotiona Sintetase; TR = Tripanotiona Redutase; GCS = Gama-Glutamilcisteína Sintetase; AdoMetS = S-Adenosilcisteína Sintetase; SOD-A = Ferro Superóxido Dismutase-A; TXNPx = Triparedoxina Peroxidase; TXN = Triparedoxina.

6 Discussão

A Ornitina Decarboxilase é uma enzima importante no metabolismo de *Leishmania* spp. e compõe a via de biossíntese das poliaminas, sendo responsável pela síntese de putrescina, precursor da espermidina. Sabe-se que essa enzima exerce um papel regulatório importante nessa via, sendo considerada uma enzima essencial na biossíntese de poliaminas (COLOTTI; ILARI, 2011). Os resultados do nosso estudo de análise da expressão de ODC nas linhagens resistentes ao SbIII de *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, indicaram aumento na expressão dessa enzima nessas linhagens e redução da expressão em *L. infantum* resistente SbIII (*LiSbR*). Um estudo realizado com *L. tarentolae* selecionada *in vitro* para a resistência ao AsIII, mostrou que os níveis de mRNA e a atividade enzimática de ODC estavam aumentados, assim como os níveis de putrescina e espermidina (HAIMEUR et al., 1999). Apesar de a resistência ter sido selecionada para AsIII, esses parasitos apresentaram resistência cruzada ao SbIII (HAIMEUR et al., 2000). Porém, em *L. tarentolae* selecionada *in vitro* para a resistência ao SbIII, nenhuma diferença na expressão do mRNA de *odc* foi observada quando comparado com a linhagem selvagem (HAIMEUR et al., 2000). *L. tropica* selecionada *in vitro* para resistência ao Glucantime, não apresentou amplificação ou deleção gênica para o gene *odc* nas amostras resistentes (ARANA et al., 1998). Assim como para parasitos com resistência selecionada *in vitro* ao antimônio, vários autores demonstraram que alguns isolados clínicos de *Leishmania* resistentes a esse composto também apresentaram modificação da expressão de ODC em diferentes níveis. Linhagens de *L. donovani* obtidas de isolados clínicos resistentes ao SbV, apresentaram amplificação gênica e aumento nos níveis protéicos de ODC (MURKHERJEE et al., 2007), aumento da atividade enzimática de ODC, concomitante com aumento nos níveis de putrescina e espermidina (SINGH et al., 2007) e aumento nos níveis de mRNA de *odc* (SINGH et al., 2007, RAI et al., 2013). No entanto, em isolados de *L. donovani* resistentes ao SbV de pacientes do Nepal, a expressão do mRNA estava de 2 a 3 vezes menor nos isolados resistentes (DECUYPERE et al., 2005). Esses dados mostram que a variação na expressão e na regulação de ODC nas linhagens

resistentes ao Sb varia com a espécie estudada, a droga à qual a resistência foi obtida e também as condições nas quais se desenvolveu a resistência.

Nossos resultados de análise funcional do gene *odc* por meio da superexpressão da enzima mostraram que o aumento dos níveis de expressão dessa enzima nas três espécies avaliadas foram diferentes e espécie-dependente. Isso demonstra que cada espécie possui uma resposta diferente a estímulos semelhantes, neste caso a transfecção de ODC.

Possivelmente, o grande aumento da expressão de ODC em *L. braziliensis* transfectada (aumento de 58,6 a 74,7 vezes em relação à *LbWT*), não observado em *L. guyanensis* e *L. infantum*, exerce um efeito benéfico no metabolismo desse parasito, e/ou, esta espécie consegue regular seu o metabolismo a fim de compensar a desregulação causada pelo excesso de ODC presente no meio intracelular. É importante ressaltar que a linhagem de *L. guyanensis* selecionada *in vitro* para resistência ao SbIII, *LgSbR*, apresentou índices maiores de expressão de ODC do que os clones transfectados. Esta população de parasitos resistente, passou por um processo de seleção de resistência ao SbIII, que resultou na alteração da expressão de várias enzimas do parasito, seja aumentando ou diminuindo a expressão, processo esse, diferente de superexpressar uma única proteína. A seleção de resistência ao SbIII, certamente modificou o metabolismo de forma que permitiu ao parasito sobreviver mesmo com um grande aumento da expressão de ODC.

Essas diferenças de resposta são comumente observadas nos estudos com *Leishmania* spp., devido à grande plasticidade gênica desses parasitos. A superexpressão de ODC foi capaz de tornar os clones de *L. guyanensis* e *L. braziliensis* transfectados com esse gene mais resistentes ao tratamento com SbIII, mas não teve efeito no fenótipo de resistência de *L. infantum*. Estudos de transfecção do gene *odc* em *L. tarentolae* selvagem, mostraram que apesar dos parasitos terem apresentado aumento dos níveis de mRNA, putrescina, espermidina e atividade enzimática de ODC, eles não foram resistentes ao AsIII (HAIMEUR et al., 1999). Porém, quando a transfecção foi realizada em parasitos que tiveram perda parcial da resistência ao AsIII (parasito reversor), um aumento significativo na resistência ao AsIII foi obtido (HAIMEUR et al., 1999). Se considerarmos que nesses

parasitos que reverteram parcialmente sua resistência, há um conjunto de alterações moleculares que foram adquiridas durante o processo de obtenção da resistência, o fato do aumento de ODC ocasionar o retorno dos níveis de resistência previamente obtidos, deve-se, possivelmente a esse conjunto de modificações adquiridas. Os dados da literatura mostraram que vários genes atuam no processo de resistência de *Leishmania*. Assim, é possível que as características moleculares de cada linhagem de *Leishmania* possam predispor para que um ou outro mecanismo de resistência seja preferencialmente adquirido. Exemplo disso, é que, nossos resultados mostraram que em *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, a superexpressão de ODC bastou para gerar aumento na resistência ao SbIII, enquanto que para *L. infantum*, a superexpressão de ODC não foi suficiente para modificar o fenótipo de susceptibilidade/resistência ao SbIII. Em concordância com os dados obtidos para as duas espécies do subgênero *Viannia*, a transfecção de *L. donovani* (subgênero *Leishmania*) com o gene *odc* aumentou os níveis de mRNA, de proteína e atividade enzimática e os parasitos superexpressores foram também mais resistentes ao tratamento com Pentostam® (SINGH et al., 2007). Dados de análises moleculares de *Leishmania* spp. resistentes ao antimônio mostraram que geralmente os parasitos resistentes apresentam dois ou mais mecanismos de resistência atuando em conjunto em uma mesma linhagem (KUMAR et al., 2012). Em linhagens de *L. guyanensis* resistentes ao SbIII selecionadas *in vitro* pelo nosso grupo, a expressão de aquagliceroporina 1 (AQP1) - enzima envolvida na entrada de SbIII no parasito - estava diminuída, enquanto que a expressão de MRPA e MDR1/MDR3, estavam com os níveis de mRNA e proteína aumentados (MOREIRA et al., 2013). Essa mesma linhagem de *L. guyanensis* resistente ao SbIII, apresentou maior expressão de ODC, indicando alguma participação dessa proteína nos mecanismos de resistência ao SbIII.

Os clones de *L. guyanensis* e *L. infantum* superexpressores de ODC foram incubados com DFMO, um inibidor específico de ODC, para verificar a susceptibilidade desses transfectados a esse composto. Os clones *LgODC* c10 e *LiODC* c2 foram 2,2 e 8,3 vezes mais resistente ao tratamento com DFMO do que a linhagem selvagem, respectivamente. Esse dado confirma que a superexpressão

culminou em um aumento real da atividade de ODC e que esse aumento foi suficiente para proteger os parasitos do efeito causado pelo inibidor DFMO.

A incubação com DFMO também deixou *LgODC c10* mais susceptível ao tratamento com SbIII, demonstrando que o aumento da expressão de ODC foi diretamente responsável pela obtenção do fenótipo de resistência em *L. guyanensis*. Além disso, *LgODC c10* foi mais resistente ao SbIII do que *LgWT* incubado apenas com SbIII. Quando *LgWT* foi incubada com DFMO e SbIII, sua sensibilidade ao SbIII aumentou mais de 600 vezes, demonstrando necessidade da atividade dessa proteína na sobrevivência e na resistência ao SbIII. Esses dados confirmam que a atividade de ODC é essencial, uma vez que o transporte ou a disponibilidade de poliaminas no meio de cultura não foram suficientes para manter o crescimento dos parasitos na presença do DFMO administrado sozinho ou co-incubado com SbIII. Dados da literatura mostram que o tratamento de formas promastigotas de *L. panamensis* selecionadas *in vitro* para a resistência ao SbIII com o DFMO, não alterou o fenótipo de resistência desses parasitos. Porém, quando o DFMO foi utilizado em formas amastigotas de *L. panamensis* selecionadas *in vitro* para a resistência ao SbV, ocorreu uma redução de 21 % na resistência (GOYENECHEPATINO et al., 2008). A eflornitina é um medicamento composto por DFMO que é utilizado no segundo estágio do tratamento clínico da Doença do Sono, cujo agente etiológico é o *T. brucei gambiense* (MALVY; CHAPPUIS, 2011). No entanto, apesar de ter algum efeito citotóxico em *Leishmania* spp., uma baixa eficácia na eliminação de *L. donovani* no tratamento *in vivo* com esse composto foi observado (OLENYIK et al., 2011). Possivelmente, o DFMO não é capaz de acessar eficientemente as formas amastigotas intracelulares no hospedeiro na forma como é administrado (OLENYIK et al., 2011). Uma vez que *T. brucei* é um parasito extracelular, o acesso da droga ao parasito parece ser muito mais efetivo, conseguindo eliminar o parasito do hospedeiro (BIKHOLTZ et al., 2011). A combinação de drogas pode ser uma boa estratégia para a redução da ocorrência de resistência ao tratamento e também para o aumento da eficiência com a utilização de doses menores dos compostos, e consequentemente menos tóxicas. Os dados obtidos neste trabalho apoiam essa hipótese, já que a associação de DFMO e SbIII em doses menores foram muito mais eficientes para eliminar os parasitos do que o SbIII ou DFMO quando administrados

sozinhos. No nosso trabalho, a co-administração de DFMO e SbIII em *L. guyanensis* necessitou de uma dose 600 vezes menor de SbIII para inibir 50 % do crescimento da cultura, quando comparado com a incubação do SbIII sozinho. No entanto, uma vetorização adequada de DFMO deve ser priorizada para que este inibidor consiga chegar com eficiência nas formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

A via de biossíntese da glutathiona é composta por apenas duas enzimas: a Gama-Glutamilcisteína Sintetase e a Glutathiona Sintetase (MEISTER; ANDERSON, 1983). A primeira enzima da via, a GCS, é a principal enzima responsável pela regulação da via. Aumentos nos níveis de glutathiona (GSH) regulam negativamente a atividade da enzima, possivelmente para manter os níveis de GSH sempre constantes (LUEDER; PHILLIPS, 1996, OLIN-SANDOVAL et al., 2012). A análise funcional do gene *gcs* em *L. infantum* mostrou que esse gene é essencial e está diretamente envolvido com a defesa antioxidante do parasito (MUKHERJEE et al., 2009). Nossos resultados de análise da expressão das linhagens selecionadas *in vitro* para resistência ao SbIII, apenas *L. guyanensis* LgSbR apresentou aumento na expressão de GCS. Já as linhagens de *L. amazonensis* e *L. infantum* resistentes ao SbIII apresentaram redução da expressão de GCS. Dados da literatura mostraram que a indução de resistência *in vitro* em *L. tarentolae* ao AsIII e ao SbIII, levou a uma amplificação de uma região gênica extracromossomal que continha os genes *mrpa* e *gcs* co-amplificados, além disso, aumento dos níveis de mRNA de *gcs* e de tióis: cisteína, GSH e tripanotona foram observados (GRONDIN et al., 1997; HAIMEUR et al., 2000; GUIMOND et al., 2003). Os níveis de expressão de GCS nos isolados clínicos resistentes ao SbV apresentaram variação entre os diferentes isolados e estudos. Em formas amastigotas de *L. donovani* resistente ao SbV, uma maior expressão do mRNA do gene *gcs* foi observada quando comparado a um isolado susceptível (CARTER et al., 2006). Em outro estudo, isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao SbV, apenas um, dos quatro isolados estudados, apresentou aumento no nível de mRNA do gene *gcs*, sem amplificação gênica associada (MUKHERJEE et al., 2007). Aumento no nível de mRNA do gene *gcs* em isolados de *L. guyanensis* provenientes de pacientes que apresentaram falha terapêutica foi observado em todos os isolados analisados (TORRES et al., 2010). Outro estudo, mas com isolados clínicos de *L. donovani* resistente ao SbV, mostrou

que, a expressão do mRNA e a atividade enzimática de GCS, estavam aumentadas em dois, e, reduzidas em 3 dos 5 isolados resistentes analisados, quando comparados à linhagem susceptível (RAI et al., 2013). Outro estudo, desta vez com 8 isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao SbV, mostrou que todos apresentaram amplificação gênica do gene *gcs*, porém, apenas três isolados tiveram aumento na expressão de mRNA do *gcs* (SINGH et al., 2014). Esses resultados deixam claro, que a resistência em *Leishmania* spp., mesmo dentro de uma mesma espécie e entre isolados clínicos resistentes ao antimônio oriundos de uma mesma região, pode apresentar diferentes mecanismos de resistência. Variados tipos de alterações moleculares e metabólicas podem existir em diferentes isolados clínicos resistentes à mesma droga. Esses dados reforçam que a resistência ao antimônio é complexa e multifatorial em *Leishmania*.

Em nosso estudo a superexpressão do gene *gcs* resultou em um aumento nos níveis da expressão dessa enzima nos clones analisados. Os clones transfectados com *gcs* tiveram diferentes níveis de expressão entre as espécies estudadas, ou seja, a expressão de GCS foi espécie-dependente. Além disso, os níveis de expressão de ODC e GCS na mesma espécie foram diferentes. *L. infantum* transfectada com GCS, obteve expressão 10 vezes maior para esse gene, quando comparada com a expressão de ODC nesta mesma linhagem transfectada com ODC. Isso demonstra que o processo de transfecção não é homogêneo e que variações nos índices de expressão, estão correlacionadas com o gene transfectado e com o 'background' genético e metabólico do parasito transfectado.

Assim como observado para a superexpressão de ODC, a superexpressão de GCS foi capaz de tornar, os clones das linhagens de *L. guyanensis* e *L. braziliensis* superexpressores, mais resistentes ao tratamento com SbIII. Os clones da linhagem de *L. infantum*, não apresentaram alteração no fenótipo de resistência ao SbIII. Dados da literatura mostraram que linhagens de *L. tarentolae* transfectadas com o gene *gcs*, apesar do aumento na atividade de GCS e dos níveis de cisteína, GSH e tripanotona, não apresentaram modificação no fenótipo de resistência ao AsIII (GRONDIN et al., 1997). Já a transfecção de GCS em parasitos que tiveram perda parcial na resistência ao AsIII, restaurou a resistência desses parasitos a esse metaloide (GRONDIN et al., 1997). Por outro lado, a co-transfecção de *mrpa* e *gcs*

não alterou a sensibilidade de *L. tarentolae* ao SbIII (HAIMEUR et al., 2000). Como discutido anteriormente, cada espécie e linhagem possui um 'background' genético e metabólico que vai levar à diferentes mecanismos para resistir à ação do SbIII. Nesse caso, nem sempre uma única alteração de expressão, como foi o caso da superexpressão de GCS ou ODC, vai levar ao fenótipo de resistência. No entanto, isso não significa que esses genes não possam ser associados à resistência ao SbIII em *Leishmania* spp. Assim, é possível reafirmar o caráter complexo e multifatorial que envolve os mecanismos de resistência de *Leishmania* ao antimônio.

A incubação de *LgGCS* c3 com o inibidor BSO, fez com que os níveis de resistência ao SbIII fossem reduzidos, porém, ainda se mantendo mais resistente do que *LgWT* submetido às mesmas condições. O teste de competição mostrou o efeito aditivo da combinação de doses não letais de BSO e SbIII para inibir o crescimento de *L. guyanensis*. Dados da literatura mostraram que a incubação de *L. tarentolae* resistente ao AsIII com BSO, deixou essas amostras mais sensíveis ao AsIII (GRONDIN et al., 1997). O mesmo foi observado para *L. tropica* resistente ao Glucantime, onde a incubação com BSO reverteu o fenótipo de resistência e reduziu em 50 % o conteúdo de tripanotona, quando comparado ao parasito resistente cultivado na ausência de BSO (ARANA et al., 1998). A incubação de formas promastigotas de *L. panamensis* resistentes ao SbIII e de formas amastigotas resistentes ao SbV com BSO fez com que o fenótipo fosse revertido significativamente, mais de 80 % em alguns casos (GOYENENHE-PATINO et al., 2008). No entanto, esses mesmos autores observaram que a incubação de isolados clínicos resistentes com BSO não alterou a sensibilidade de nenhum deles ao antimônio. Os autores observaram também que linhagens de *L. panamensis* selecionadas *in vitro* para resistência ao SbIII, quando incubadas com a combinação de inibidores BSO e DFMO, o efeito do BSO era o que mais contribuía (mais de 80 % do efeito) para a reversão do fenótipo de resistência. Nossos resultados demonstraram a reversão do fenótipo de resistência e o aumento da sensibilidade ao SbIII nos parasitos incubados com BSO, isso demonstra a importância da atividade de GCS na resistência de *Leishmania* ao antimônio. Esses resultados revelam ainda que a falta de atividade dessa enzima e/ou da disponibilidade de seu produto, afetam a sobrevivência do parasito, na presença ou ausência da droga.

Dessa forma, o texto do efeito conjunto da incubação de SbIII e BSO em baixas concentrações, mostrou que o aumento da expressão de GCS tem relação direta com o fenótipo de resistência ao SbIII em *L. guyanensis*. Os dados sugerem a possibilidade de um tratamento combinado BSO e Sb, no entanto, essa estratégia precisa ser melhor avaliada, uma vez que já foi demonstrado na literatura que o BSO é muito tóxico para células de mamíferos (SINGH et al., 2016). O uso combinado de drogas é uma estratégia valiosa para o controle das Leishmanioses, como forma de reduzir a emergência de resistência à droga, de minimizar os efeitos tóxicos e aumentar a eficácia do tratamento com antimônio.

A ação leishmanicida que o SbIII causa no parasito ainda não está completamente elucidada, porém, sabe-se que esse metal causa um distúrbio no potencial de membrana da mitocôndria desses parasitos, levando a um aumento da produção de ROS (MEHTA; SHAHA, 2006). Nossos resultados mostraram que a incubação com BSO e SbIII tornou a linhagem *LgWT* cerca de 21 vezes mais sensível ao SbIII do que essa linhagem incubada apenas na presença de SbIII. Possivelmente, isso acontece devido à diminuição na produção de GSH ocasionada pela inibição da GCS. O estudo de Mehta e Shaha (2006) mostrou que os níveis de GSH foram reduzidos após o tratamento dos parasitos com o SbIII. Além disto, os autores mostraram que a adição de GSH no meio de cultivo contendo SbIII, foi capaz de proteger o parasito dos danos causados por essa droga, mas não dos efeitos causados pelo AsIII. Outro estudo mostrou que a deleção de uma cópia de *gcs* do genoma de *L. donovani* reduz pela metade os níveis de GSH e tripanotina, tornando os parasitos mais sensíveis ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ao SbV (MUKHERJEE et al., 2009). Esses estudos sustentam a hipótese de que o aumento da produção de ROS é um dos mecanismos responsáveis pela ação leishmanicida do antimônio e que, a diminuição da produção de GSH afeta diretamente a resposta do parasito aos efeitos da droga. Devido à importância fundamental da GCS para a sobrevivência do parasito e seu envolvimento com a resistência ao antimônio, a GCS é um alvo molecular potencial para o desenvolvimento de novas drogas contra as Leishmanioses.

A ausência de resistência ao SbIII em *L. infantum* transfectada tanto com o gene *odc* quanto *gcs*, pode ser devido ao 'background' genético e metabólico dessa

espécie, indicando que em *L. infantum* existam outros mecanismos preferenciais de resistência ao antimônio. Em uma análise preliminar do “*fingerprint*” de metaboloma comparativo entre as linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* utilizadas nesse estudo, foi observado que *L. infantum* possui quantidade muito maior de GSH do que *L. braziliensis* (Apêndice XVII). A partir desse dado, podemos sugerir que é provável que o aumento do produto da atividade GCS, ou seja, o aumento de GSH, possibilitado pela superexpressão desse gene, não contribua na proteção ao estresse causado pelo SbIII em *L. infantum*. Isso porque, por esses parasitos já possuírem níveis elevados de GSH, um aumento adicional ocasionado pela superexpressão, não iria interferir para gerar um fenótipo de resistência. Nossos dados de análise funcional complementado por esse ‘*fingerprint*’ de metaboloma comparativo, permitem afirmar que diferentes mecanismos de resistências ao antimônio atuam nessas distintas espécies.

A Tripanotiona Sintetase (TryS) é uma enzima única em tripanossomatídeos responsável pela síntese do ditiol tripanotiona. Essa molécula é composta por duas glutationas ligada à uma espermidina (MANTA et al., 2013). A TryS é considerada uma enzima essencial para o parasito, uma vez que o duplo nocaute só foi possível com a adição de um plasmídeo contendo o gene *trys* (SOUSA et al., 2014) e, até o momento, nenhum outro mecanismo de *by-pass* foi descrito para essa enzima (ILARI et al., 2017). A TryS por ser uma enzima essencial, sem correspondente no hospedeiro mamífero e sem *by-pass* descrito, se torna um importante alvo para o desenvolvimento de drogas para a quimioterapia das Leishmanioses. Apesar de sua importância, até o momento, nenhum estudo de análise funcional avaliando seu papel na resistência a drogas havia sido descrito na literatura.

A análise da expressão de TryS, demonstrou que linhagens de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* resistentes ao antimônio apresentaram aumento na expressão dessa enzima, quando comparadas às suas respectivas linhagens selvagens. Apenas *L. infantum* resistente ao SbIII não apresentou modificação da expressão de TryS. Nos estudos realizados com *L. tarentolae* e *L. infantum* selecionadas *in vitro* para a resistência ao SbIII, não foi observada nenhuma alteração da expressão do mRNA de TryS (EL FADILI et al., 2005; GUIMOND et al., 2003). Porém, em linhagens de *L. amazonensis* com resistência selecionada *in vitro*

ao SbIII, um aumento cerca de 2 vezes na expressão de TryS foi observada nos dois mutantes selecionados independentemente (DO MONTE-NETO et al., 2011). Na análise de *L. infantum* isolada de cão resistente ao tratamento com Glucantime, TryS não foi encontrada com expressão protéica alterada (GÓMEZ-PÉREZ et al., 2016). O estudo de modelagem metabólica da TryS de *T. cruzi*, mostrou que essa enzima, em conjunto com a GCS (MUKHERJEE et al., 2009), é uma das principais enzimas controladoras do fluxo de metabólitos produzidos pela via da tripanotiona (OLIN-SANDOVAL et al., 2012). Além desse papel regulador, como já foi exposto, TryS é insubstituível e essencial (SOUSA et al., 2014), e, é expressa em quantidades muito pequenas no parasito (ILARI et al., 2017). Devido ao seu papel central e regulador na via da tripanotiona, é possível que o aumento dos níveis de TryS possa ser mais prejudicial do que benéfico ao metabolismo de *Leishmania* spp. Dessa forma, aumentar apenas a atividade dessa enzima pode não ser o mecanismo de resistência preferencial selecionado por algumas espécies de *Leishmania*. Nesse raciocínio, observamos que a transfecção de TryS em *L. guyanensis* e *L. infantum* promoveu pequeno aumento na expressão da enzima (1.3 a 1.7 vezes). Essa expressão resultou em pequeno índice de resistência ao SbIII (1.2 a 1.4 vezes). Em *L. braziliensis*, o aumento obtido na expressão dessa enzima com a transfecção de TryS foi expressivo (14.3 e 15.7 vezes). Essa expressão resultou no aumento da susceptibilidade ao SbIII nos clones superexpressores de aproximadamente 1.6 vezes. É possível que o aumento da susceptibilidade ao SbIII nessa linhagem transfectada seja reflexo do desbalanço causado pela grande quantidade de TryS expressa. Dessa forma, possivelmente o aumento de tripanotiona, intermediado pela superexpressão, causa alterações no metabolismo antioxidante, prejudicando os mecanismos de proteção do parasito contra os efeitos tóxicos do SbIII, tornando os parasitos mais sensíveis a esse composto.

Assim como TryS, a flavoenzima Tripanotiona Redutase (TR) é também única em tripanossomatídeos, porém, sua função é reduzir a tripanotiona oxidada mantendo assim o ambiente intracelular reduzido, protegendo o parasito do estresse oxidativo (ILARI et al. 2017). A tentativa de gerar um parasito mutante pela deleção de TR resultou em um rearranjo genético que mantinha uma cópia desse gene no genoma de *L. donovani*, sendo impossível deletar completamente TR (DUMAS et al.,

1997). Isso confirma a essencialidade de TR para *Leishmania*. Além disso, o nocaute condicional de TR em *T. brucei* demonstrou que quando a atividade de TR é reduzida à menos de 10 %, o crescimento e a infectividade desses parasitos são abolidos (KRIEGER et al., 2000).

Apenas *LgSbR* apresentou aumento na expressão de TR associada ao fenótipo de resistência. As demais espécies, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, não alteraram a expressão dessa enzima nas linhagens resistentes. Nenhuma alteração no nível de mRNA de TR foi observada em linhagens de *L. tarentolae* e *L. infantum* com resistência selecionada *in vitro* ao SbIII (EL FADILI et al., 2005; GUIMOND et al., 2003). Já nos dois mutantes independentes de *L. amazonensis* selecionados *in vitro* para a resistência ao SbIII, houve um aumento de cerca de 2 vezes nos níveis de mRNA que codificam para TR (DO MONTE-NETO et al., 2011). Em isolados clínicos, a participação de TR na resistência ao antimônio foi observada em algumas das linhagens resistentes estudadas. Em *L. donovani* resistente ao SbV, amplificação gênica, aumento na expressão de mRNA e da atividade enzimática de TR foram observados em diferentes isolados (MITTAL et al., 2007; MUKHOPADHYAY et al., 2011, RAI et al., 2013). No entanto, outros isolados clínicos de *L. donovani* resistentes não apresentaram variação nos níveis ou atividade de TR (DECUYPERE et al., 2005; DECUYPERE et al., 2012). Alguns isolados clínicos resistentes ao antimônio apresentaram redução da expressão da TR (DECUYPERE et al., 2012). Em isolados clínicos de *L. braziliensis* resistentes ao SbV, 12 dos 21 isolados analisados apresentaram aumento da expressão de TR (ADAUI et al., 2011). Já em isolados clínicos de *L. guyanensis* proveniente de pacientes com falha terapêutica ao Glucantime, nenhuma alteração na expressão de TR em comparação aos isolados provenientes de pacientes susceptíveis ao tratamento foi observada (TORRES et al., 2010). E, outro estudo analisando linhagens de *L. infantum* resistentes ao SbV nenhuma alteração na expressão de TR foi observado comparado com as linhagens selvagens (JEDDI et al., 2014).

A superexpressão de TR nas linhagens transfectadas de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* gerou além do polipeptídeo de tamanho esperado, outro polipeptídeo de maior massa molecular, sugerindo ser uma isoforma da TR. Em *L. infantum*, que é do subgênero *Leishmania*, não foi observado

o aparecimento de nenhuma outra isoforma dessa proteína. Dessa forma, é possível sugerir parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia*, regulam de forma diferenciada a expressão de algumas enzimas, nesse caso TR, quando comparadas com espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania*. O aumento da expressão da enzima TR promoveu um aumento na resistência de *L. braziliensis* (clone 16) e em ambos clones de *L. infantum*, mas não para *L. guyanensis*. Em *L. braziliensis* ainda é importante observar que apenas um dos clones avaliados (clone 16) obteve aumento na resistência ao SbIII, o outro clone (clone 1) se comportou como a linhagem selvagem, mesmo apresentando o mesmo nível de expressão da enzima TR que o clone 16. Esses diferentes comportamentos frente ao SbIII indicam que o 'background' genético e metabólico dos clones obtidos podem ser determinantes para o aparecimento ou não de um determinado fenótipo. Decuyper e colaboradores (2012) trazem à tona essa discussão em um estudo que demonstrou que isolados clínicos de *L. donovani* resistente ao Glucantime, provenientes de uma mesma área geográfica, apresentaram duas populações diferentes de parasitos quanto à caracterização do DNA do cinetoplasto (kDNA). Esse estudo demonstrou ainda que TR era menos expressa em uma das populações e a outra população apresentou maior concentração de GSH, indicando que diferentes 'backgrounds' genéticos, podem levar ao desenvolvimento de um ou outro mecanismo de resistência preferencial (DECUYPERE et al., 2012). Em nosso estudo, os dois clones de *L. braziliensis* superexpressores de TR, mesmo sendo originados da mesma população, podem possuir diferenças genéticas o suficiente para apresentarem fenótipos de resistência ao SbIII significativamente diferentes.

Ambos clones de *L. infantum* superexpressores de TR foram 1,3 e 1,4 vezes mais resistentes ao SbIII do que a linhagem selvagem. A resistência ao SbIII pode estar associada à menor perda da atividade da enzima que é inativada pelo SbIII, simplesmente porque tem mais TR disponível no parasito superexpressor para realizar a redução da tripanotona. Adicionalmente, tendo como base o resultado do 'fingerprint' de metaboloma (Apêndice XVII), uma vez que o pool de tióis que já é alto em *L. infantum*, o parasito estaria sendo mantido reduzido com mais eficiência, tendo pouco efeito na sobrevivência do parasito submetido ao estresse causado pelo

antimônio. Experimentos adicionais de atividade enzimática e dosagem de tióis serão importantes para elucidar essas diferenças encontradas entre os clones.

Um ponto interessante para análise comparativa, é que as espécies deste estudo pertencentes ao subgênero *Leishmania* apresentaram IC₅₀ do SbIII muito maior do que o obtido para as espécies do subgênero *Viannia*. Isso permite inferir que as espécies do subgênero *Leishmania*, são mais tolerantes ao SbIII. Esse resultado foi corroborado com um estudo prévio demonstrando que em *L. panamensis* (subgênero *Viannia*) os valores de IC₅₀ ao SbV foram 10 vezes menores do que *L. infantum* (subgênero *Leishmania*) (EL FADILI et al., 2005), suportando a hipótese de que há diferença na tolerância ao antimônio entre os subgêneros *Leishmania*. Outras observações a partir dos resultados que podem explicar essa maior tolerância, são os maiores níveis de tióis observados em *L. infantum*, em comparação à *L. braziliensis* (Apêndice XVII).

Os resultados de análise de expressão global, demonstraram que o aumento de expressão de TR e TryS é capaz de alterar a expressão de outras enzimas da via antioxidante, de maneira diferente entre as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* analisadas.

Os resultados de análise de expressão global em *L. braziliensis* apontam para uma regulação direta entre TryS e TR, onde o aumento da expressão de uma leva à redução da expressão da outra e vice-versa. Possivelmente, essa regulação visa manter as concentrações constantes de tripanotona reduzida. Isso porque, a regulação da via de síntese da tripanotona possui GCS e TryS como os principais controladores do fluxo de tripanotona, e, a inibição de GCS e/ou TryS, leva à diminuição da concentração desse ditíol. Em seu papel como regulador, TR não controla o fluxo de síntese da tripanotona, mas é o principal responsável por controlar a concentração de tripanotona reduzida (OLIN-SANDOVAL et al., 2012). Dessa forma, o desbalanço causado pelo aumento da síntese de tripanotona devido ao aumento da expressão de TryS, parece ser compensado pela diminuição do processo de redução da tripanotona oxidada. Por outro lado, o aumento da redução da tripanotona causado pela maior expressão de TR, é compensado pela redução na síntese de tripanotona, ou seja, pela diminuição da expressão de TryS. Em *L. infantum*, essa forma de regulação parece não ser realizada, uma vez que os níveis

de TryS não alteram com a expressão de TR e vice-versa. Possivelmente, devido ao fato de *L. infantum* já possuir uma maior quantidade de tióis, a alteração nos níveis de tripanotiona reduzida ou mesmo nos níveis de tióis totais parecem não desbalancear o metabolismo antioxidante desse parasito.

Em *L. braziliensis*, apenas o superexpressor de TryS c11 (clone 11), apresentou aumento da expressão de GCS e S-Adenosilmetionina Sintetase (AdoMetS). Já o outro clone (TryS c7) manteve inalterada a expressão de ambas enzimas. Esse resultado indica particularidades genéticas e metabólicas desses clones. Como já foi descrito, GCS sintetiza GSH, um tiol precursor da tripanotiona (MEISTER, 1988) e AdoMetS é a enzima responsável pela produção de S-adenosilmetionina (AdoMet), uma molécula que atua em todas as reações biológicas de transferência de grupo metil e também, como precursor para a síntese de poliaminas (REGUERA et al., 2007). Como GCS e AdoMetS participam das vias que fornecem os substratos para a atividade de TryS (glutationa e espermidina), o aumento observado na expressão dessas enzimas possivelmente é para suprir a demanda desses substratos de forma a manter a atividade de síntese de TryS. Uma vez que o único mecanismo de regulação alostérica, que foi descrito até o momento na via da tripanotiona, é o sistema de retroalimentação negativa de GSH que inibe competitivamente GCS (OLIN-SANDOVAL et al., 2012), o maior consumo de GSH pode sinalizar para o aumento da expressão de GCS na intenção de manter os níveis de glutaciona constantes. Já para AdoMetS, experimentos com *L. donovani* superexpressando essa enzima, indicaram que o aumento de expressão de AdoMetS tem pouca influencia na abundância intracelular desse metabólito e em enzimas da via de biossíntese das poliaminas (PÉREZ-PERTEJO et al., 2006). Dessa forma, é possível que o aumento da expressão de AdoMetS possa estar associada às outras funções desse metabólito, como por exemplo, atuar nas reações de trans-metilação. Esse mesmo argumento, pode ser aplicado para os dois clones superexpressores de TryS de *L. infantum* que reduziram a expressão de AdoMetS.

O único superexpressor que alterou a expressão de Ferro Superóxido Redutase-A (SOD-A), apresentando redução na expressão, foi o clone de *L. braziliensis* superexpressor de TR (clone 16). É interessante observar que esse

também, foi o único clone de *L. braziliensis* superexpressando TR que apresentou fenótipo de resistência ao SbIII. A SOD-A é uma metaloenzima que atua na detoxificação de ROS, convertendo ânion superóxido em H₂O₂ e oxigênio (FRIDOVICH, 1978). Esse H₂O₂ vai ser detoxificado pelo sistema de enzimas Triparedoxina (TXN)/Triparedoxina Peroxidase (TXNPx) e Dihidratoascorbado (DHA)/Ascorbato Peroxidase, sendo ambos os doadores de elétrons, TXN e DHA, reduzidos pela tripanotona. Possivelmente, a redução de SOD-A nos superexpressores de TR possa estar associada à menor concentração de ânion superóxido intracelular devido ao aumento do metabolismo da TR que altera a via antioxidante protegendo o parasito contra os efeitos tóxicos do SbIII.

Como descrito acima, as atividades de TXN e TXNPx estão intimamente relacionadas, onde TXN atua como doador de elétrons para TXNPx inativar H₂O₂. Em *L. braziliensis* superexpressora de TryS, apenas o clone 7, apresentou redução na expressão de TXN e nenhuma alteração na expressão de TXNPx nos demais clones foi observado. Em *L. infantum* TXNPx foi encontrada com baixa expressão nos superexpressores de TryS e mais expressa nos superexpressores de TR. Como a via de defesa antioxidante funciona em mecanismo de cascata de reações enzimáticas, o aumento de TryS pode levar a um aumento da tripanotona que desregula a via e diminui a expressão da TXNPx, possivelmente devido a baixa concentração do peróxido de hidrogênio. Por outro lado, o aumento de TR deve causar um desbalanço da via e o parasito para sobreviver aumenta a expressão de TXNPx. A superexpressão de TR deve aumentar o nível de moléculas envolvidas no estresse oxidativo, como por exemplo o peróxido de hidrogênio necessitando aumentar a expressão da triparedoxina peroxidase para metabolizar esse composto que é muito tóxico para o parasito. Dessa forma, a modulação da expressão de outras enzimas ocasionada pelo aumento de expressão TryS ou TR atua de forma diferente para cada gene superexpresso em *L. infantum*.

Em resumo, os nossos resultados mostraram que a superexpressão de TR ou TryS apresentaram variações na expressão das enzimas avaliadas entre as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*. Essas variações demonstram que a superexpressão de uma enzima no parasito leva alteração na modulação da expressão das enzimas associadas de maneira espécie específica. Além disso, os

dados indicam que a resistência de *Leishmania* ao SbIII é devido a ação conjunta de várias enzimas e é dependente da espécie de *Leishmania* analisada.

7 Resumo dos Principais Resultados

- *L. guyanensis* resistente ao SbIII aumentou a expressão de ODC, GCS, TryS e TR;
- *L. braziliensis* resistente ao SbIII, aumentou apenas a expressão de TryS;
- *L. amazonensis* resistente ao SbIII, estava com a expressão de ODC e TryS aumentadas e GCS com expressão reduzida;
- *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) resistente ao SbIII, apresentou redução da expressão de ODC e GCS;
- A superexpressão de ODC e GCS tornou *L. guyanensis* e *L. braziliensis* mais resistentes ao SbIII, entretanto não alterou a susceptibilidade de *L. infantum* a esse composto ;
- DFMO e BSO sensibilizaram *L. guyanensis* ao tratamento com SbIII;
- DFMO e BSO reverteram a resistência ao SbIII em linhagens de *L. guyanensis* superexpressando ODC e GCS, respectivamente;
- O tratamento combinado usando subdoses de DFMO/SbIII e BSO/SbIII aumentou o efeito leishmanicida do SbIII em *L. guyanensis*;
- A superexpressão de TryS aumentou sutilmente o IC₅₀ ao SbIII de *L. guyanensis* e *L. infantum* e deixou *L. braziliensis* mais sensível a essa droga;
- A superexpressão de TR deixou apenas um dos clones de *L. braziliensis* e *L. infantum* mais resistentes ao SbIII;
- A superexpressão de Try em *L. braziliensis* reduziu a expressão de TR enquanto que a superexpressão de TR reduziu a expressão de TryS nessa mesma espécie;
- Os clones superexpressores de TryS de *L. infantum* reduziram a expressão de AdoMetS e TXNPx, enquanto que a superexpressão de TR aumentou TXNPx nessa espécie;
- As espécies do subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis* e *L. infantum*) são mais tolerantes ao tratamento com SbIII do que as espécies do subgênero *Viannia* (*L. guyanensis* e *L. braziliensis*).

8 Conclusões

As conclusões obtidas a partir dos resultados obtidos nesse trabalho são:

- O aumento da expressão de ODC e GCS está associado ao fenótipo de resistência ao SbIII em *L. guyanensis* e *L. braziliensis*;
- A superexpressão de TryS não é um mecanismo de resistência preferencialmente apresentado pelas espécies de *Leishmania* do Novo Mundo;
- O aumento da expressão de TR atua na resistência ao SbIII em *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- A atividade e/ou os produtos de TryS e TR modulam a expressão de enzimas da via de síntese e redução da tripanotona e da via antioxidante de *Leishmania* spp.

9 Perspectivas

A principal hipótese para justificar os resultados obtidos neste trabalho foi que as transfecções de ODC, GCS e TryS geraram aumento nos níveis de tióis nesses parasitos e que, esse aumento, levou ao fenótipo de resistência ao SbIII. Dessa forma, a quantificação dos tióis (glutathiona, glutathionilpermidina e tripanotona) por HPLC dessas linhagens superexpressoras é necessária para confirmar essa hipótese.

Para estabelecer com precisão o IC_{50} do DFMO e do BSO nas linhagens de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) superexpressoras de ODC e GCS, respectivamente, novos ensaios com esses inibidores serão realizados.

A confirmação da superexpressão de TR será realizada pelo ensaio de dosagem da atividade enzimática específica dessa enzima. As isoformas da TR observadas nas linhagens de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* superexpressoras dessa enzima serão identificadas por análise de espectrometria de massa dos polipeptídeos e dos spots obtidos nos géis ID e 2D, respectivamente.

Por fim, para explorar as diferenças nos conteúdos metabólitos das linhagens superexpressoras de TryS e TR o metaboloma comparativo (dados preliminares discutidos nesse trabalho) será concluído.

Referências Bibliográficas

ADAUI, V. et al. Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different *in vitro* susceptibility to pentavalent antimony. *Parasitology*, v. 138, n. 2, p. 183-93, Feb 2011. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678296> >.

AGUILAR, C. et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.

ALMRUD, J. J. et al. Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J Mol Biol*, v. 295, n. 1, p. 7-16, Jan 2000. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623504> >.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548> >.

ANDRADE, J. M.; MURTA, S. M. Functional analysis of cytosolic trypanothione peroxidase in antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasit Vectors*, v. 7, p. 406, Aug 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174795> >.

APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie*, v. 100, p. 125-31, May 2014. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440637> >.

ARANA, F. E. et al. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol*, v. 56, n. 9, p. 1201-8, Nov 1998. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802332> >.

BACCHI, C. J. et al. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science*, v. 210, n. 4467, p. 332-4, Oct 1980. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6775372> >.

BAIOCCO, P. et al. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J Med Chem*, v. 52, n. 8, p. 2603-12, Apr 2009. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19317451> >.

_____. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and *Leishmania infantum* Proliferation. *ACS Med Chem Lett*, v. 2, n. 3, p. 230-3, Mar 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24900299> >.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol, v. 24, n. 7, p. 324-30, Jul 2008. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514028> >.

BASSELIN, M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. Biochem J, v. 315 (Pt 2), p. 631-4, Apr 1996. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8615840> >.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol, v. 37, n. 10, p. 1097-106, Aug 2007. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517415> >.

BENÍTEZ, D. et al. Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. PLoS Negl Trop Dis, v. 10, n. 4, p. e0004617, Apr 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27070550> >.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. Biochem Pharmacol, v. 36, n. 2, p. 197-201, Jan 1987a. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3028425> >.

_____. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. Biochem Pharmacol, v. 36, n. 2, p. 197-201, Jan 1987b. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3028425> >.

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. Antimicrob Agents Chemother, v. 27, n. 6, p. 916-20, Jun 1985. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2411217> >.

BIRKHOLTZ, L. M. et al. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. Biochem J, v. 438, n. 2, p. 229-44, Sep 2011. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21834794> >.

BOITZ, J. M. et al. *Leishmania donovani* ornithine decarboxylase is indispensable for parasite survival in the mammalian host. Infect Immun, v. 77, n. 2, p. 756-63, Feb 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064633> >.

BORST, P. Why kinetoplast DNA networks? Trends Genet, v. 7, n. 5, p. 139-41, May 1991. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648807> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BROCHU, C. et al. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, n. 10, p. 3073-9, Oct 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506011> >.

CARTER, K. C. et al. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, n. 1, p. 88-95, Jan 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377672> >.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis – Biology. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> >. Acesso em: 14 jul. 2015, 14:12:26.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, v. 5, n. 11, p. 873-82, Nov 2007. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938629> >.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol*, v. 156, n. 2, p. 93-101, Dec 2007. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765983> >.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids*, v. 40, n. 2, p. 269-85, Feb 2011. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512387> >.

COMINI, M. A. et al. Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic Biol Med*, v. 36, n. 10, p. 1289-302, May 2004. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110394> >.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 100 Suppl 1, p. S4-8, Dec 2006. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904717> >.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, v. 19, n. 1, p. 111-26, Jan 2006. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418526> >.

CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J*

Biochem, v. 230, n. 2, p. 460-8, Jun 1995. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607216> >.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 101, n. 1, p. 117-8; discussion 118, Feb 2006. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699722> >.

DE GAUDENZI, J. G. et al. Gene expression regulation in trypanosomatids. Essays Biochem, v. 51, p. 31-46, 2011. ISSN 1744-1358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023440> >.

DECUYPERE, S. et al. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. Antimicrob Agents Chemother, v. 49, n. 11, p. 4616-21, Nov 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251303> >.

_____. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 2, p. e1514, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389733> >.

DEY, S. et al. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. Mol Biochem Parasitol, v. 67, n. 1, p. 49-57, Sep 1994. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7838183> >.

DO MONTE-NETO, R. L. et al. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. PLoS Negl Trop Dis, v. 5, n. 5, p. e1167, May 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629719> >.

DORLO, T. P. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. J Antimicrob Chemother, v. 67, n. 11, p. 2576-97, Nov 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22833634> >.

DUMAS, C. et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. EMBO J, v. 16, n. 10, p. 2590-8, May 1997. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184206> >.

EL FADILI, K. et al. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. Exp Parasitol, v. 123, n. 1, p. 51-7, Sep 2009. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500579> >.

_____. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. Antimicrob Agents

Chemother, v. 49, n. 5, p. 1988-93, May 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855523> >.

EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science, v. 309, n. 5733, p. 404-9, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020724> >.

FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science, v. 227, n. 4693, p. 1485-7, Mar 1985. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3883489> >.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. Annu Rev Microbiol, v. 46, p. 695-729, 1992. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1444271> >.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases: defence against endogenous superoxide radical. Ciba Found Symp, n. 65, p. 77-93, 1978 Jun 6-8 1978. ISSN 0300-5208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/225147> >.

FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. Antimony transport mechanisms in resistant *Leishmania* parasites. Biophys Rev, v. 6, p. 119-132, 2014.

FYFE, P. K. et al. *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. J Biol Chem, v. 283, n. 25, p. 17672-80, Jun 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420578> >.

_____. *Leishmania* TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 109, n. 29, p. 11693-8, Jul 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753509> >.

GOLENSER, J.; DOMB, A. New formulations and derivatives of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. Mini Rev Med Chem, v. 6, n. 2, p. 153-62, Feb 2006. ISSN 1389-5575. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472184> >.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol, v. 33, n. 10, p. 1027-34, Sep 2003. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129524> >.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther, v. 8, n. 4, p. 419-33, Apr

2010. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20377337> >.

GOURBAL, B. et al. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem*, v. 279, n. 30, p. 31010-7, Jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138256> >.

GOYENECHÉ-PATINO, D. A. et al. Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, n. 12, p. 4503-6, Dec 2008. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824610> >.

GROBBEN, K. Cap. Claus, **Lehrbuch der Zoologie**, 7. Aufl. (bearbeitet von K. GROBBEN). Marburg N. G. Elwert, 1905 (Fam. Trypanosomatidae introduzida na pág. 222).

GRONDIN, K. et al. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J*, v. 16, n. 11, p. 3057-65, Jun 1997. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9214623> >.

GUIMOND, C. et al. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, v. 31, n. 20, p. 5886-96, Oct 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530437> >.

GÓMEZ PÉREZ, V. et al. Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, v. 6, n. 2, p. 133-9, Aug 2016. ISSN 2211-3207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27317865> >.

HAIMEUR, A. et al. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 108, n. 1, p. 131-5, Apr 2000. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802326> >.

_____. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol*, v. 34, n. 4, p. 726-35, Nov 1999. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564512> >.

HUBER, W.; KOELLA, J. C. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Trop*, v. 55, n. 4, p. 257-61, Dec 1993. ISSN 0001-706X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147282> >.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, v. 73, n. 9, p. 919-34, Jun 2013. ISSN 1179-1950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729001> >.

HUYNH, T. T. et al. Gene knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by RNAi in the parasitic protozoa *Trypanosoma brucei* demonstrates that it is an essential enzyme. *J Biol Chem*, v. 278, n. 41, p. 39794-800, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888552> >.

ILARI, A. et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids*, v. 42, n. 2-3, p. 803-11, Feb 2012. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833767> >.

_____. Targeting polyamine metabolism for finding new drugs against leishmaniasis: a review. *Mini Rev Med Chem*, v. 15, n. 3, p. 243-52, 2015. ISSN 1875-5607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769972> >.

_____. Polyamine-trypanothione pathway: an update. *Future Med Chem*, v. 9, n. 1, p. 61-77, Jan 2017. ISSN 1756-8927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27957878> >.

JEDDI, F. et al. Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, n. 8, p. 4866-74, Aug 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24913173> >.

KAPOOR, P.; SACHDEV, M.; MADHUBALA, R. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for leishmaniasis. *Trop Med Int Health*, v. 5, n. 6, p. 438-42, Jun 2000. ISSN 1360-2276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929144> >.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. *J Parasitol Res*, v. 2014, p. 726328, 2014. ISSN 2090-0023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24900912> >.

KERN, A. D. et al. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*, v. 7, n. 5, p. 567-81, May 1999. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10378276> >.

KOZAK, M. Evaluation of the fidelity of initiation of translation in reticulocyte lysates from commercial sources. *Nucleic Acids Res*, v. 18, n. 9, p. 2828, May 1990. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2339074> >.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta*, v. 1780, n. 11, p. 1236-48, Nov 2008. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395526> >.

KRIEGER, S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol*, v. 35, n. 3, p. 542-52, Feb 2000. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672177> >.

KUMAR, D. et al. Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitol Res*, v. 111, n. 1, p. 223-30, Jul 2012. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302478> >.

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

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 3, p. 421-4, 1987 Jul-Sep 1987. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3507574> >.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*, v. 26, n. 4, p. 223-7, Dec 2009. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836985> >.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol*, v. 152, n. 1, p. 35-46, Mar 2007. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17188763> >.

LEPROHON, P. et al. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell*, v. 5, n. 10, p. 1713-25, Oct 2006. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030997> >.

LIANG, X. H. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, v. 2, n. 5, p. 830-40, Oct 2003. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555465> >.

LIARTE, D. B.; MURTA, S. M. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. *Parasitol Res*, v. 107, n. 1, p. 205-12, Jun 2010. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372925> >.

LIÉVIN-LE MOAL, V.; LOISEAU, P. M. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. FEBS J, v. 283, n. 4, p. 598-607, Feb 2016. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26588037> >.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. Curr Top Cell Regul, v. 36, p. 95-116, 2000. ISSN 0070-2137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842748> >.

LUEDER, D. V.; PHILLIPS, M. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* gamma-glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionylspermidine). J Biol Chem, v. 271, n. 29, p. 17485-90, Jul 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663359> >.

LÉGARÉ, D. et al. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. J Biol Chem, v. 276, n. 28, p. 26301-7, Jul 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306588> >.

MALVY, D.; CHAPPUIS, F. Sleeping sickness. Clin Microbiol Infect, v. 17, n. 7, p. 986-95, Jul 2011. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722252> >.

MANDAL, G. et al. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. Parasitology, v. 134, n. Pt 12, p. 1679-87, Nov 2007. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612420> >.

MANTA, B. et al. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. Biochim Biophys Acta, v. 1830, n. 5, p. 3199-216, May 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396001> >.

MANZANO, J. I. et al. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. Antimicrob Agents Chemother, v. 57, n. 8, p. 3719-30, Aug 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23716044> >.

MARFURT, J. et al. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagn Microbiol Infect Dis, v. 46, n. 2, p. 115-24, Jun 2003. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12812715> >.

MATRANGOLO, F. S. et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* chagasi lines. Mol Biochem Parasitol, v. 190, n. 2, p. 63-75, Aug 2013. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831370> >.

MBONGO, N. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, n. 2, p. 352-7, Feb 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527785> >.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione. *Free Radic Biol Med*, v. 40, n. 10, p. 1857-68, May 2006. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678023> >.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, v. 263, n. 33, p. 17205-8, Nov 1988. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053703> >.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, v. 52, p. 711-60, 1983. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6137189> >.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios & Perspectivas. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 23, n. 1, p. 41-43, 2004.

MICHALICK, MSM. Gênero *Leishmania*. cap. 7. In: NEVES, David Pereira (Ed.). *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Brasil. **Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**. Brasília, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. EPIDEMIOLOGICA, D. D. V. Brasília: 180 p., 2010.

_____. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. EPIDEMIOLOGICA, D. D. V. Brasília: Ministério da Saúde: 120 p. 2014.

_____. Leishmaniose cutânea e Leishmaniose visceral. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/vigilancia-de-a-a-z>>. Acesso em: 16 jul. 2015. 09:45:50.

MITTAL, M. K. et al. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg*, v. 76, n. 4, p. 681-8, Apr 2007. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426170> >.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol*, v. 4, n. 1, p. 4-9, Jan 2014. ISSN 2229-5070. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24754020> >.

MONTE-NETO, R. et al. Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania*

(*Viannia guyanensis*). PLoS Negl Trop Dis, v. 9, n. 2, p. e0003476, Feb 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25679388> >.

MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 106, n. 4, p. 475-8, Jun 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739037> >.

MORALES, M. A. et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. Proteomics, v. 8, n. 2, p. 350-63, Jan 2008. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203260> >.

MOREIRA, D. S. et al. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania* spp. susceptible and resistant to antimony. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, v. 3, p. 143-53, Dec 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24533304> >.

MOREIRA, M. E. et al. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. J Cell Physiol, v. 167, n. 2, p. 305-13, May 1996. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613472> >.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol, v. 18, n. 9, p. 399-405, Sep 2002. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377257> >.

MUKHERJEE, A.; LANGSTON, L. D.; OUELLETTE, M. Intrachromosomal tandem duplication and repeat expansion during attempts to inactivate the subtelomeric essential gene *GSH1* in *Leishmania*. Nucleic Acids Res, v. 39, n. 17, p. 7499-511, Sep 2011. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693561> >.

MUKHERJEE, A. et al. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. J Antimicrob Chemother, v. 59, n. 2, p. 204-11, Feb 2007. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213267> >.

_____. The gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. Mol Microbiol, v. 74, n. 4, p. 914-27, Nov 2009. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818018> >.

MUKHERJEE, S. B. et al. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. J Biol Chem, v. 277, n. 27, p. 24717-27, Jul 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983701> >.

MUKHOPADHYAY, R. et al. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 93, n. 19, p. 10383-7, Sep 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816809> >.

MUKHOPADHYAY, R.; MADHUBALA, R. *Leishmania donovani*: cellular control of ornithine decarboxylase in promastigotes. Int J Biochem Cell Biol, v. 27, n. 9, p. 947-52, Sep 1995. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584631> >.

MUKHOPADHYAY, R. et al. Characterisation of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. Int J Parasitol, v. 41, n. 13-14, p. 1311-21, Nov 2011. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920365> >.

OLENYIK, T.; GILROY, C.; ULLMAN, B. Oral putrescine restores virulence of ornithine decarboxylase-deficient *Leishmania donovani* in mice. Mol Biochem Parasitol, v. 176, n. 2, p. 109-11, Apr 2011. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21182873> >.

OLIN-SANDOVAL, V. et al. Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. FEBS J, v. 279, n. 10, p. 1811-33, May 2012. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394478> >.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Trop, v. 118, n. 2, p. 87-96, May 2011. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420925> >.

OZA, S. L. et al. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol, v. 139, n. 1, p. 107-16, Jan 2005. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610825> >.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. Mol Biochem Parasitol, v. 146, n. 2, p. 135-41, Apr 2006. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427709> >.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc, v. 236, n. 11, p. 1184-91, Jun 2010. ISSN 0003-1488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513195> >.

PASSOS, V. M. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American Cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Tropica, v. 72, p. 251-258, 1999.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, v. 39, n. 7, p. 839-47, Jul 2007. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572675> >.

PERRY, M. R. et al. Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, n. 49, p. 19932-7, Dec 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167266> >.

PURKAIT, B. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 2, p. 1031-41, Feb 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123699> >.

PÉREZ-PERTEJO, Y. et al. Characterization of a methionine adenosyltransferase over-expressing strain in the trypanosomatid *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta*, v. 1760, n. 1, p. 10-9, Jan 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280200> >.

RAI, S. et al. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e74862, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069359> >.

RATH, S. et al. Antimoniais Empregados no Tratamento Da Leishmaniose: Estado da Arte. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 5, 2003.

REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cell Microbiol*, v. 16, n. 10, p. 1549-64, Oct 2014. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24824158> >.

REGUERA, R. M. et al. S-Adenosylmethionine in protozoan parasites: functions, synthesis and regulation. *Mol Biochem Parasitol*, v. 152, n. 1, p. 1-10, Mar 2007. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196271> >.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 1, p. 21-5, Jan 2007. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17093038> >.

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 128, n. 2, p. 217-28, May 2003. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742588> >.

ROCHETTE, A. et al. Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals

substantial differences between the two species. BMC Genomics, v. 9, p. 255, 2008. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510761> >.

ROSENZWEIG, D. et al. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. Proteomics, v. 8, n. 9, p. 1843-50, May 2008. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18398879> >.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Brit Med J. v. 2, pág. 1261-1262, 1903.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

SANGER, F. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v. 191, n. 1104, p. 317-33, Dec 1975. ISSN 0950-1193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2920> >.

SERENO, D. et al. Axenically Grown Amastigotes of *Leishmania infantum* Used as an In Vitro Model To Investigate the Pentavalent Antimony Mode of Action Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 42, n. 12, p. 3097–3102, 1998.

SHAKED-MISHAN, P. et al. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. J Biol Chem, v. 276, n. 6, p. 3971-6, Feb 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110784> >.

SHAMES, S. L. et al. Trypanothione reductase of *Trypanosoma congolense*: gene isolation, primary sequence determination, and comparison to glutathione reductase. Biochemistry, v. 27, n. 14, p. 5014-9, Jul 1988. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3167026> >.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol, v. 49, p. 117-43, 1995. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561456> >.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 89, n. 3, p. 471-8, 1994 Jul-Sep 1994. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476235> >.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annu Rev Microbiol, v. 41, p. 363-82, 1987. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2825587> >.

SINGH, N.; CHATTERJEE, M.; SUNDAR, S. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. Parasit Vectors, v. 7, p. 596, 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25515494> >.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*, v. 5, n. 6, p. 485-97, Jun 2012. ISSN 1995-7645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575984> >.

SINGH, R. et al. Redox-Sensitive Cerium Oxide Nanoparticles Protect Human Keratinocytes from Oxidative Stress Induced by Glutathione Depletion. *Langmuir*, v. 32, n. 46, p. 12202-12211, Nov 2016. ISSN 1520-5827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27792880> >.

SINGH, S. et al. Antileishmanial effect of 3-aminooxy-1-aminopropane is due to polyamine depletion. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, n. 2, p. 528-34, Feb 2007. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101681> >.

SOUSA, A. F. et al. Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med*, v. 73, p. 229-38, Aug 2014. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24853758> >.

SPÄTH, G. F.; DRINI, S.; RACHIDI, N. A touch of Zen: post-translational regulation of the *Leishmania* stress response. *Cell Microbiol*, v. 17, n. 5, p. 632-8, May 2015. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801803> >.

SRIVASTAVA, P. et al. Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 8, p. 3088-91, Aug 2011. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613432> >.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol*, v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002. ISSN 1040-841X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385499> >.

STEINDEL, M. et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol*, v. 60, n. 1, p. 71-9, Jul 1993. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8366896> >.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*, v. 10, n. 1, p. 82, Feb 2017. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28202044> >.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem*, v. 278, n. 27, p. 25120-32, Jul 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707265> >.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*, v. 6, n. 11, p. 849-54, Nov 2001. ISSN 1360-2276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703838> >.

SUNDAR, S.; RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, v. 15, n. 6, p. 593-8, Dec 2002. ISSN 0951-7375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821836> >.

TAYLOR, M. C. et al. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Mol Biochem Parasitol*, v. 64, n. 2, p. 293-301, Apr 1994. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935607> >.

TORRES, D. C. et al. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infect Genet Evol*, v. 10, n. 6, p. 727-33, Aug 2010. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478409> >.

TORRIE, L. S. et al. Chemical validation of trypanothione synthetase: a potential drug target for human trypanosomiasis. *J Biol Chem*, v. 284, n. 52, p. 36137-45, Dec 2009. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828449> >.

WIWANITKIT, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). *Ther Clin Risk Manag*, v. 8, p. 323-8, 2012. ISSN 1178-203X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22802694> >.

WHO – World Health Organization. **Control of the leishmaniases**. WHO Technical Report Series. Geneva, 22–26 March, 2010.

WHO – World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 28 fev. 2017, 17:28:26.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, v. 279, n. 38, p. 39925-32, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15252045> >.

ZHOU, Y. et al. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem*, v. 279, n. 36, p. 37445-51, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220340> >.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. *Comp Funct Genomics*, v. 2012,

p. 813718, 2012. ISSN 1532-6268. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829751> >.

ZÓBOLI, APC. Análise funcional da enzima Ornitina Descarboxilase em linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial. Belo Horizonte. Dissertação [Mestre em Ciências da Saúde] – Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz-MG; 2012.

Apêndice I

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *odc* de *L. guyanensis* M9945
contra sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (LbrM.12.0300)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Lb0DC_Ref_M2904	ATGATGACGATGGTACCGCCGGTGTCTGTCCTCGACGTCGATGAGTCCCGGATCGCCTGCATACCTGCAGAGACGGCTATTGGAGCAGTACCCATCGACTCCCATCCATCAACCCACTGA													
Lg0DC_Cons_Col_3	ATGATGACGATGGTACCGCCGGTGTCTGTCCTCGACGTCGATGAGTCCCGGATCGCCTGCATACCTGCAGAGACGGCTATTGGAGCAGTACCCATCGACTCCCATCCATCAACCCACTGA													
Consensus	ATGATGACGATGGTACCGCCGGTGTCTGTCCTCGACGTCGATGAGTCCCGGATCGCCTGCATACCTGCAGAGACGGCTATTGGAGCAGTACCCATCGACTCCCATCCATCAACCCACTGA													
Lb0DC_Ref_M2904	GCCGGGCCAACACCACCGCCGCGAGGATGAGCGGGCGAGCTCAGTGCAGTGGATGCCAGCAGCCCATCTGCCGACTGATGCAACAGCAGAACGCCGAGTACGTCAGAGGGTGGCCCTGGGTGC													
Lg0DC_Cons_Col_3	GCCGGGCCAACACCACCGCCGCGAGGATGAGCGGGCGAGCTCAGTGCAGTGGATGCCAGCAGCCCATCTGCCGACTGATGCAACAGCAGAACGCCGAGTACGTCAGAGGGTGGCCCTGGGTGC													
Consensus	GCCGGGCCAACACCACCGCCGCGAGGATGAGCGGGCGAGCTCAGTGCAGTGGATGCCAGCAGCCCATCTGCCGACTGATGCAACAGCAGAACGCCGAGTACGTCAGAGGGTGGCCCTGGGTGC													
Lb0DC_Ref_M2904	TGTGTCAGACTCGACTGTGATCAGCATACCGCTGTCGAGCCAGCAGGACATGTGGACCTCTTCTCTCAGGGGARGCCAGGCGCTCAGCAGCTGTGTTCTTCCGCTACCCACCTACGGCTGG													
Lg0DC_Cons_Col_3	TGTGTCAGACTCGACTGTGATCAGCATACCGCTGTCGAGCCAGCAGGACATGTGGACCTCTTCTCTCAGGGGARGCCAGGCGCTCAGCAGCTGTGTTCTTCCGCTACCCACCTACGGCTGG													
Consensus	TGTGTCAGACTCGACTGTGATCAGCATACCGCTGTCGAGCCAGCAGGACATGTGGACCTCTTCTCTCAGGGGARGCCAGGCGCTCAGCAGCTGTGTTCTTCCGCTACCCACCTACGGCTGG													
Lb0DC_Ref_M2904	CCGACGCGGAGGAGCGCCGGCTGCCATTTATGCACTGTTCCAGAGTACATGTGGCCAGCCAGCTGGCTGCTCCACCGCTGCCCTGGCCACCGCGAGCACCACACGCCATCATCAGACGCCCT													
Lg0DC_Cons_Col_3	CCGACGCGGAGGAGCGCCGGCTGCCATTTATGCACTGTTCCAGAGTACATGTGGCCAGCCAGCTGGCTGCTCCACCGCTGCCCTGGCCACCGCGAGCACCACACGCCATCATCAGACGCCCT													
Consensus	CCGACGCGGAGGAGCGCCGGCTGCCATTTATGCACTGTTCCAGAGTACATGTGGCCAGCCAGCTGGCTGCTCCACCGCTGCCCTGGCCACCGCGAGCACCACACGCCATCATCAGACGCCCT													
Lb0DC_Ref_M2904	CCATCCAGCCATCAGCAGATGCGATCGAGCGCGGAGCAGTACTGGCGCCGCTCAGACGCTGATCAGAGAGGGTGTGARGGCGCGCGAGCCACCGCCGCTGCAGCTACACTCCAGCGAA													
Lg0DC_Cons_Col_3	CCATCCAGCCATCAGCAGATGCGATCGAGCGCGGAGCAGTACTGGCGCCGCTCAGACGCTGATCAGAGAGGGTGTGARGGCGCGCGAGCCACCGCCGCTGCAGCTACACTCCAGCGAA													
Consensus	CCATCCAGCCATCAGCAGATGCGATCGAGCGCGGAGCAGTACTGGCGCCGCTCAGACGCTGATCAGAGAGGGTGTGARGGCGCGCGAGCCACCGCCGCTGCAGCTACACTCCAGCGAA													
Lb0DC_Ref_M2904	CTGTACATCTCAGGTGTCTCCCTCCGACAGGCCCCAGGAGCCGTTTACATCATGTGACCTGGCCGCTGCTGGAGCAGATGGCCGCTGGCCAGCAGCTGCCGATGGTGGCCGCTACTTCGGCGTC													
Lg0DC_Cons_Col_3	CTGTACATCTCAGGTGTCTCCCTCCGACAGGCCCCAGGAGCCGTTTACATCATGTGACCTGGCCGCTGCTGGAGCAGATGGCCGCTGGCCAGCAGCTGCCGATGGTGGCCGCTACTTCGGCGTC													
Consensus	CTGTACATCTCAGGTGTCTCCCTCCGACAGGCCCCAGGAGCCGTTTACATCATGTGACCTGGCCGCTGCTGGAGCAGATGGCCGCTGGCCAGCAGCTGCCGATGGTGGCCGCTACTTCGGCGTC													
Lb0DC_Ref_M2904	AAAGTAAACCCGAACTTGCATCTCGAGGTGCTCGGGGCCCTCCGCTCCGCTTTGACTGCGCGCTCGAGGGGGAAATCCAAACAGTGTGGACACACCTCGTGGCTGCCGACGACATCATCT													
Lg0DC_Cons_Col_3	AAAGTAAACCCGAACTTGCATCTCGAGGTGCTCGGGGCCCTCCGCTCCGCTTTGACTGCGCGCTCGAGGGGGAAATCCAAACAGTGTGGACACACCTCGTGGCTGCCGACGACATCATCT													
Consensus	AAAGTAAACCCGAACTTGCATCTCGAGGTGCTCGGGGCCCTCCGCTCCGCTTTGACTGCGCGCTCGAGGGGGAAATCCAAACAGTGTGGACACACCTCGTGGCTGCCGACGACATCATCT													
Lb0DC_Ref_M2904	TTGCCAACCCATGCAAGCAGCCTGGCGACATGCGGGAGGCGCAGGACCGCGGGCTGATCTAGCTGACGGTGGACACCTGCTAGAGATTGAGAAATCAGCCGCTCATGCCCTCAGCCCGCGGGTAT													
Lg0DC_Cons_Col_3	TTGCCAACCCATGCAAGCAGCCTGGCGACATGCGGGAGGCGCAGGACCGCGGGCTGATCTAGCTGACGGTGGACACCTGCTAGAGATTGAGAAATCAGCCGCTCATGCCCTCAGCCCGCGGGTAT													
Consensus	TTGCCAACCCATGCAAGCAGCCTGGCGACATGCGGGAGGCGCAGGACCGCGGGCTGATCTAGCTGACGGTGGACACCTGCTAGAGATTGAGAAATCAGCCGCTCATGCCCTCAGCCCGCGGGTAT													
Lb0DC_Ref_M2904	CCGATCAGAGCAGACAGCAGGCGCAGTGCAGCTTCCACCAAGTTCGGGTGCTCCCTTACAGATGTTGAGAGCCTGCTGAGGCGGCTCCGAGTCAAGTGCAGGTGACGGCTCAGGCTTTC													
Lg0DC_Cons_Col_3	CCGATCAGAGCAGACAGCAGGCGCAGTGCAGCTTCCACCAAGTTCGGGTGCTCCCTTACAGATGTTGAGAGCCTGCTGAGGCGGCTCCGAGTCAAGTGCAGGTGACGGCTCAGGCTTTC													
Consensus	CCGATCAGAGCAGACAGCAGGCGCAGTGCAGCTTCCACCAAGTTCGGGTGCTCCCTTACAGATGTTGAGAGCCTGCTGAGGCGGCTCCGAGTCAAGTGCAGGTGACGGCTCAGGCTTTC													
Lb0DC_Ref_M2904	CAGCTCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGGTACGTCAGTGTCCGAGTGCAGGAGCCATCCAGCTCTCCAGCAGCCCTCCGATACGGTTCAACTGTACTCTGCTTGCATCGGGCGGCTCCCGA													
Lg0DC_Cons_Col_3	CAGCTCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGGTACGTCAGTGTCCGAGTGCAGGAGCCATCCAGCTCTCCAGCAGCCCTCCGATACGGTTCAACTGTACTCTGCTTGCATCGGGCGGCTCCCGA													
Consensus	CAGCTCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGGTACGTCAGTGTCCGAGTGCAGGAGCCATCCAGCTCTCCAGCAGCCCTCCGATACGGTTCAACTGTACTCTGCTTGCATCGGGCGGCTCCCGA													
Lb0DC_Ref_M2904	GCCTGGAGACCAACACCGGAGCGCCGAGGCGCATTTCAGGAGCATCGCCGTCGATTCGGCCAGTCTGGCCAGTCTGGAGGAGCTCTCGGGGGTGGTGTGACCATCATCAGTACGCGCGGCTGCTACTTCAC													
Lg0DC_Cons_Col_3	GCCTGGAGACCAACACCGGAGCGCCGAGGCGCATTTCAGGAGCATCGCCGTCGATTCGGCCAGTCTGGCCAGTCTGGAGGAGCTCTCGGGGGTGGTGTGACCATCATCAGTACGCGCGGCTGCTACTTCAC													
Consensus	GCCTGGAGACCAACACCGGAGCGCCGAGGCGCATTTCAGGAGCATCGCCGTCGATTCGGCCAGTCTGGCCAGTCTGGAGGAGCTCTCGGGGGTGGTGTGACCATCATCAGTACGCGCGGCTGCTACTTCAC													
Lb0DC_Ref_M2904	GGCTCCACGACGACACTCTCTGAGACGCTTCCCTCCCGAGCTCGGATGCTCGATGGAGAGGCGAGCTCCAGGCCCCCAGTCTGTCTGCTCCGATGACGAGCCAGGAGATACAGTAC													
Lg0DC_Cons_Col_3	GGCTCCACGACGACACTCTCTGAGACGCTTCCCTCCCGAGCTCGGATGCTCGATGGAGAGGCGAGCTCCAGGCCCCCAGTCTGTCTGCTCCGATGACGAGCCAGGAGATACAGTAC													
Consensus	GGCTCCACGACGACACTCTCTGAGACGCTTCCCTCCCGAGCTCGGATGCTCGATGGAGAGGCGAGCTCCAGGCCCCCAGTCTGTCTGCTCCGATGACGAGCCAGGAGATACAGTAC													
Lb0DC_Ref_M2904	TACGTCAGCAGCGCCCTACCCAGCTTCACTGTATCATCTCGATCAGCCCATCCAGCGCTTCTCTGCTGACGACGCGCGAGCGGTCGACGCACTGGAGGGCAGCAGGAGGAGGCGAGACCT													
Lg0DC_Cons_Col_3	TACGTCAGCAGCGCCCTACCCAGCTTCACTGTATCATCTCGATCAGCCCATCCAGCGCTTCTCTGCTGACGACGCGCGAGCGGTCGACGCACTGGAGGGCAGCAGGAGGAGGCGAGACCT													
Consensus	TACGTCAGCAGCGCCCTACCCAGCTTCACTGTATCATCTCGATCAGCCCATCCAGCGCTTCTCTGCTGACGACGCGCGAGCGGTCGACGCACTGGAGGGCAGCAGGAGGAGGCGAGACCT													
Lb0DC_Ref_M2904	CGCTGAGCAGCGCAGCAGCAGCGCCGTTGCCATCAGCAGCATCTCCGACCCAGCTGCAGCTCGCTGGATTGTATCTCAGGAGAGCCCTTCCAGAGATGAGCTGGGCGACTGGATTCTGGTCCC													
Lg0DC_Cons_Col_3	CGCTGAGCAGCGCAGCAGCAGCGCCGTTGCCATCAGCAGCATCTCCGACCCAGCTGCAGCTCGCTGGATTGTATCTCAGGAGAGCCCTTCCAGAGATGAGCTGGGCGACTGGATTCTGGTCCC													
Consensus	CGCTGAGCAGCGCAGCAGCAGCGCCGTTGCCATCAGCAGCATCTCCGACCCAGCTGCAGCTCGCTGGATTGTATCTCAGGAGAGCCCTTCCAGAGATGAGCTGGGCGACTGGATTCTGGTCCC													
Lb0DC_Ref_M2904	GGACATGGGAGCTACACACTTCCGCGCCGCGCCCTTACAGCGCTTCTCAGCGACCGCTTTGAAATGGTGGAGCTATTGGCTTTATAG													
Lg0DC_Cons_Col_3	GGACATGGGAGCTACACACTTCCGCGCCGCGCCCTTACAGCGCTTCTCAGCGACCGCTTTGAAATGGTGGAGCTATTGGCTTTATAG													
Consensus	GGACATGGGAGCTACACACTTCCGCGCCGCGCCCTTACAGCGCTTCTCAGCGACCGCTTTGAAATGGTGGAGCTATTGGCTTTATAG													

Apêndice II

Alinhamento da sequência de aminoácidos de ODC de *L. guyanensis* M9945 contra sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (LbrM.12.0300)

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
LbODC_Ref_M2904  MNTWPPVSYLDVDAVPDRLHTCKRRLLQYHIDSRSLTILNPLSRANTTAGRNEARQLSDVDAQQPILPTECNKQTPYVQEVALGAARDSTVNHQATAVAAQSDIYDLFFLEGSQAVNGLCFSPYPTYG
LgODC_Cons_Col_3 MNTWPPVSYLDVDAVPDRLHTCKRRLLQYHIDSRSLTILNPLSRANTTAGRNEARQLSDVDAQQPILPTECNKQTPYVQEVALGAARDSTVNHQATAVAAQSDIYDLFFLEGSQAVNGLCFSPYPTYG
Consensus       MNTWPPVSYLDVDAVPDRLHTCKRRLLQYHIDSRSLTILNPLSRANTTAGRNEARQLSDVDAQQPILPTECNKQTPYVQEVALGAARDSTVNHQATAVAAQSDIYDLFFLEGSQAVNGLCFSPYPTYG

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
LbODC_Ref_M2904  RTAEERRARIYAVFKKYNVATHLPASPAALATAQHSHSHHQHSHAIHAIKIMPIETREQYMRRLSNVYIEKAVKAAARATAATTTPTNCTISGVPRHEPEDPFYIIDLGRVVEQMARARHELPHVPRPYFAY
LgODC_Cons_Col_3 RTAEERRARIYAVFKKYNVATHLPASPAALATAQHSHSHHQHSHAIHAIKIMPIETREQYMRRLSNVYIEKAVKAAARATAATTTPTNCTISGVPRHEPEDPFYIIDLGRVVEQMARARHELPHVPRPYFAY
Consensus       RTAEERRARIYAVFKKYNVATHLPASPAALATAQHSHSHHQHSHAIHAIKIMPIETREQYMRRLSNVYIEKAVKAAARATAATTTPTNCTISGVPRHEPEDPFYIIDLGRVVEQMARARHELPHVPRPYFAY

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
LbODC_Ref_M2904  KSNPQLALLEVLGALGSFDCRSKGEIQTLVLDNHLVHSPDDIIFAMPCKQPGDMREARQARGVYTYVDNLLLEIEKISRLNPSARAVIRIKTNDKRAKCAFSTKFGVPLNDVESLLQARQFKVDVYGVSF
LgODC_Cons_Col_3 KSNPQLALLEVLGALGSFDCRSKGEIQTLVLDNHLVHSPDDIIFAMPCKQPGDMREARQARGVYTYVDNLLLEIEKISRLNPSARAVIRIKTNDKRAKCAFSTKFGVPLNDVESLLQARQFKVDVYGVSF
Consensus       KSNPQLALLEVLGALGSFDCRSKGEIQTLVLDNHLVHSPDDIIFAMPCKQPGDMREARQARGVYTYVDNLLLEIEKISRLNPSARAVIRIKTNDKRAKCAFSTKFGVPLNDVESLLQARQFKVDVYGVSF

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
LbODC_Ref_M2904  HVGSSNSDPATYVSAYRDYHVFQASQYGFNCTLLDIGGGFPSVETNTASGEATFEDIARRAIRPVLEELFGGGDYTIISEPGRYFTASTHALLVNVFASRKLKMS#VEKAS#FQALQSVVPHDEPEEYQY
LgODC_Cons_Col_3 HVGSSNSDPATYVSAYRDYHVFQASQYGFNCTLLDIGGGFPSVETNTASGEATFEDIARRAIRPVLEELFGGGDYTIISEPGRYFTASTHALLVNVFASRKLKMS#VEKAS#FQALQSVVPHDEPEEYQY
Consensus       HVGSSNSDPATYVSAYRDYHVFQASQYGFNCTLLDIGGGFPSVETNTASGEATFEDIARRAIRPVLEELFGGGDYTIISEPGRYFTASTHALLVNVFASRKLKMS#VEKAS#FQALQSVVPHDEPEEYQY

521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     636
LbODC_Ref_M2904  YYNDGLYHSFNCCIIFDRAHPTLLLLNDGGADAVGDNKEEGETSLSRARRPLRITTIIFGPTCDSLDCILRKQPFPEKLGDWILVPMGYSYTTAARAPFNGFSTHARFENVSSIAL
LgODC_Cons_Col_3 YYNDGLYHSFNCCIIFDRAHPTLLLLNDGGADAVGDNKEEGETSLSRARRPLRITTIIFGPTCDSLDCILRKQPFPEKLGDWILVPMGYSYTTAARAPFNGFSTHARFENVSSIAL
Consensus       YYNDGLYHSFNCCIIFDRAHPTLLLLNDGGADAVGDNKEEGETSLSRARRPLRITTIIFGPTCDSLDCILRKQPFPEKLGDWILVPMGYSYTTAARAPFNGFSTHARFENVSSIAL

```

Apêndice III

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *odc* de *L. guyanensis* M9945 contra sequência referência de *L. panamensis* L13 (LPAL13_120007700)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Lp00C_Ref_L13	ATGATGACGATGGTACCGCCGGTGTCTGTCTCGACGTCGATGCGAGTCCGGATCGCCGTCGATACCTCGAAGAGAGCGGCTATTGGAGCGATACACATCGACTCCCGATCCACACCCTCACCCCACTGA													
Lg00C_Cons_Col.3	ATGATGACGATGGTACCGCCGGTGTCTGTCTCGACGTCGATGCGAGTCCGGATCGCCGTCGATACCTCGAAGAGAGCGGCTATTGGAGCGATACACATCGACTCCCGATCCACACCCTCACCCCACTGA													
Consensus	ATGATGACGATGGTACCGCCGGTGTCTGTCTCGACGTCGATGCGAGTCCGGATCGCCGTCGATACCTCGAAGAGAGCGGCTATTGGAGCGATACACATCGACTCCCGATCCACACCCTCACCCCACTGA													
Lp00C_Ref_L13	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Lg00C_Cons_Col.3	GCCGGGCCAACACACCGCCGGCAGGATGAGCGCGCAGCTCAGTGACGTGGATGCCAGCAGCCATCTGCCGACTGARTGCARACAGCAACCGCCGAGTACGTCAGAGAGGTGCCCTGGGTGC													
Consensus	GCCGGGCCAACACACCGCCGGCAGGATGAGCGCGCAGCTCAGTGACGTGGATGCCAGCAGCCATCTGCCGACTGARTGCARACAGCAACCGCCGAGTACGTCAGAGAGGTGCCCTGGGTGC													
Lp00C_Ref_L13	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Lg00C_Cons_Col.3	TGTGCGAGCTGCACTGTGARTCAGCATACCGCTGTCGAGCCGCCAGGACATTTGGGACTCTTCTCTCCAGGGAGGCCAGGCCGTCAACGGCTGTGTCTCTGCCCTACCCACCTACGGCTGG													
Consensus	TGTGCGAGCTGCACTGTGARTCAGCATACCGCTGTCGAGCCGCCAGGACATTTGGGACTCTTCTCTCCAGGGAGGCCAGGCCGTCAACGGCTGTGTCTCTGCCCTACCCACCTACGGCTGG													
Lp00C_Ref_L13	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Lg00C_Cons_Col.3	CGCACGGCGGAGAGCGCCGGCTGCCATTTATGCAATTTTCAGAGATACATGTGGCCAGCAGCTGCTGTCTCACCGGCTGCCCTGGCCACCGCAGCACACACACACACATCATCGCATGCTT													
Consensus	CGCACGGCGGAGAGCGCCGGCTGCCATTTATGCAATTTTCAGAGATACATGTGGCCAGCAGCTGCTGTCTCACCGGCTGCCCTGGCCACCGCAGCACACACACACACATCATCGCATGCTT													
Lp00C_Ref_L13	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
Lg00C_Cons_Col.3	CCATCCAGCCATCACAGATGCCCATCGAGCGCGGAGCAGTACTGGCGGCCCTGTCAACGCTGTACTCGAGAGGGTGTGAGGGCGCGGCCACCCGCCGCTGCAGCTACACCTCCAGCGAA													
Consensus	CCATCCAGCCATCACAGATGCCCATCGAGCGCGGAGCAGTACTGGCGGCCCTGTCAACGCTGTACTCGAGAGGGTGTGAGGGCGCGGCCACCCGCCGCTGCAGCTACACCTCCAGCGAA													
Lp00C_Ref_L13	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
Lg00C_Cons_Col.3	CTGTACCATTCAGATGCTCCCTCGCCACAGGCCCGAGGACCCGCTTCATCATTCATGACTCGGCCGTGCTGGAGCAGATGGCCGCTGGCCACAGCTGCCAGTGTGGCCGCTACTTCGCCGTC													
Consensus	CTGTACCATTCAGATGCTCCCTCGCCACAGGCCCGAGGACCCGCTTCATCATTCATGACTCGGCCGTGCTGGAGCAGATGGCCGCTGGCCACAGCTGCCAGTGTGGCCGCTACTTCGCCGTC													
Lp00C_Ref_L13	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
Lg00C_Cons_Col.3	AAGATGACCCGAACTTGCATCTTGGAGTGTCTGGGGCCCTCGGCTCCGGCTTGTACTGCGCTCGAGGGGGAAATCCAAACGGTGTGACACACACCTCTGGGCTGCCAGCGCATCATCT													
Consensus	AAGATGACCCGAACTTGCATCTTGGAGTGTCTGGGGCCCTCGGCTCCGGCTTGTACTGCGCTCGAGGGGGAAATCCAAACGGTGTGACACACACCTCTGGGCTGCCAGCGCATCATCT													
Lp00C_Ref_L13	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Lg00C_Cons_Col.3	TCGCCACCATTCAACAGCTTGGCGACTCGGGAGCGCAGGACCGCGGCTGACTACTGTAGCGTGGACACCTGCTAGAGATTGAGAAATCAGCGCCCTCATGCCCTCAGCCCGCGGGTAT													
Consensus	TCGCCACCATTCAACAGCTTGGCGACTCGGGAGCGCAGGACCGCGGCTGACTACTGTAGCGTGGACACCTGCTAGAGATTGAGAAATCAGCGCCCTCATGCCCTCAGCCCGCGGGTAT													
Lp00C_Ref_L13	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
Lg00C_Cons_Col.3	CCGCATCAGACAAACGACAGCAGGCGCAAGTGCCTTCCACAGCTCCGGTGCCTTCCACAGCTTCCGCTCCCTTACAGCAGCTTGAGAGCTGCTGCAGGCGGCTCCGAGTTCARAGCTCAGCTGTACGGCTCAGCTTT													
Consensus	CCGCATCAGACAAACGACAGCAGGCGCAAGTGCCTTCCACAGCTCCGGTGCCTTCCACAGCTTCCGCTCCCTTACAGCAGCTTGAGAGCTGCTGCAGGCGGCTCCGAGTTCARAGCTCAGCTGTACGGCTCAGCTTT													
Lp00C_Ref_L13	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
Lg00C_Cons_Col.3	CAGCTCGGACAGCAGCAGCGACCCGGCTACGTACGTGTCCGAGTGGCGAGCGCTACACAGCTTCCAGCAGCCCTCCAGTACGGCTTCACTGTACTCTGCTTGACATCGGCGGGCTTCCCGA													
Consensus	CAGCTCGGACAGCAGCAGCGACCCGGCTACGTACGTGTCCGAGTGGCGAGCGCTACACAGCTTCCAGCAGCCCTCCAGTACGGCTTCACTGTACTCTGCTTGACATCGGCGGGCTTCCCGA													
Lp00C_Ref_L13	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
Lg00C_Cons_Col.3	GCTGGAGACCAACCGCGAGCGCGGAGGCCATTTTCAGGTCATCGCCGTCGATTTCGGCAGTGTGGAGGAGCTTCCGGGGTGGTGTGATGACATCATCATGAGCCGGTGCCTACTTAC													
Consensus	GCTGGAGACCAACCGCGAGCGCGGAGGCCATTTTCAGGTCATCGCCGTCGATTTCGGCAGTGTGGAGGAGCTTCCGGGGTGGTGTGATGACATCATCATGAGCCGGTGCCTACTTAC													
Lp00C_Ref_L13	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Lg00C_Cons_Col.3	GGCTTCCAGCGACGACTTCTGTGAGCTTCCGCTCCCGAGCTCGGATGTCGATGTGGAGAGCGAGCTACAGCCCTCCAGCTGTGTGTCGAGTGGACAGCTCCAGGAGTACAGTAC													
Consensus	GGCTTCCAGCGACGACTTCTGTGAGCTTCCGCTCCCGAGCTCGGATGTCGATGTGGAGAGCGAGCTACAGCCCTCCAGCTGTGTGTCGAGTGGACAGCTCCAGGAGTACAGTAC													
Lp00C_Ref_L13	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
Lg00C_Cons_Col.3	TAGCTCAGCAGCGGCTTACACAGCTTCACTGTATCATCTCGATCAGCCCATCCAGCGCTTCTCTGCTGACGACCGCGCGGCTGTGACGCAATGGAGACACAAAGAGGAGGGCGAGACT													
Consensus	TAGCTCAGCAGCGGCTTACACAGCTTCACTGTATCATCTCGATCAGCCCATCCAGCGCTTCTCTGCTGACGACCGCGCGGCTGTGACGCAATGGAGACACAAAGAGGAGGGCGAGACT													
Lp00C_Ref_L13	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
Lg00C_Cons_Col.3	CGCTGAGGAGCGCGACGCGCCGCTGGCATCACGACCATCTTCGGACCACTCGGACTCGTGGATGTATCCTGAGGAGCAACCTTCCAGAGATGAGCTGGCGACTGGATTTGGTCCC													
Consensus	CGCTGAGGAGCGCGACGCGCCGCTGGCATCACGACCATCTTCGGACCACTCGGACTCGTGGATGTATCCTGAGGAGCAACCTTCCAGAGATGAGCTGGCGACTGGATTTGGTCCC													
Lp00C_Ref_L13	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1911				
Lg00C_Cons_Col.3	GGACATGGGAGTACACCATTTCTGCCCGCCGCCCCCTTCAACGGCTTCTGACGACCGCTTTGATGGGTGAGCTTATGGCTTATAG													
Consensus	GGACATGGGAGTACACCATTTCTGCCCGCCGCCCCCTTCAACGGCTTCTGACGACCGCTTTGATGGGTGAGCTTATGGCTTATAG													

Apêndice IV

Alinhamento da sequência de aminoácidos de ODC de *L. guyanensis* M9945 contra sequência referência de *L. panamensis* L13 (LPAL13_120007700)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130																																																																																																																		
LpODC_Ref_L13	M	N	T	H	V	P	P	P	S	V	L	D	V	D	A	V	P	D	R	L	H	T	C	K	R	R	L	L	E	Q	Y	H	I	D	S	R	S	T	T	L	N	P	L	S	R	A	N	T	T	A	G	R	N	E	A	R	Q	L	S	D	V	D	A	A	Q	P	I	L	P	T	E	C	N	K	Q	T	P	E	Y	Y	Q	E	V	A	L	G	A	A	D	S	T	V	N	Q	H	T	A	V	A	R	S	D	I	V	L	F	F	L	E	G	S	Q	A	V	N	G	L	C	F	S	P	P	T	Y	G	H		
LgODC_Cons_Col_3	M	N	T	H	V	P	P	P	S	V	L	D	V	D	A	V	P	D	R	L	H	T	C	K	R	R	L	L	E	Q	Y	H	I	D	S	R	S	T	T	L	N	P	L	S	R	A	N	T	T	A	G	R	N	E	A	R	Q	L	S	D	V	D	A	A	Q	P	I	L	P	T	E	C	N	K	Q	T	P	E	Y	Y	Q	E	V	A	L	G	A	A	D	S	T	V	N	Q	H	T	A	V	A	R	S	D	I	V	L	F	F	L	E	G	S	Q	A	V	N	G	L	C	F	S	P	P	T	Y	G	H		
Consensus	M	N	T	H	V	P	P	P	S	V	L	D	V	D	A	V	P	D	R	L	H	T	C	K	R	R	L	L	E	Q	Y	H	I	D	S	R	S	T	T	L	N	P	L	S	R	A	N	T	T	A	G	R	N	E	A	R	Q	L	S	D	V	D	A	A	Q	P	I	L	P	T	E	C	N	K	Q	T	P	E	Y	Y	Q	E	V	A	L	G	A	A	D	S	T	V	N	Q	H	T	A	V	A	R	S	D	I	V	L	F	F	L	E	G	S	Q	A	V	N	G	L	C	F	S	P	P	T	Y	G	H		
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260																																																																																																																		
LpODC_Ref_L13	R	T	A	E	R	R	A	I	Y	A	V	F	K	K	Y	N	V	A	T	H	L	P	V	S	P	A	L	A	T	A	Q	H	H	S	H	H	Q	H	A	S	I	H	A	I	N	K	M	P	I	E	T	R	E	Q	Y	H	R	L	S	N	V	Y	I	E	K	A	V	K	A	A	A	A	A	A	T	T	T	P	T	N	C	T	I	S	D	V	P	R	H	E	P	D	P	F	Y	I	I	D	L	G	R	V	V	E	Q	A	R	A	R	H	E	L	P	M	V	R	P	Y	F	A	V							
LgODC_Cons_Col_3	R	T	A	E	R	R	A	I	Y	A	V	F	K	K	Y	N	V	A	T	H	L	P	V	S	P	A	L	A	T	A	Q	H	H	S	H	H	Q	H	A	S	I	H	A	I	N	K	M	P	I	E	T	R	E	Q	Y	H	R	L	S	N	V	Y	I	E	K	A	V	K	A	A	A	A	A	A	T	T	T	P	T	N	C	T	I	S	D	V	P	R	H	E	P	D	P	F	Y	I	I	D	L	G	R	V	V	E	Q	A	R	A	R	H	E	L	P	M	V	R	P	Y	F	A	V							
Consensus	R	T	A	E	R	R	A	I	Y	A	V	F	K	K	Y	N	V	A	T	H	L	P	V	S	P	A	L	A	T	A	Q	H	H	S	H	H	Q	H	A	S	I	H	A	I	N	K	M	P	I	E	T	R	E	Q	Y	H	R	L	S	N	V	Y	I	E	K	A	V	K	A	A	A	A	A	A	T	T	T	P	T	N	C	T	I	S	D	V	P	R	H	E	P	D	P	F	Y	I	I	D	L	G	R	V	V	E	Q	A	R	A	R	H	E	L	P	M	V	R	P	Y	F	A	V							
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390																																																																																																																		
LpODC_Ref_L13	K	S	N	P	K	L	A	L	L	E	V	L	G	A	L	G	S	G	F	D	C	A	S	K	G	E	I	Q	T	V	L	D	N	H	L	V	A	S	P	D	I	I	F	A	N	P	C	K	Q	P	G	D	H	R	E	A	R	Q	R	G	V	T	Y	V	T	V	D	N	L	L	E	I	E	K	I	S	R	L	M	P	S	A	R	A	V	I	R	I	K	T	N	D	S	K	A	K	C	A	F	S	T	K	F	G	V	P	L	N	D	V	E	S	L	L	Q	A	R	Q	F	K	V	D	V	Y	G	V	S	F
LgODC_Cons_Col_3	K	S	N	P	K	L	A	L	L	E	V	L	G	A	L	G	S	G	F	D	C	A	S	K	G	E	I	Q	T	V	L	D	N	H	L	V	A	S	P	D	I	I	F	A	N	P	C	K	Q	P	G	D	H	R	E	A	R	Q	R	G	V	T	Y	V	T	V	D	N	L	L	E	I	E	K	I	S	R	L	M	P	S	A	R	A	V	I	R	I	K	T	N	D	S	K	A	K	C	A	F	S	T	K	F	G	V	P	L	N	D	V	E	S	L	L	Q	A	R	Q	F	K	V	D	V	Y	G	V	S	F
Consensus	K	S	N	P	K	L	A	L	L	E	V	L	G	A	L	G	S	G	F	D	C	A	S	K	G	E	I	Q	T	V	L	D	N	H	L	V	A	S	P	D	I	I	F	A	N	P	C	K	Q	P	G	D	H	R	E	A	R	Q	R	G	V	T	Y	V	T	V	D	N	L	L	E	I	E	K	I	S	R	L	M	P	S	A	R	A	V	I	R	I	K	T	N	D	S	K	A	K	C	A	F	S	T	K	F	G	V	P	L	N	D	V	E	S	L	L	Q	A	R	Q	F	K	V	D	V	Y	G	V	S	F
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520																																																																																																																		
LpODC_Ref_L13	H	V	G	S	N	S	D	P	A	T	Y	S	A	V	R	D	A	Y	H	V	F	Q	A	S	Q	Y	G	F	N	C	T	L	L	D	I	G	G	G	F	S	V	E	T	N	T	A	S	G	E	I	F	E	V	I	A	R	A	I	R	P	V	L	E	E	L	F	G	G	G	D	V	I	I	S	E	P	G	R	Y	F	T	A	S	T	H	A	L	L	V	N	V	F	A	S	R	K	L	R	M	S	D	V	E	K	A	S	Y	Q	A	L	S	V	V	P	H	D	E	S	E	E	Y	Q	Y					
LgODC_Cons_Col_3	H	V	G	S	N	S	D	P	A	T	Y	S	A	V	R	D	A	Y	H	V	F	Q	A	S	Q	Y	G	F	N	C	T	L	L	D	I	G	G	G	F	S	V	E	T	N	T	A	S	G	E	I	F	E	V	I	A	R	A	I	R	P	V	L	E	E	L	F	G	G	G	D	V	I	I	S	E	P	G	R	Y	F	T	A	S	T	H	A	L	L	V	N	V	F	A	S	R	K	L	R	M	S	D	V	E	K	A	S	Y	Q	A	L	S	V	V	P	H	D	E	S	E	E	Y	Q	Y					
Consensus	H	V	G	S	N	S	D	P	A	T	Y	S	A	V	R	D	A	Y	H	V	F	Q	A	S	Q	Y	G	F	N	C	T	L	L	D	I	G	G	G	F	S	V	E	T	N	T	A	S	G	E	I	F	E	V	I	A	R	A	I	R	P	V	L	E	E	L	F	G	G	G	D	V	I	I	S	E	P	G	R	Y	F	T	A	S	T	H	A	L	L	V	N	V	F	A	S	R	K	L	R	M	S	D	V	E	K	A	S	Y	Q	A	L	S	V	V	P	H	D	E	S	E	E	Y	Q	Y					
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	636																																																																																																																			
LpODC_Ref_L13	Y	N	D	L	Y	H	S	F	N	C	I	I	F	D	H	A	H	P	T	L	L	L	N	D	G	G	A	D	A	M	E	D	N	K	E	E	G	E	T	S	L	S	R	R	R	R	L	R	I	T	T	I	F	G	P	T	C	D	S	L	C	I	L	R	K	Q	P	F	P	E	N	K	L	G	D	I	L	V	P	D	H	S	Y	T	I	S	A	R	A	P	N	G	F	S	T	H	R	F	E	H	V	S	S	I	A	L																						
LgODC_Cons_Col_3	Y	N	D	L	Y	H	S	F	N	C	I	I	F	D	H	A	H	P	T	L	L	L	N	D	G	G	A	D	A	M	E	D	N	K	E	E	G	E	T	S	L	S	R	R	R	R	L	R	I	T	T	I	F	G	P	T	C	D	S	L	C	I	L	R	K	Q	P	F	P	E	N	K	L	G	D	I	L	V	P	D	H	S	Y	T	I	S	A	R	A	P	N	G	F	S	T	H	R	F	E	H	V	S	S	I	A	L																						
Consensus	Y	N	D	L	Y	H	S	F	N	C	I	I	F	D	H	A	H	P	T	L	L	L	N	D	G	G	A	D	A	M	E	D	N	K	E	E	G	E	T	S	L	S	R	R	R	R	L	R	I	T	T	I	F	G	P	T	C	D	S	L	C	I	L	R	K	Q	P	F	P	E	N	K	L	G	D	I	L	V	P	D	H	S	Y	T	I	S	A	R	A	P	N	G	F	S	T	H	R	F	E	H	V	S	S	I	A	L																						

Apêndice VI

Alinhamento da sequência de aminoácidos de GCS de *L. guyanensis* M9945 contra sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (LbrM.18.1700)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LbGCS_Ref_M2904	MGLLTTGGIPMRWGTDRANKATPHVSAHGIIQQLNLFHKKELRGMPLWGEELHQLTHIQNTITLVEGAPVMERLRARSDNCAIUNPEYGSFHYESTPNQPYNLVESLNSVSDITIRYMLNKE													
LgGCS_Cons_Col.4	MGLLTTGGaPMRWGTDRANKATPHVSAHGIIQQLNLFnSKKELRGMPLWGEELHQLTHIQNTITLVEGAPVMERLRARSDNCAIUNPEYGSFHYESTPNQPYNLVESLNSVSDITIRYMLNKE													
Consensus	MGLLTTGGaPMRWGTDRANKATPHVSAHGIIQQLNLFnSKKELRGMPLWGEELHQLTHIQNTITLVEGAPVMERLRARSDNCAIUNPEYGSFHYESTPNQPYNLVESLNSVSDITIRYMLNKE													
LbGCS_Ref_M2904	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
LgGCS_Cons_Col.4	APPGVVGTTFVTFPLNGQGNFYNCDDKSSPYSQSLFVLDACINQTHPFANLTHNIRLRGRKVCILVPLYVDTRTHEITVDPRLNIDLSPCNNDIYCPAITTERNKSSELYAETSSPNAALAPTCTADP													
Consensus	APPGVVGTTFVTFPLNGQGNFYNCDDKSSPYSQSLFVLDACINQTHPFANLTHNIRLRGRKVCILVPLYVDTRTHEITVDPRLNIDLSPCNNDIYCPAITTERNKSSELYAETSSPNAALAPTCTADP													
LbGCS_Ref_M2904	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
LgGCS_Cons_Col.4	SEEGCLATETMKHLFTPATLKYYAQYFKGQQRADYQQRCAASLYRVPVSHPCITYDCHAFGHSALQVTHQLDNIIEARYYYDQLAILCPVFLALTSATPFQKGLLCDQVRLTIAGAVDDRRIDEV													
Consensus	SEEGCLaTETMKHLFTPATLKYYAQYFKGQQRADYQQRCAASLYRVPVSHPCeIYDCHAFGHSALQVTHQLDNIIEARYYYDQLAILCPVFLALTSATPFQKGLLCDQVRLTIAGAVDDRRIDEV													
LbGCS_Ref_M2904	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
LgGCS_Cons_Col.4	PHILKSRVDSISLFIISDTVENLEDFNDAPVQINHSYCELEKAGVDTRLARHIAHLFIRDPLVYDQIIDDRAHMDHFENIQSTNQSVRFKPPPMDSDIGARVEFRVMEIQPTPFENAFVFIPLL													
Consensus	PHILKSRVDSISLFIISDTVENLEDFNDAPVQINHSYCELEKAGVDTRLARHIAHLFIRDPLVYEQIIDDRAHMDHFENIQSTNQSVRFKPPPMDSDIGARVEFRVMEIQPTPFENAFVFIPLL													
LbGCS_Ref_M2904	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
LgGCS_Cons_Col.4	TKAIIINYKICFYTKISVVDENHGRAHINPCGEKYVMKDIKIFSNKCTANEAETAENTIDEIFNGKEGGFYGLIPLVCRYLDESKRSPVNSYLRFSLHRASGCIPTRAQYRKFVTHPDYKDRSLSG													
Consensus	TKAIIINYKICFYTKISVVDENHGRAHINPCGEKYVMKDIKIFSNKCTANEAETAENTIDEIFNGKEGGFYGLIPLVCRYLDESKRSPVNSYLRFSLHRASGCIPTRAQYRKFVTHPDYKDRSLSG													
LbGCS_Ref_M2904	651	660	670	680	688									
LgGCS_Cons_Col.4	IIARDLVQRIHGLATRQIHDPAYLPHSTFEAEKQESSA													
Consensus	IIARDLVQRIHGLATRQIHDPAYLPHSTFEAEKQESSA													

Apêndice VII

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *gcs* de *L. guyanensis* M9945 contra sequência referência de *L. panamensis* L13 (LPAL13_180019700)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Lp6CS_Ref_L13	ATGGGCTCTTGCACACTGGTGGGGCCCGGATGGGGTGGGGCCAGCGTGAARACACACAGGCTATCCGACGTAAGTGGCCACGCGCATTCAGCATTCCTCAACCTCTTCACACGAAAHAGAGAGCTGC													
Lg6CS_Cons_Col.4	ATGGGCTCTTGCACACTGGTGGGGCCCGGATGGGGTGGGGCCAGCGTGAARACACACAGGCTATCCGACGTAAGTGGCCACGCGCATTCAGCATTCCTCAACCTCTTCACACGAAAHAGAGAGCTGC													
Consensus	ATGGGCTCTTGCACACTGGTGGGGCCCGGATGGGGTGGGGCCAGCGTGAARACACACAGGCTATCCGACGTAAGTGGCCACGCGCATTCAGCATTCCTCAACCTCTTCACACGAAAHAGAGAGCTGC													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Lp6CS_Ref_L13	GTGGCATGCCATTTTGTGGGGTGGAGGCTGGAGCATCAGCTGATCCATATCCAGACACACACATCACCTTAGCGTTGAGAGTGC CGCGGTGATGGAGGTTGAGGGCAGCGCTGCACACTGCGC													
Lg6CS_Cons_Col.4	GTGGCATGCCATTTTGTGGGGTGGAGGCTGGAGCATCAGCTGATCCATATCCAGACACACACATCACCTTAGCGTTGAGAGTGC CGCGGTGATGGAGGTTGAGGGCAGCGCTGCACACTGCGC													
Consensus	GTGGCATGCCATTTTGTGGGGTGGAGGCTGGAGCATCAGCTGATCCATATCCAGACACACACATCACCTTAGCGTTGAGAGTGC CGCGGTGATGGAGGTTGAGGGCAGCGCTGCACACTGCGC													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Lp6CS_Ref_L13	CCTATGGACCCCGAGTATGGCAGCTTCATGGTCGAGACACACCAATCAGCCGATCARTCTGTGGTGGAGAGCTCAACTCCGTTGGAGATATCATACGGCCGGTACACATGCTCACACAGGAG													
Lg6CS_Cons_Col.4	CCTATGGACCCCGAGTATGGCAGCTTCATGGTCGAGACACACCAATCAGCCGATCARTCTGTGGTGGAGAGCTCAACTCCGTTGGAGATATCATACGGCCGGTACACATGCTCACACAGGAG													
Consensus	CCTATGGACCCCGAGTATGGCAGCTTCATGGTCGAGACACACCAATCAGCCGATCARTCTGTGGTGGAGAGCTCAACTCCGTTGGAGATATCATACGGCCGGTACACATGCTCACACAGGAG													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Lp6CS_Ref_L13	GCGCTCCCGGGGTGGTGGCACCACCTTGTGACATTTCCATGATGGCCAGGGGACCTTTGTCAACTGCGATGATAGAGGCTCCGTAATCGAGTCCGCTTTTGTCTTCGACGGTGCATCACC													
Lg6CS_Cons_Col.4	GCGCTCCCGGGGTGGTGGCACCACCTTGTGACATTTCCATGATGGCCAGGGGACCTTTGTCAACTGCGATGATAGAGGCTCCGTAATCGAGTCCGCTTTTGTCTTCGACGGTGCATCACC													
Consensus	GCGCTCCCGGGGTGGTGGCACCACCTTGTGACATTTCCATGATGGCCAGGGGACCTTTGTCAACTGCGATGATAGAGGCTCCGTAATCGAGTCCGCTTTTGTCTTCGACGGTGCATCACC													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
Lp6CS_Ref_L13	AGACGATCCCGGATTCGCGAATTCGACATGACATTCGACTGCGCCGCGCCGAGAGGTTGCATCTGGTGGCCGTGACGTTGAGACACGATGATGGAGACGACGGTGGACCCCGGCTGACAT													
Lg6CS_Cons_Col.4	AGACGATCCCGGATTCGCGAATTCGACATGACATTCGACTGCGCCGCGCCGAGAGGTTGCATCTGGTGGCCGTGACGTTGAGACACGATGATGGAGACGACGGTGGACCCCGGCTGACAT													
Consensus	AGACGATCCCGGATTCGCGAATTCGACATGACATTCGACTGCGCCGCGCCGAGAGGTTGCATCTGGTGGCCGTGACGTTGAGACACGATGATGGAGACGACGGTGGACCCCGGCTGACAT													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
Lp6CS_Ref_L13	TGATCTGATCCCGACACACACACATATATGCCCCGGATTACAGGCGAAGGATAGGCGAGCGAGCTACGCGAGACGAGCTCGCCACACCCGCGTAGCGCCACACGACATACCGATCCG													
Lg6CS_Cons_Col.4	TGATCTGATCCCGACACACACACATATATGCCCCGGATTACAGGCGAAGGATAGGCGAGCGAGCTACGCGAGACGAGCTCGCCACACCCGCGTAGCGCCACACGACATACCGATCCG													
Consensus	TGATCTGATCCCGACACACACACATATATGCCCCGGATTACAGGCGAAGGATAGGCGAGCGAGCTACGCGAGACGAGCTCGCCACACCCGCGTAGCGCCACACGACATACCGATCCG													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
Lp6CS_Ref_L13	AGCAGGGGGGGTACCTTGTCCAGGACATGAGGACCTTTTCACACTGACAGCGTGAATACACGCGCCATACCTCACAGGGCAGCAGCGCGAGATGTGACAGCGCTGCACCGCTCCCTCT													
Lg6CS_Cons_Col.4	AGCAGGGGGGGTACCTTGTCCAGGACATGAGGACCTTTTCACACTGACAGCGTGAATACACGCGCCATACCTCACAGGGCAGCAGCGCGAGATGTGACAGCGCTGCACCGCTCCCTCT													
Consensus	AGCAGGGGGGGTACCTTGTCCAGGACATGAGGACCTTTTCACACTGACAGCGTGAATACACGCGCCATACCTCACAGGGCAGCAGCGCGAGATGTGACAGCGCTGCACCGCTCCCTCT													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Lp6CS_Ref_L13	ACCGCTGCCCTCGGTGACGACCCCGTGTATACATGACGTCGATGGCTTTGGATGGTGGACGCGCTTCGAAAGTACGATGACGTCGACGTCGACACACATATCGAGCTCCGCTAGCTGTACGCGACCT													
Lg6CS_Cons_Col.4	ACCGCTGCCCTCGGTGACGACCCCGTGTATACATGACGTCGATGGCTTTGGATGGTGGACGCGCTTCGAAAGTACGATGACGTCGACGTCGACACACATATCGAGCTCCGCTAGCTGTACGCGACCT													
Consensus	ACCGCTGCCCTCGGTGACGACCCCGTGTATACATGACGTCGATGGCTTTGGATGGTGGACGCGCTTCGAAAGTACGATGACGTCGACGTCGACACACATATCGAGCTCCGCTAGCTGTACGCGACCT													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
Lp6CS_Ref_L13	CGCATCTGTGCCAGTGTCTGGCTCCTCCTGCGCCAGCCGTTTCAGAGGGTCTTCTGCGACACAGATGTGCGGTGGCTGACTATCGCCGGCCGTTGACGACCCCGCATGGATGGAGTG													
Lg6CS_Cons_Col.4	CGCATCTGTGCCAGTGTCTGGCTCCTCCTGCGCCAGCCGTTTCAGAGGGTCTTCTGCGACACAGATGTGCGGTGGCTGACTATCGCCGGCCGTTGACGACCCCGCATGGATGGAGTG													
Consensus	CGCATCTGTGCCAGTGTCTGGCTCCTCCTGCGCCAGCCGTTTCAGAGGGTCTTCTGCGACACAGATGTGCGGTGGCTGACTATCGCCGGCCGTTGACGACCCCGCATGGATGGAGTG													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
Lp6CS_Ref_L13	CCTCACATCTCAAGTCCCGTACGACTCTATCCCTCTTCATCAGGACACAGCTCGAARACTTGAGGACTTCACGACGCGACCTTGAGAGATCACACCTCGATCTGAGCTGTGGAGAGGCTG													
Lg6CS_Cons_Col.4	CCTCACATCTCAAGTCCCGTACGACTCTATCCCTCTTCATCAGGACACAGCTCGAARACTTGAGGACTTCACGACGCGACCTTGAGAGATCACACCTCGATCTGAGCTGTGGAGAGGCTG													
Consensus	CCTCACATCTCAAGTCCCGTACGACTCTATCCCTCTTCATCAGGACACAGCTCGAARACTTGAGGACTTCACGACGCGACCTTGAGAGATCACACCTCGATCTGAGCTGTGGAGAGGCTG													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
Lp6CS_Ref_L13	GTGTGGACACCGGTTGGCGAGACACATTCGACATTTGTCATTCGTGATCCGCTCGTGTGATGATGAGCAGATGATGCACATCGATGACGACACACACCGGACCACTTCGAGAAATCCAGTCCACTAA													
Lg6CS_Cons_Col.4	GTGTGGACACCGGTTGGCGAGACACATTCGACATTTGTCATTCGTGATCCGCTCGTGTGATGATGAGCAGATGATGCACATCGATGACGACACACACCGGACCACTTCGAGAAATCCAGTCCACTAA													
Consensus	GTGTGGACACCGGTTGGCGAGACACATTCGACATTTGTCATTCGTGATCCGCTCGTGTGATGATGAGCAGATGATGCACATCGATGACGACACACACCGGACCACTTCGAGAAATCCAGTCCACTAA													
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Lp6CS_Ref_L13	CTGGCAGACGCTCCGCTTCAGGCTCCACCGATAGACAGCGACATTTGGTGGCGGTGGAGTCCGTTGATGGAGATTCAGCAGCGCATTCGAGAGCGCTGCTTCGCTGCTTTATCCGCTCTA													
Lg6CS_Cons_Col.4	CTGGCAGACGCTCCGCTTCAGGCTCCACCGATAGACAGCGACATTTGGTGGCGGTGGAGTCCGTTGATGGAGATTCAGCAGCGCATTCGAGAGCGCTGCTTCGCTGCTTTATCCGCTCTA													
Consensus	CTGGCAGACGCTCCGCTTCAGGCTCCACCGATAGACAGCGACATTTGGTGGCGGTGGAGTCCGTTGATGGAGATTCAGCAGCGCATTCGAGAGCGCTGCTTCGCTGCTTTATCCGCTCTA													
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
Lp6CS_Ref_L13	ACCAAGGCATCATCACTATAGATCTGCTTCTACACGAGATTTCTGCTGTGACGAAACATGGGTGCGCACATCAGCTCAACCCAGCTGGGGAGAGTACGTTATGGCGAGGACATTTCTCCA													
Lg6CS_Cons_Col.4	ACCAAGGCATCATCACTATAGATCTGCTTCTACACGAGATTTCTGCTGTGACGAAACATGGGTGCGCACATCAGCTCAACCCAGCTGGGGAGAGTACGTTATGGCGAGGACATTTCTCCA													
Consensus	ACCAAGGCATCATCACTATAGATCTGCTTCTACACGAGATTTCTGCTGTGACGAAACATGGGTGCGCACATCAGCTCAACCCAGCTGGGGAGAGTACGTTATGGCGAGGACATTTCTCCA													
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
Lp6CS_Ref_L13	ACAAAGTCACCGCAACGAGGCTGAGACGGCGGCGATGACATTCGACAAATCTTCACGCGAGGAGGGTGGCTTCATGGACTATACCGCTGCTGTGCCCTACCTCGACAGCGAGGAGCGGAC													
Lg6CS_Cons_Col.4	ACAAAGTCACCGCAACGAGGCTGAGACGGCGGCGATGACATTCGACAAATCTTCACGCGAGGAGGGTGGCTTCATGGACTATACCGCTGCTGTGCCCTACCTCGACAGCGAGGAGCGGAC													
Consensus	ACAAAGTCACCGCAACGAGGCTGAGACGGCGGCGATGACATTCGACAAATCTTCACGCGAGGAGGGTGGCTTCATGGACTATACCGCTGCTGTGCCCTACCTCGACAGCGAGGAGCGGAC													
	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
Lp6CS_Ref_L13	CCCTGTGGTAATTTCTACTTGAAGTTCCTCTCCATGCGGCCCTGGCTGTATTCCTCCACGACGCGAGTACATGCGCAGTGTTCACGACACACCCAGCTACAGGCTGACTTCGCTCAGTGGT													
Lg6CS_Cons_Col.4	CCCTGTGGTAATTTCTACTTGAAGTTCCTCTCCATGCGGCCCTGGCTGTATTCCTCCACGACGCGAGTACATGCGCAGTGTTCACGACACACCCAGCTACAGGCTGACTTCGCTCAGTGGT													
Consensus	CCCTGTGGTAATTTCTACTTGAAGTTCCTCTCCATGCGGCCCTGGCTGTATTCCTCCACGACGCGAGTACATGCGCAGTGTTCACGACACACCCAGCTACAGGCTGACTTCGCTCAGTGGT													
	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	
Lp6CS_Ref_L13	ATCATCGACCGGACCTAGTGCAGGCTATACAGGCTGGCCAGACAGATTCACGACCCGCGTACCTTCTATGACACCTTCAGGCTGAGAACAGGAGAGCAGTCGATAG													
Lg6CS_Cons_Col.4	ATCATCGACCGGACCTAGTGCAGGCTATACAGGCTGGCCAGACAGATTCACGACCCGCGTACCTTCTATGACACCTTCAGGCTGAGAACAGGAGAGCAGTCGATAG													
Consensus	ATCATCGACCGGACCTAGTGCAGGCTATACAGGCTGGCCAGACAGATTCACGACCCGCGTACCTTCTATGACACCTTCAGGCTGAGAACAGGAGAGCAGTCGATAG													

Apêndice VIII

Alinhamento da sequência de aminoácidos de GCS de *L. guyanensis* M9945 contra sequência referência de *L. panamensis* L13 (LPAL13_180019700)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LpGCS_Ref_113	MGLLTTGGAPHRAGTDANKKATPHYSAHGIQQFLNLFNSKKELRGMPLWGEELHQLTHIQDNTITL SVESAPYMERLRARSDNCALWPEYGSFYVESTPNQPYNLSVESLNSVEDIITRRYNHLNKE													
LgGCS_Cons_Col_4	MGLLTTGGAPHRAGTDANKKATPHYSAHGIQQFLNLFNSKKELRGMPLWGEELHQLTHIQDNTITL SVESAPYMERLRARSDNCALWPEYGSFYVESTPNQPYNLSVESLNSVEDIITRRYNHLNKE													
Consensus	MGLLTTGGAPHRAGTDANKKATPHYSAHGIQQFLNLFNSKKELRGMPLWGEELHQLTHIQDNTITL SVESAPYMERLRARSDNCALWPEYGSFYVESTPNQPYNLSVESLNSVEDIITRRYNHLNKE													
LpGCS_Ref_113	APPGVVGTLLVTFPLMGQGNFVNCDDKSSPYQSFLVLDACINQTHPFANLTHNIRLRGRKVCILVPLYVDTRTHETTVDPRLNIDLNPRNNDIYCPAITSERNKASELYAETSSPNAALAPTSTDP													
LgGCS_Cons_Col_4	APPGVVGTLLVTFPLMGQGNFVNCDDKSSPYQSFLVLDACINQTHPFANLTHNIRLRGRKVCILVPLYVDTRTHETTVDPRLNIDLNPRNNDIYCPAITSERNKASELYAETSSPNAALAPTSTDP													
Consensus	APPGVVGTLLVTFPLMGQGNFVNCDDKSSPYQSFLVLDACINQTHPFANLTHNIRLRGRKVCILVPLYVDTRTHETTVDPRLNIDLNPRNNDIYCPAITSERNKASELYAETSSPNAALAPTSTDP													
LpGCS_Ref_113	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
LgGCS_Cons_Col_4	SEGGYLVTETMKHLFTPATLKYYAQYFTGQQRADYQQRCTASLYRVPVSHPCIIYDCHAFGNGDSALQVTHQLDNIIEARYYYDQLAILCPVFLALTSATPFQKGLL CDTQVRLTIAGAVDDRRMDEV													
Consensus	SEGGYLVTETMKHLFTPATLKYYAQYFTGQQRADYQQRCTASLYRVPVSHPCIIYDCHAFGNGDSALQVTHQLDNIIEARYYYDQLAILCPVFLALTSATPFQKGLL CDTQVRLTIAGAVDDRRMDEV													
LpGCS_Ref_113	PHILKSRYSISLFSIDTVENLEDFNDAPVEINHSYCELLEKAGVDTLARHIAHLFIRDPLVMEQMIIDDATHDHFENIQSTNQTVRFKPPPIDSIDGARVEFRVMEIQPTFENAAFVFIPLL													
LgGCS_Cons_Col_4	PHILKSRYSISLFSIDTVENLEDFNDAPVEINHSYCELLEKAGVDTLARHIAHLFIRDPLVMEQMIIDDATHDHFENIQSTNQTVRFKPPPIDSIDGARVEFRVMEIQPTFENAAFVFIPLL													
Consensus	PHILKSRYSISLFSIDTVENLEDFNDAPVEINHSYCELLEKAGVDTLARHIAHLFIRDPLVMEQMIIDDATHDHFENIQSTNQTVRFKPPPIDSIDGARVEFRVMEIQPTFENAAFVFIPLL													
LpGCS_Ref_113	TKAIIINYKICFYTTISVVDENHGRAHHINPRGEKYVHRKDI FSNKCTANAEATAAHTIDEIFNGKEGGFYGLIPLVCRYLDSERKRSPVNSYLRFLSHRASGCIPTAAQYMRKFVTTHPDYKRSRLSG													
LgGCS_Cons_Col_4	TKAIIINYKICFYTTISVVDENHGRAHHINPRGEKYVHRKDI FSNKCTANAEATAAHTIDEIFNGKEGGFYGLIPLVCRYLDSERKRSPVNSYLRFLSHRASGCIPTAAQYMRKFVTTHPDYKRSRLSG													
Consensus	TKAIIINYKICFYTTISVVDENHGRAHHINPRGEKYVHRKDI FSNKCTANAEATAAHTIDEIFNGKEGGFYGLIPLVCRYLDSERKRSPVNSYLRFLSHRASGCIPTAAQYMRKFVTTHPDYKRSRLSG													
LpGCS_Ref_113	651	660	670	680	688									
LgGCS_Cons_Col_4	IIARDLVQRINGLATRQIHDPAYLPHSTFEAEKQESSA													
Consensus	IIARDLVQRINGLATRQIHDPAYLPHSTFEAEKQESSA													

Apêndice IX

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *trys* de *L. braziliensis* M2904
contra sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (LbrM.27.2010)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LbTrys_Ref_M2904	ATCGCGCTTTGGARACAGCCGGTGGCTTCARATAGGCTGGGGACGCTCCCTTTGGTGTCTGCGAGGCTACGCCCGGGTGGCATCCCGGCTACACACACAGCATGATCACTATTCTCCCGGG													
LbTrys_Sons_Col.6	ATCGCGCTTTGGARACAGCCGGTGGCTTCARATAGGCTGGGGACGCTCCCTTTGGTGTCTGCGAGGCTACGCCCGGGTGGCATCCCGGCTACACACACAGCATGATCACTATTCTCCCGGG													
Consensus	ATCGCGCTTTGGARACAGCCGGTGGCTTCARATAGGCTGGGGACGCTCCCTTTGGTGTCTGCGAGGCTACGCCCGGGTGGCATCCCGGCTACACACACAGCATGATCACTATTCTCCCGGG													
LbTrys_Ref_M2904	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
LbTrys_Sons_Col.6	AGCGTAGCATTTAGGGGAACTTCTCTCGGGTTTAGATACAGTGCCTGAGTTCGCACGCCCTGGCTGGTGGCCAGGGGGTGGTGTGGCGAATGTGATTTGGGCTGCCACATTTTCAGCT													
Consensus	AGCGTAGCATTTAGGGGAACTTCTCTCGGGTTTAGATACAGTGCCTGAGTTCGCACGCCCTGGCTGGTGGCCAGGGGGTGGTGTGGCGAATGTGATTTGGGCTGCCACATTTTCAGCT													
LbTrys_Ref_M2904	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
LbTrys_Sons_Col.6	GARGAGGTCGCGACGCCGCCACGGCGGGGGTTCGCGGTTTGAAGTGTGCACCGGCCAGGAGGAGCGGAGGCCGACACACTTCTCATTACTCTCCACCGATGCATGCCGGTGGTTCAC													
Consensus	GARGAGGTCGCGACGCCGCCACGGCGGGGGTTCGCGGTTTGAAGTGTGCACCGGCCAGGAGGAGCGGAGGCCGACACACTTCTCATTACTCTCCACCGATGCATGCCGGTGGTTCAC													
LbTrys_Ref_M2904	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
LbTrys_Sons_Col.6	GTCAAGGTTATACCGAGGTGGCGATGACTACGTGTGGTTGCGGATCAGAACTCCGCTCCACAGTGGGATCCCTACCGTACAGGCTGARGCTTGGACACAGGACGGATTTGGACCATCA													
Consensus	GTCAAGGTTATACCGAGGTGGCGATGACTACGTGTGGTTGCGGATCAGAACTCCGCTCCACAGTGGGATCCCTACCGTACAGGCTGARGCTTGGACACAGGACGGATTTGGACCATCA													
LbTrys_Ref_M2904	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
LbTrys_Sons_Col.6	TCGATGATATTACGTGGACGACATCGAATTCACCTTGGATGGGTGACATTTCTGGTGTGAGAACCGGGCTGAGGGGGCCGCCGGTGGCATTCGATCACTATTGACTTCAGTGAACACCGAA													
Consensus	TCGATGATATTACGTGGACGACATCGAATTCACCTTGGATGGGTGACATTTCTGGTGTGAGAACCGGGCTGAGGGGGCCGCCGGTGGCATTCGATCACTATTGACTTCAGTGAACACCGAA													
LbTrys_Ref_M2904	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
LbTrys_Sons_Col.6	GCCGACTCTGCTGCTCGAGCTTGTGGTGGAGGAGCGAGCCGATTTGGCTGACCTGACACGCCCTGCGAGCGACTTTCGTTGAGAGATTCGCGATGGACCTGAGCCGCTCCCGCTGGAGAG													
Consensus	GCCGACTCTGCTGCTCGAGCTTGTGGTGGAGGAGCGAGCCGATTTGGCTGACCTGACACGCCCTGCGAGCGACTTTCGTTGAGAGATTCGCGATGGACCTGAGCCGCTCCCGCTGGAGAG													
LbTrys_Ref_M2904	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
LbTrys_Sons_Col.6	ATGGTGGCCACTACTACGAGTCGATCATGAGTCCACCTGCGGTCGATCGCTACGGCCACAGCTGACGCCATCTTATGGAGCACACCGCAGGATGATGAGAGCGATGAGAGCTCCGGCTTT													
Consensus	ATGGTGGCCACTACTACGAGTCGATCATGAGTCCACCTGCGGTCGATCGCTACGGCCACAGCTGACGCCATCTTATGGAGCACACCGCAGGATGATGAGAGCGATGAGAGCTCCGGCTTT													
LbTrys_Ref_M2904	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
LbTrys_Sons_Col.6	TCTGATTCCTGAGGACTTCTGGCCCGGATTCGCCACTCTTGGAAATCCAGCAGCAGCATTCATCTGGTGGTTCGACTTTGCCCTTACACACAGGACATCGAGATCAAGTGTTCAGTACACAC													
Consensus	TCTGATTCCTGAGGACTTCTGGCCCGGATTCGCCACTCTTGGAAATCCAGCAGCAGCATTCATCTGGTGGTTCGACTTTGCCCTTACACACAGGACATCGAGATCAAGTGTTCAGTACACAC													
LbTrys_Ref_M2904	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
LbTrys_Sons_Col.6	TGACAGCGCTGACGCTGCTGGATGCGCCGCGATTCAGCAAAAGTGGCCGATCGTGGGGCTGACACAGGAGGGCCGCCGAGCTCCGGCTTCGAGTGGAGCGCACCTCAAGATGGCTGGGCC													
Consensus	TGACAGCGCTGACGCTGCTGGATGCGCCGCGATTCAGCAAAAGTGGCCGATCGTGGGGCTGACACAGGAGGGCCGCCGAGCTCCGGCTTCGAGTGGAGCGCACCTCAAGATGGCTGGGCC													
LbTrys_Ref_M2904	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
LbTrys_Sons_Col.6	TCCAGCGGGCGACTGGCCGCTTCACTTCTGGTGTATAGGAGGGGGAGGAGCAGTACACGCCCTTACTGCTGACGGCCGCTGAGGCGCTGGGGCTGGGGTAGAGTGTAGGCTGTGCATGATTTGATG													
Consensus	TCCAGCGGGCGACTGGCCGCTTCACTTCTGGTGTATAGGAGGGGGAGGAGCAGTACACGCCCTTACTGCTGACGGCCGCTGAGGCGCTGGGGCTGGGGTAGAGTGTAGGCTGTGCATGATTTGATG													
LbTrys_Ref_M2904	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
LbTrys_Sons_Col.6	AGTTTCACTTATAGGATGGCCACATTTGTCATAGCAGCGGGCTGGCCCTGCGAATGTGGAGACATGATGTGGAGTGGCGATACCGCATATATGCCCGGGAGGACCGGGCAGGG													
Consensus	AGTTTCACTTATAGGATGGCCACATTTGTCATAGCAGCGGGCTGGCCCTGCGAATGTGGAGACATGATGTGGAGTGGCGATACCGCATATATGCCCGGGAGGACCGGGCAGGG													
LbTrys_Ref_M2904	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
LbTrys_Sons_Col.6	CTGGAGCCGTCCTCCGAGGACAGGTCGCCCTGTGCACCTTCTCTCGGATGACTGGACATCTCTATTTCGAGCCGATGTGGAGGTCATTCGAGCACAGGGCCATCTGCCATGATCTAC													
Consensus	CTGGAGCCGTCCTCCGAGGACAGGTCGCCCTGTGCACCTTCTCTCGGATGACTGGACATCTCTATTTCGAGCCGATGTGGAGGTCATTCGAGCACAGGGCCATCTGCCATGATCTAC													
LbTrys_Ref_M2904	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
LbTrys_Sons_Col.6	CACATCACCCTCAGCACCCGCCATCTTGAAGCGGATACGATATCTGACGAGCTGCGCAGTGGGGATGCCAGAGCCGATTTGCGGCCATTTGGTACAGCTGACCATCTCTCCGGCG													
Consensus	CACATCACCCTCAGCACCCGCCATCTTGAAGCGGATACGATATCTGACGAGCTGCGCAGTGGGGATGCCAGAGCCGATTTGCGGCCATTTGGTACAGCTGACCATCTCTCCGGCG													
LbTrys_Ref_M2904	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
LbTrys_Sons_Col.6	ACGGCAGGTGCAGCTGAGTGGGTGGACATGAGCAGCGGACAGTGTCTTACCGAGCTATTCACACTGACGAGCAGGACGACTACTAGCCATATGGAGCTGGATGATCGGACACTT													
Consensus	ACGGCAGGTGCAGCTGAGTGGGTGGACATGAGCAGCGGACAGTGTCTTACCGAGCTATTCACACTGACGAGCAGGACGACTACTAGCCATATGGAGCTGGATGATCGGACACTT													
LbTrys_Ref_M2904	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
LbTrys_Sons_Col.6	CAGCGTACCGCATCCCGAGGACAGTCCATCATCCCGCGTGGAGGCCCTTTGGTGTATTTCGATCAGGCGACAGCTCCCGCCCTGTGATACCCAGAGATGTCGACAGATGGCCAG													
Consensus	CAGCGTACCGCATCCCGAGGACAGTCCATCATCCCGCGTGGAGGCCCTTTGGTGTATTTCGATCAGGCGACAGCTCCCGCCCTGTGATACCCAGAGATGTCGACAGATGGCCAG													
LbTrys_Ref_M2904	1951	1959	-----											
LbTrys_Sons_Col.6	GACGAGTAA													
Consensus	GACGAGTAA													

Apêndice X

Alinhamento da sequência de aminoácidos de TryS de *L. braziliensis* M2904 contra sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (LbrM.27.2010)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LbTrys_Ref_M2904	MPSLEHEPVSFNRLGHVYFGALQGYAPGGIPAYSNKHDIHYFSGERSIEGNFFCGFKYQCFVARRALLYRKGVLVPLVNWACHIFQLKEYRDAATREGFAYLKYCNGETRKPEDRTLLIYSSTDACPVGH													
LbTryS_Cons_Col.6	MPSLEHEPVSFNRLGHVYFGALQGYAPGGIPAYSNKHDIHYFSGERSIEGNFFCGFKYQCFVARRALLYRKGVLVPLVNWACHIFQLKEYRDAATREGFAYLKYCNGETRKPEDRTLLIYSSTDACPVGH													
Consensus	MPSLEHEPVSFNRLGHVYFGALQGYAPGGIPAYSNKHDIHYFSGERSIEGNFFCGFKYQCFVARRALLYRKGVLVPLVNWACHIFQLKEYRDAATREGFAYLKYCNGETRKPEDRTLLIYSSTDACPVGH													
LbTrys_Ref_M2904	VSVITTEVGDYVCVADQNYRFHKWESSYAYRLKLEHKDGIHTIIDDINVDIEIPLGAVTFPGRENRAEGAPPVALHQSLYFSEPPKPYLLRRSFVVEEAKPNALDNDPAERLFVEEFGMDVSRSLLEE													
LbTryS_Cons_Col.6	VSVITTEVGDYVCVADQNYRFHKWESSYAYRLKLEHKDGIHTIIDDINVDIEIPLGAVTFPGRENRAEGAPPVALHQSLYFSEPPKPYLLRRSFVVEEAKPNALDNDPAERLFVEEFGMDVSRSLLEE													
Consensus	VSVITTEVGDYVCVADQNYRFHKWESSYAYRLKLEHKDGIHTIIDDINVDIEIPLGAVTFPGRENRAEGAPPVALHQSLYFSEPPKPYLLRRSFVVEEAKPNALDNDPAERLFVEEFGMDVSRSLLEE													
LbTrys_Ref_M2904	MYASYYESNHEFHLRCIAYGTQLHAIFHEATAQVIESDEKLRFCIPEDFWRIRHSKTIQTYISGRDFAFNNETCEIKCFEYNADSASTLLECGRIQQKHAESVGLNKEGTRSSGFAVERNLKHAHA													
LbTryS_Cons_Col.6	MYASYYESNHEFHLRCIAYGTQLHAIFHEATAQVIESDEKLRFCIPEDFWRIRHSKTIQTYISGRDFAFNNETCEIKCFEYNADSASTLLECGRIQQKHAESVGLNKEGTRSSGFAVERNLKHAHA													
Consensus	MYASYYESNHEFHLRCIAYGTQLHAIFHEATAQVIESDEKLRFCIPEDFWRIRHSKTIQTYISGRDFAFNNETCEIKCFEYNADSASTLLECGRIQQKHAESVGLNKEGTRSSGFAVERNLKHAHA													
LbTrys_Ref_M2904	SSGATGRVHFCVDKEGEEQYALYCLQAREAVGLECRCLCMFDEFHFDEDDGHIVSDGVRVRYAKTAMHESAITDYAAREERGEGHAKPSPKDKVRLCDLLGDDWDILYFEPHMKVIPSNAKILPHIY													
LbTryS_Cons_Col.6	SSGATGRVHFCVDKEGEEQYALYCLQAREAVGLECRCLCMFDEFHFDEDDGHIVSDGVRVRYAKTAMHESAITDYAAREERGEGHAKPSPKDKVRLCDLLGDDWDILYFEPHMKVIPSNAKILPHIY													
Consensus	SSGATGRVHFCVDKEGEEQYALYCLQAREAVGLECRCLCMFDEFHFDEDDGHIVSDGVRVRYAKTAMHESAITDYAAREERGEGHAKPSPKDKVRLCDLLGDDWDILYFEPHMKVIPSNAKILPHIY													
LbTrys_Ref_M2904	HNHPQHPAILKAEYELSDLRKCGYAKKPIVGRIGSNVTITSGDGEVHRESGGNYGKRNMHYQQLFPLTKQDDYYAIIIGAHMIGDTFSGTGIREDKSIIITGVESPFARIRIKADSLPAPVIPKQVDKNAE													
LbTryS_Cons_Col.6	HNHPQHPAILKAEYELSDLRKCGYAKKPIVGRIGSNVTITSGDGEVHRESGGNYGKRNMHYQQLFPLTKQDDYYAIIIGAHMIGDTFSGTGIREDKSIIITGVESPFARIRIKADSLPAPVIPKQVDKNAE													
Consensus	HNHPQHPAILKAEYELSDLRKCGYAKKPIVGRIGSNVTITSGDGEVHRESGGNYGKRNMHYQQLFPLTKQDDYYAIIIGAHMIGDTFSGTGIREDKSIIITGVESPFARIRIKADSLPAPVIPKQVDKNAE													
	6881													
LbTrys_Ref_M2904	II													
LbTryS_Cons_Col.6	DE													
Consensus	DE													

Apêndice XI

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *trys* de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) PP75 contra sequência referência de *L. infantum* JPCM5 (LinJ.27.1770)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LiTrys_Ref_JPCM5	ATGTCGCTCTGCCCGCGCGTCTGTAGCTTTAATAGCCGGGCCACATTCGGTTTGGTCTGTCAGGGATACGCCCGGGCGCGTCCAGCGTACAGCAACAGACACACTACTTCCGGCG													
LiTrys_Sons_Col.7.2	ATGTCGCTCTGCCCGCGCGTCTGTAGCTTTAATAGCCGGGCCACATTCGGTTTGGTCTGTCAGGGATACGCCCGGGCGCGTCCAGCGTACAGCAACAGACACACTACTTCCGGCG													
Consensus	ATGTCGCTCTGCCCGCGCGTCTGTAGCTTTAATAGCCGGGCCACATTCGGTTTGGTCTGTCAGGGATACGCCCGGGCGCGTCCAGCGTACAGCAACAGACACACTACTTCCGGCG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
LiTrys_Ref_JPCM5	AGCGAGCATGAGGGACACATCTCTTCGGCTCAGGTACAGTGCCTGAGTTTGGCGCCGCTGGCTGCTGGTGGCTAGGGGGCTGGTCTGCCGAGCTGACCTGGGCTGCCACATTTCCAAAT													
LiTrys_Sons_Col.7.2	AGCGAGCATGAGGGACACATCTCTTCGGCTCAGGTACAGTGCCTGAGTTTGGCGCCGCTGGCTGCTGGTGGCTAGGGGGCTGGTCTGCCGAGCTGACCTGGGCTGCCACATTTCCAAAT													
Consensus	AGCGAGCATGAGGGACACATCTCTTCGGCTCAGGTACAGTGCCTGAGTTTGGCGCCGCTGGCTGCTGGTGGCTAGGGGGCTGGTCTGCCGAGCTGACCTGGGCTGCCACATTTCCAAAT													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
LiTrys_Ref_JPCM5	GAGGAGGTCGAGACGCCGCCACGGCGGAGGCTTCGGGTTTGCAGTGGCGACGCTGGGACGAGCGGAGCCGACGCGCTCTTGTCTACCCCTCCACCGCTACAAATCCAGTTGGCCAC													
LiTrys_Sons_Col.7.2	GAGGAGGTCGAGACGCCGCCACGGCGGAGGCTTCGGGTTTGCAGTGGCGACGCTGGGACGAGCGGAGCCGACGCGCTCTTGTCTACCCCTCCACCGCTACAAATCCAGTTGGCCAC													
Consensus	GAGGAGGTCGAGACGCCGCCACGGCGGAGGCTTCGGGTTTGCAGTGGCGACGCTGGGACGAGCGGAGCCGACGCGCTCTTGTCTACCCCTCCACCGCTACAAATCCAGTTGGCCAC													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
LiTrys_Ref_JPCM5	GTCCGGCCATCCAGGTTGGGCGAGCTACGATGTTGTCCGGATCAGAACTACCCTCCACAGTGGGAGTCCCTACGCGTACAGCTGAACTTGATCAGAGGACGGCATCTGGACATCA													
LiTrys_Sons_Col.7.2	GTCCGGCCATCCAGGTTGGGCGAGCTACGATGTTGTCCGGATCAGAACTACCCTCCACAGTGGGAGTCCCTACGCGTACAGCTGAACTTGATCAGAGGACGGCATCTGGACATCA													
Consensus	GTCCGGCCATCCAGGTTGGGCGAGCTACGATGTTGTCCGGATCAGAACTACCCTCCACAGTGGGAGTCCCTACGCGTACAGCTGAACTTGATCAGAGGACGGCATCTGGACATCA													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
LiTrys_Ref_JPCM5	TCGATGACATGACCGGACGAATCGAATCCCGCTTGGTGGTGGCTTTCCTGGTGGCGACGCCGGAGGGGGCGCCCGGTCGCGCTGCATCCGCTACCTGACCTCAATAGCCACCGAA													
LiTrys_Sons_Col.7.2	TCGATGACATGACCGGACGAATCGAATCCCGCTTGGTGGTGGCTTTCCTGGTGGCGACGCCGGAGGGGGCGCCCGGTCGCGCTGCATCCGCTACCTGACCTCAATAGCCACCGAA													
Consensus	TCGATGACATGACCGGACGAATCGAATCCCGCTTGGTGGTGGCTTTCCTGGTGGCGACGCCGGAGGGGGCGCCCGGTCGCGCTGCATCCGCTACCTGACCTCAATAGCCACCGAA													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
LiTrys_Ref_JPCM5	GCCATATCTGTCGCCGTRACTTCTGCCACGGAGTCCAGGGCAGCTGGCTGACATGAGAACCCGGCGGAGCGGCTATTCTGGAGGAGTTGGCATGGACCTCAGTCGACCCGCCGGAGGAG													
LiTrys_Sons_Col.7.2	GCCATATCTGTCGCCGTRACTTCTGCCACGGAGTCCAGGGCAGCTGGCTGACATGAGAACCCGGCGGAGCGGCTATTCTGGAGGAGTTGGCATGGACCTCAGTCGACCCGCCGGAGGAG													
Consensus	GCCATATCTGTCGCCGTRACTTCTGCCACGGAGTCCAGGGCAGCTGGCTGACATGAGAACCCGGCGGAGCGGCTATTCTGGAGGAGTTGGCATGGACCTCAGTCGACCCGCCGGAGGAG													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
LiTrys_Ref_JPCM5	ARGGCTGACGCTACAGCTCAATACAGATTTCCCTTGGCGTGCATCCGTCAGGACAGCCAGCTGCACGACATCTTATGAGGACAGCCGCGAGGATGATCAGAGCATGAGGAGCTCCGCTCT													
LiTrys_Sons_Col.7.2	ARGGCTGACGCTACAGCTCAATACAGATTTCCCTTGGCGTGCATCCGTCAGGACAGCCAGCTGCACGACATCTTATGAGGACAGCCGCGAGGATGATCAGAGCATGAGGAGCTCCGCTCT													
Consensus	ARGGCTGACGCTACAGCTCAATACAGATTTCCCTTGGCGTGCATCCGTCAGGACAGCCAGCTGCACGACATCTTATGAGGACAGCCGCGAGGATGATCAGAGCATGAGGAGCTCCGCTCT													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
LiTrys_Ref_JPCM5	TTGCCATCTCGAGGATTTGGCCCGCATTCGCCACTCGTGGAGATCCAGCAGACATACATTTTGGTGGCTGCATCCGCTCAGACAGCAGGACGGCGAGGTCAGTGTCTCAGTACATGTC													
LiTrys_Sons_Col.7.2	TTGCCATCTCGAGGATTTGGCCCGCATTCGCCACTCGTGGAGATCCAGCAGACATACATTTTGGTGGCTGCATCCGCTCAGACAGCAGGACGGCGAGGTCAGTGTCTCAGTACATGTC													
Consensus	TTGCCATCTCGAGGATTTGGCCCGCATTCGCCACTCGTGGAGATCCAGCAGACATACATTTTGGTGGCTGCATCCGCTCAGACAGCAGGACGGCGAGGTCAGTGTCTCAGTACATGTC													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
LiTrys_Ref_JPCM5	CGACGCGGCTCGACGCTTCTAGAGTCCGGCGCATTCAGCAAAAGTGGCGGAGTCCGTTGGGTTGGACAGCAGGGGACTCGCGGCTCCGGCTTCGGCGTGGAGCGACCTCAGATGGCTGGGGC													
LiTrys_Sons_Col.7.2	CGACGCGGCTCGACGCTTCTAGAGTCCGGCGCATTCAGCAAAAGTGGCGGAGTCCGTTGGGTTGGACAGCAGGGGACTCGCGGCTCCGGCTTCGGCGTGGAGCGACCTCAGATGGCTGGGGC													
Consensus	CGACGCGGCTCGACGCTTCTAGAGTCCGGCGCATTCAGCAAAAGTGGCGGAGTCCGTTGGGTTGGACAGCAGGGGACTCGCGGCTCCGGCTTCGGCGTGGAGCGACCTCAGATGGCTGGGGC													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
LiTrys_Ref_JPCM5	ARACGCGGGGACCTGGCCGCTTCACTCTGTGTGATGAGGAGAGGAGAGGACGATACCGCCCTTACTGCATGAGGCGCTGAGCGCGGCTGGAGGCAAGTTGTGGCTCTGTTCGACG													
LiTrys_Sons_Col.7.2	ARACGCGGGGACCTGGCCGCTTCACTCTGTGTGATGAGGAGAGGAGAGGACGATACCGCCCTTACTGCATGAGGCGCTGAGCGCGGCTGGAGGCAAGTTGTGGCTCTGTTCGACG													
Consensus	ARACGCGGGGACCTGGCCGCTTCACTCTGTGTGATGAGGAGAGGAGAGGACGATACCGCCCTTACTGCATGAGGCGCTGAGCGCGGCTGGAGGCAAGTTGTGGCTCTGTTCGACG													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
LiTrys_Ref_JPCM5	AGTTCGCTTGTGATATAGCCACGTTGTCATAGCGACGCGCTGCCTGCTGCCTGATGTTGGAGAGCTGGATGGGAGTGGCCATCAGCGACTATACGCCCGCCGGAGGACGGCGGAGAA													
LiTrys_Sons_Col.7.2	AGTTCGCTTGTGATATAGCCACGTTGTCATAGCGACGCGCTGCCTGCTGCCTGATGTTGGAGAGCTGGATGGGAGTGGCCATCAGCGACTATACGCCCGCCGGAGGACGGCGGAGAA													
Consensus	AGTTCGCTTGTGATATAGCCACGTTGTCATAGCGACGCGCTGCCTGCTGCCTGATGTTGGAGAGCTGGATGGGAGTGGCCATCAGCGACTATACGCCCGCCGGAGGACGGCGGAGAA													
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
LiTrys_Ref_JPCM5	CTGGAGCCGTCGCCGAGGAAAGGTCGCTATGCGACTTGCCTCCGCGATGACTGGGAATCTCTACTTCGAGCCGATGTGGAAAGTCACTCCGAGCAGCAGGCGCATCTGCCATGATCTAC													
LiTrys_Sons_Col.7.2	CTGGAGCCGTCGCCGAGGAAAGGTCGCTATGCGACTTGCCTCCGCGATGACTGGGAATCTCTACTTCGAGCCGATGTGGAAAGTCACTCCGAGCAGCAGGCGCATCTGCCATGATCTAC													
Consensus	CTGGAGCCGTCGCCGAGGAAAGGTCGCTATGCGACTTGCCTCCGCGATGACTGGGAATCTCTACTTCGAGCCGATGTGGAAAGTCACTCCGAGCAGCAGGCGCATCTGCCATGATCTAC													
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
LiTrys_Ref_JPCM5	CACACACCCCGACACCCCGCCATCTTGGAGGCGGATACGAGTTGACGGAGGACTGCGCAGCAGCGGTTACGCCAGAGGCGATTTGTCCGCGCTGGGCGACAGCTGACCATCACTCCGGCG													
LiTrys_Sons_Col.7.2	CACACACCCCGACACCCCGCCATCTTGGAGGCGGATACGAGTTGACGGAGGACTGCGCAGCAGCGGTTACGCCAGAGGCGATTTGTCCGCGCTGGGCGACAGCTGACCATCACTCCGGCG													
Consensus	CACACACCCCGACACCCCGCCATCTTGGAGGCGGATACGAGTTGACGGAGGACTGCGCAGCAGCGGTTACGCCAGAGGCGATTTGTCCGCGCTGGGCGACAGCTGACCATCACTCCGGCG													
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
LiTrys_Ref_JPCM5	ACGCGAGGTCACGCTGAGCTGGTGGCACTATGGAGGCGACACATGATTTACACACGCTGTTTGGTTGGAGAGCAGGACACTACTACGCCATCATCGCCGCTGGATGATCGCGACGCTT													
LiTrys_Sons_Col.7.2	ACGCGAGGTCACGCTGAGCTGGTGGCACTATGGAGGCGACACATGATTTACACACGCTGTTTGGTTGGAGAGCAGGACACTACTACGCCATCATCGCCGCTGGATGATCGCGACGCTT													
Consensus	ACGCGAGGTCACGCTGAGCTGGTGGCACTATGGAGGCGACACATGATTTACACACGCTGTTTGGTTGGAGAGCAGGACACTACTACGCCATCATCGCCGCTGGATGATCGCGACGCTT													
	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
LiTrys_Ref_JPCM5	CAGCGCGACCGCATCCGCGAGGACAGCTCAGTCACTCCCGGCTAGACGCGCTTCCGCTGCATTCGATCAGACCGACACACTCCCGACCCGTCAGCGACAGGATCAGCGAGATGGCCGAG													
LiTrys_Sons_Col.7.2	CAGCGCGACCGCATCCGCGAGGACAGCTCAGTCACTCCCGGCTAGACGCGCTTCCGCTGCATTCGATCAGACCGACACACTCCCGACCCGTCAGCGACAGGATCAGCGAGATGGCCGAG													
Consensus	CAGCGCGACCGCATCCGCGAGGACAGCTCAGTCACTCCCGGCTAGACGCGCTTCCGCTGCATTCGATCAGACCGACACACTCCCGACCCGTCAGCGACAGGATCAGCGAGATGGCCGAG													
	1951	1959												
LiTrys_Ref_JPCM5	GACGAGTAA													
LiTrys_Sons_Col.7.2	GACGAGTAA													
Consensus	GACGAGTAA													

Apêndice XII

Alinhamento da sequência de aminoácidos de TryS de *L. infantum* (sin. *L. chagasi*)
PP75 contra sequência referência de *L. infantum* JPCM5 (LinJ.27.1770)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LiTrys_Ref_JPCM5	MSLPRASVYFNRPGHIFGAVQGYAPGGVPAYSNKHDHYFSGERSIEGNIFFGKYQCFVARRRLLVYKGLVLPDYNHACHIFQLKEYRDAATRESFVLPVYRNGTGTKEADALLVYPTATNPVGH													
LiTryS_Cons_Col.7.2	MSLPRASVYFNRPGHIFGAVQGYAPGGVPAYSNKHDHYFSGERSIEGNIFFGKYQCFVARRRLLVYKGLVLPDYNHACHIFQLKEYRDAATRESFVLPVYRNGTGTKEADALLVYPTATNPVGH													
Consensus	MSLPRASVYFNRPGHIFGAVQGYAPGGVPAYSNKHDHYFSGERSIEGNIFFGKYQCFVARRRLLVYKGLVLPDYNHACHIFQLKEYRDAATRESFVLPVYRNGTGTKEADALLVYPTATNPVGH													
LiTrys_Ref_JPCM5	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
LiTryS_Cons_Col.7.2	VGAITEVGDYYCVADQNYRFHKHESYAYKLKLDHRDGIHTIIDDIDADEIEIPLGHVTFPGRANRPEGAPPVALHPSLHFNKPKPYLLRRNFLPTESKANALDMKNPAERLFVEEFGMVSRTRLEE													
Consensus	VGAITEVGDYYCVADQNYRFHKHESYAYKLKLDHRDGIHTIIDDIDADEIEIPLGHVTFPGRANRPEGAPPVALHPSLHFNKPKPYLLRRNFLPTESKANALDMKNPAERLFVEEFGMVSRTRLEE													
LiTrys_Ref_JPCM5	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
LiTryS_Cons_Col.7.2	KAVSYYESNHEFHLCRIAYGTQLHDIFHEATAQVIESDEKLRFAIPEEFMPRIHSHKYQQTYSGRDFAFNNETGEVKCFEYNADSASTLLECGRIQQKHRESVGLDKQGRSGFAVERNLKHAHA													
Consensus	KAVSYYESNHEFHLCRIAYGTQLHDIFHEATAQVIESDEKLRFAIPEEFMPRIHSHKYQQTYSGRDFAFNNETGEVKCFEYNADSASTLLECGRIQQKHRESVGLDKQGRSGFAVERNLKHAHA													
LiTrys_Ref_JPCM5	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
LiTryS_Cons_Col.7.2	NSGATGRVHFCVDEEKEEQYALYCHQAREAGLEGKLCVLFDEFRFDDMGHYVDSGVRVWYKTHMESAITDYARREERGENKPSPEKVRLCDLLGGDMEILYFEPHAKVIPSNKAILPMIY													
Consensus	NSGATGRVHFCVDEEKEEQYALYCHQAREAGLEGKLCVLFDEFRFDDMGHYVDSGVRVWYKTHMESAITDYARREERGENKPSPEKVRLCDLLGGDMEILYFEPHAKVIPSNKAILPMIY													
LiTrys_Ref_JPCM5	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
LiTryS_Cons_Col.7.2	HNHPEHPAILKRAEYELTDELKKGHYAKKPIVGRVGSNVTITSGDGEVHRESGGNYGKRNMHYQQLFELKKQDDYYRIIGGMIGDAFSGTGIREDKSVITGVDSPPFAIRIKTDKLPHPVTHKIDEMRE													
Consensus	HNHPEHPAILKRAEYELTDELKKGHYAKKPIVGRVGSNVTITSGDGEVHRESGGNYGKRNMHYQQLFELKKQDDYYRIIGGMIGDAFSGTGIREDKSVITGVDSPPFAIRIKTDKLPHPVTHKIDEMRE													
6681														
11														
LiTrys_Ref_JPCM5	DE													
LiTryS_Cons_Col.7.2	DE													
Consensus	DE													

Apêndice XIII

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *tr* de *L. braziliensis* M2904
contra sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (LbrM.05.0350)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LbTR_Ref_M2904	ATGCCCCGGCGTACGACCTTGTGGTCTTGGCCGGTCTGGAGGCTGGAGGCGGGCTGGAGCGGGCTCCATCTACATATAGAGAGGTGGCCCTGGAGGCGGAGAGGAGCATGGCCCGCCT													
LbTR_Cons_Col.8	ATGCCCCGGCGTACGACCTTGTGGTCTTGGCCGGTCTGGAGGCTGGAGGCGGGCTGGAGCGGGCTCCATCTACATATAGAGAGGTGGCCCTGGAGGCGGAGAGGAGCATGGCCCGCCT													
Consensus	ATGCCCCGGCGTACGACCTTGTGGTCTTGGCCGGTCTGGAGGCTGGAGGCGGGCTGGAGCGGGCTCCATCTACATATAGAGAGGTGGCCCTGGAGGCGGAGAGGAGCATGGCCCGCCT													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
LbTR_Ref_M2904	GCTTTGCAGCGCTCGGCGGACGTGCGTGAATGTCGGCTGTGTTCCGAGAGAGCTCATGGTGCAGGGTGGCCATACATGACCTGATCCGTGAGTCTGGCGCTTTGGTTGGAAATGGACCGGACTC													
LbTR_Cons_Col.8	GCTTTGCAGCGCTCGGCGGACGTGCGTGAATGTCGGCTGTGTTCCGAGAGAGCTCATGGTGCAGGGTGGCCATACATGACCTGATCCGTGAGTCTGGCGCTTTGGTTGGAAATGGACCGGACTC													
Consensus	GCTTTGCAGCGCTCGGCGGACGTGCGTGAATGTCGGCTGTGTTCCGAGAGAGCTCATGGTGCAGGGTGGCCATACATGACCTGATCCGTGAGTCTGGCGCTTTGGTTGGAAATGGACCGGACTC													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
LbTR_Ref_M2904	AATTCGCTTACTGGAGAGCTCATCACAGCGAAGATAAAGTGGTGGCGACATCACAGAGCTACACGGACATGTTCCGAGAACCGAGGGGCTCAGCTTCCATGGGTTTCGGCCCTTCAG													
LbTR_Cons_Col.8	AATTCGCTTACTGGAGAGCTCATCACAGCGAAGATAAAGTGGTGGCGACATCACAGAGCTACACGGACATGTTCCGAGAACCGAGGGGCTCAGCTTCCATGGGTTTCGGCCCTTCAG													
Consensus	AATTCGCTTACTGGAGAGCTCATCACAGCGAAGATAAAGTGGTGGCGACATCACAGAGCTACACGGACATGTTCCGAGAACCGAGGGGCTCAGCTTCCATGGGTTTCGGCCCTTCAG													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
LbTR_Ref_M2904	GACGCGCACCGTCTGGTGGCGAGTCTGAGAGCCGGAAAGCGAGTCTGAGAGCGCTGGAGGCGGATACATCTTATTGCGACCGCTCCCTGGCCGACCGGCTCGGATCTCGGATGAGC													
LbTR_Cons_Col.8	GACGCGCACCGTCTGGTGGCGAGTCTGAGAGCCGGAAAGCGAGTCTGAGAGCGCTGGAGGCGGATACATCTTATTGCGACCGCTCCCTGGCCGACCGGCTCGGATCTCGGATGAGC													
Consensus	GACGCGCACCGTCTGGTGGCGAGTCTGAGAGCCGGAAAGCGAGTCTGAGAGCGCTGGAGGCGGATACATCTTATTGCGACCGCTCCCTGGCCGACCGGCTCGGATCTCGGATGAGC													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
LbTR_Ref_M2904	TCTGCATCACGAGCAGCGAGCTTCTACTCGACGAGGCCCAAGCGCGCTTTTGGCTGGCGGTTGGTACATCTCTGTGGAGTTCCGCGGCTCTTCACGCTTACAGCCCTTCAGCGTCAGGT													
LbTR_Cons_Col.8	TCTGCATCACGAGCAGCGAGCTTCTACTCGACGAGGCCCAAGCGCGCTTTTGGCTGGCGGTTGGTACATCTCTGTGGAGTTCCGCGGCTCTTCACGCTTACAGCCCTTCAGCGTCAGGT													
Consensus	TCTGCATCACGAGCAGCGAGCTTCTACTCGACGAGGCCCAAGCGCGCTTTTGGCTGGCGGTTGGTACATCTCTGTGGAGTTCCGCGGCTCTTCACGCTTACAGCCCTTCAGCGTCAGGT													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
LbTR_Ref_M2904	GGACCTGTGTACCGCGGCGAGTTATCTTGGCGGCTTCGATCTCGAGGTGGCGAGAGCTGATGAACAGCTGGAGCGGACGAAATAAAGATACGCCACAGGTTGACCGCTCGAGATCACCAG													
LbTR_Cons_Col.8	GGACCTGTGTACCGCGGCGAGTTATCTTGGCGGCTTCGATCTCGAGGTGGCGAGAGCTGATGAACAGCTGGAGCGGACGAAATAAAGATACGCCACAGGTTGACCGCTCGAGATCACCAG													
Consensus	GGACCTGTGTACCGCGGCGAGTTATCTTGGCGGCTTCGATCTCGAGGTGGCGAGAGCTGATGAACAGCTGGAGCGGACGAAATAAAGATACGCCACAGGTTGACCGCTCGAGATCACCAG													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
LbTR_Ref_M2904	AATCGAGCGGCTCGAGACGTTTGTTCGAGAGCGCACGGAGCGGACATGATCAGGTGATGCTGGCGGTTGGCCGCGCGCGCTCGAGGCGCTCGAGCTCGACAGGCGGCGCAAAATGG													
LbTR_Cons_Col.8	AATCGAGCGGCTCGAGACGTTTGTTCGAGAGCGCACGGAGCGGACATGATCAGGTGATGCTGGCGGTTGGCCGCGCGCGCTCGAGGCGCTCGAGCTCGACAGGCGGCGCAAAATGG													
Consensus	AATCGAGCGGCTCGAGACGTTTGTTCGAGAGCGCACGGAGCGGACATGATCAGGTGATGCTGGCGGTTGGCCGCGCGCGCTCGAGGCGCTCGAGCTCGACAGGCGGCGCAAAATGG													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
LbTR_Ref_M2904	GAAAGAACCGCGCGTGGTGGTGCAGCATACTCGAGAGCTCGGTTGACACATTTACGCCATTTGGCGAGCTGACGGACCGCTGATGCTGACCGGTTGGCCATCACGAGGCTCCGCCCTCGTCCG													
LbTR_Cons_Col.8	GAAAGAACCGCGCGTGGTGGTGCAGCATACTCGAGAGCTCGGTTGACACATTTACGCCATTTGGCGAGCTGACGGACCGCTGATGCTGACCGGTTGGCCATCACGAGGCTCCGCCCTCGTCCG													
Consensus	GAAAGAACCGCGCGTGGTGGTGCAGCATACTCGAGAGCTCGGTTGACACATTTACGCCATTTGGCGAGCTGACGGACCGCTGATGCTGACCGGTTGGCCATCACGAGGCTCCGCCCTCGTCCG													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
LbTR_Ref_M2904	AACTCTCTTTGGTGCAGGCCCGCGCCACCCAGGTTGCTTGGCGGTTTTCGATACCCGATCGGACGCTGGTTTGCAGGAGGAGGAGGCGGCGAGAGGATACGACCTCGTCCG													
LbTR_Cons_Col.8	AACTCTCTTTGGTGCAGGCCCGCGCCACCCAGGTTGCTTGGCGGTTTTCGATACCCGATCGGACGCTGGTTTGCAGGAGGAGGAGGCGGCGAGAGGATACGACCTCGTCCG													
Consensus	AACTCTCTTTGGTGCAGGCCCGCGCCACCCAGGTTGCTTGGCGGTTTTCGATACCCGATCGGACGCTGGTTTGCAGGAGGAGGAGGCGGCGAGAGGATACGACCTCGTCCG													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
LbTR_Ref_M2904	GTGACGAGGAGGTTTACGCCCTCATGACACATCAGCGGCGACGACACAAACATTTATGATCCGATCGTACGAAAGAAAGGATGGCAGGTTGCTCGGCTCCACATGCTCGGCGACAGCG													
LbTR_Cons_Col.8	GTGACGAGGAGGTTTACGCCCTCATGACACATCAGCGGCGACGACACAAACATTTATGATCCGATCGTACGAAAGAAAGGATGGCAGGTTGCTCGGCTCCACATGCTCGGCGACAGCG													
Consensus	GTGACGAGGAGGTTTACGCCCTCATGACACATCAGCGGCGACGACACAAACATTTATGATCCGATCGTACGAAAGAAAGGATGGCAGGTTGCTCGGCTCCACATGCTCGGCGACAGCG													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
LbTR_Ref_M2904	CGCCGAGATCATTCAGGCGTAGGATCTGCATGAGATGGCGCCAGATCAGGACTTCCACAGCATTTGGCCTACCCGACGAGCGTGGAGGACTCTGCTCCATGCTACCCGGCATACTT													
LbTR_Cons_Col.8	CGCCGAGATCATTCAGGCGTAGGATCTGCATGAGATGGCGCCAGATCAGGACTTCCACAGCATTTGGCCTACCCGACGAGCGTGGAGGACTCTGCTCCATGCTACCCGGCATACTT													
Consensus	CGCCGAGATCATTCAGGCGTAGGATCTGCATGAGATGGCGCCAGATCAGGACTTCCACAGCATTTGGCCTACCCGACGAGCGTGGAGGACTCTGCTCCATGCTACCCGGCATACTT													
	1431	1440	1450	1460	1470	1476								
LbTR_Ref_M2904	CTACGAGAGGGCAGCGCTCGAARAACCTCAGCTGATTTGTGA													
LbTR_Cons_Col.8	CTACGAGAGGGCAGCGCTCGAARAACCTCAGCTGATTTGTGA													
Consensus	CTACGAGAGGGCAGCGCTCGAARAACCTCAGCTGATTTGTGA													

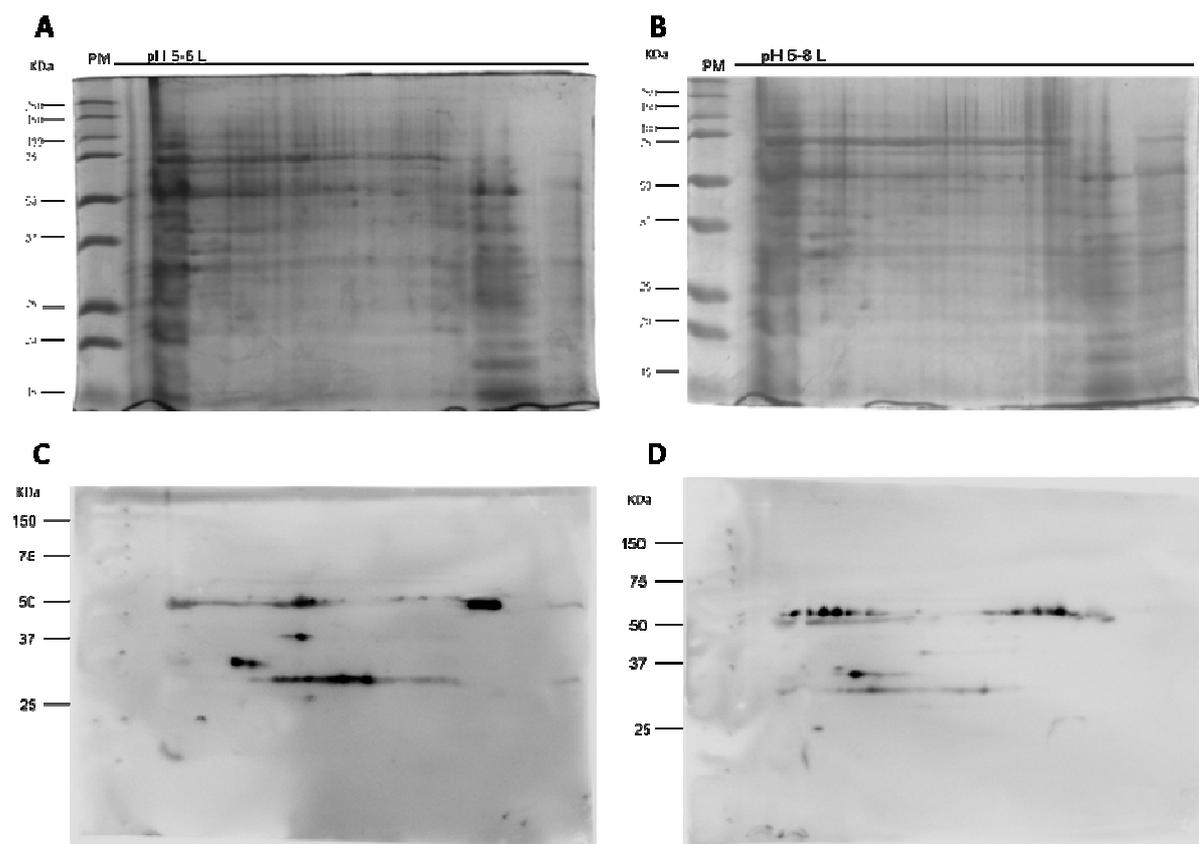
Apêndice XIV

Alinhamento da sequência de aminoácidos de TR de *L. braziliensis* M2904 contra sequência referência de *L. braziliensis* M2904 (LbrM.05.0350)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
LbTR_Ref_M2904	MPRAYDLVYLGAGSGGLEAGHNAASLYNKKYAVYERQKEHGPPCFARLGGTCVNYGCVPKKLVYTGQYMDLIRESCGFGEHORDSIRSNAKKLITAKNKVYSDINKSYTDMFENTEGLSFHNGFALQ													
LbTR_Cons_Col.8	MPRAYDLVYLGAGSGGLEAGHNAASLYNKKYAVYERQKEHGPPCFARLGGTCVNYGCVPKKLVYTGQYMDLIRESCGFGEHORDSIRSNAKKLITAKNKVYSDINKSYTDMFENTEGLSFHNGFALQ													
Consensus	MPRAYDLVYLGAGSGGLEAGHNAASLYNKKYAVYERQKEHGPPCFARLGGTCVNYGCVPKKLVYTGQYMDLIRESCGFGEHORDSIRSNAKKLITAKNKVYSDINKSYTDMFENTEGLSFHNGFALQ													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
LbTR_Ref_M2904	DAHTVYVRKSEDPESDVLTEADYILIATGSAFTRLGIPGDELCTISNEAFYLDEAPKRALCYGGGYISVEFAGIFNAYKPPDGGVDLCYRGEVILRGFDLEVRKSLHKQLEANGIKIRTKVNPSTRITK													
LbTR_Cons_Col.8	DAHTVYVRKSEDPESDVLTEADYILIATGSAFTRLGIPGDELCTISNEAFYLDEAPKRALCYGGGYISVEFAGIFNAYKPPDGGVDLCYRGEVILRGFDLEVRKSLHKQLEANGIKIRTKVNPSTRITK													
Consensus	DAHTVYVRKSEDPESDVLTEADYILIATGSAFTRLGIPGDELCTISNEAFYLDEAPKRALCYGGGYISVEFAGIFNAYKPPDGGVDLCYRGEVILRGFDLEVRKSLHKQLEANGIKIRTKVNPSTRITK													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
LbTR_Ref_M2904	NADGSKHVCFEDGTEADYDQVMLAVGRAPRSKALQLDKAGVKMGKNGAVVDRYSKTSVDNIYRIGDVTDRLLMLTPVAINEGSFVETLFGCKPRATDHTKVCARVFSIPPICGGLTEEEAAKKYDVA													
LbTR_Cons_Col.8	NADGSKHVCFEDGTEADYDQVMLAVGRAPRSKALQLDKAGVKMGKNGAVVDRYSKTSVDNIYRIGDVTDRLLMLTPVAINEGSFVETLFGCKPRATDHTKVCARVFSIPPICGGLTEEEAAKKYDVA													
Consensus	NADGSKHVCFEDGTEADYDQVMLAVGRAPRSKALQLDKAGVKMGKNGAVVDRYSKTSVDNIYRIGDVTDRLLMLTPVAINEGSFVETLFGCKPRATDHTKVCARVFSIPPICGGLTEEEAAKKYDVA													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	491			
LbTR_Ref_M2904	VYESSFTPLMHNISGSKHKTFMIRIVTKEKGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICHRNGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSHRTPAYFYEKGRVEKLSNCL													
LbTR_Cons_Col.8	VYESSFTPLMHNISGSKHKTFMIRIVTKEKGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICHRNGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSHRTPAYFYEKGRVEKLSNCL													
Consensus	VYESSFTPLMHNISGSKHKTFMIRIVTKEKGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICHRNGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSHRTPAYFYEKGRVEKLSNCL													

Apêndice XV

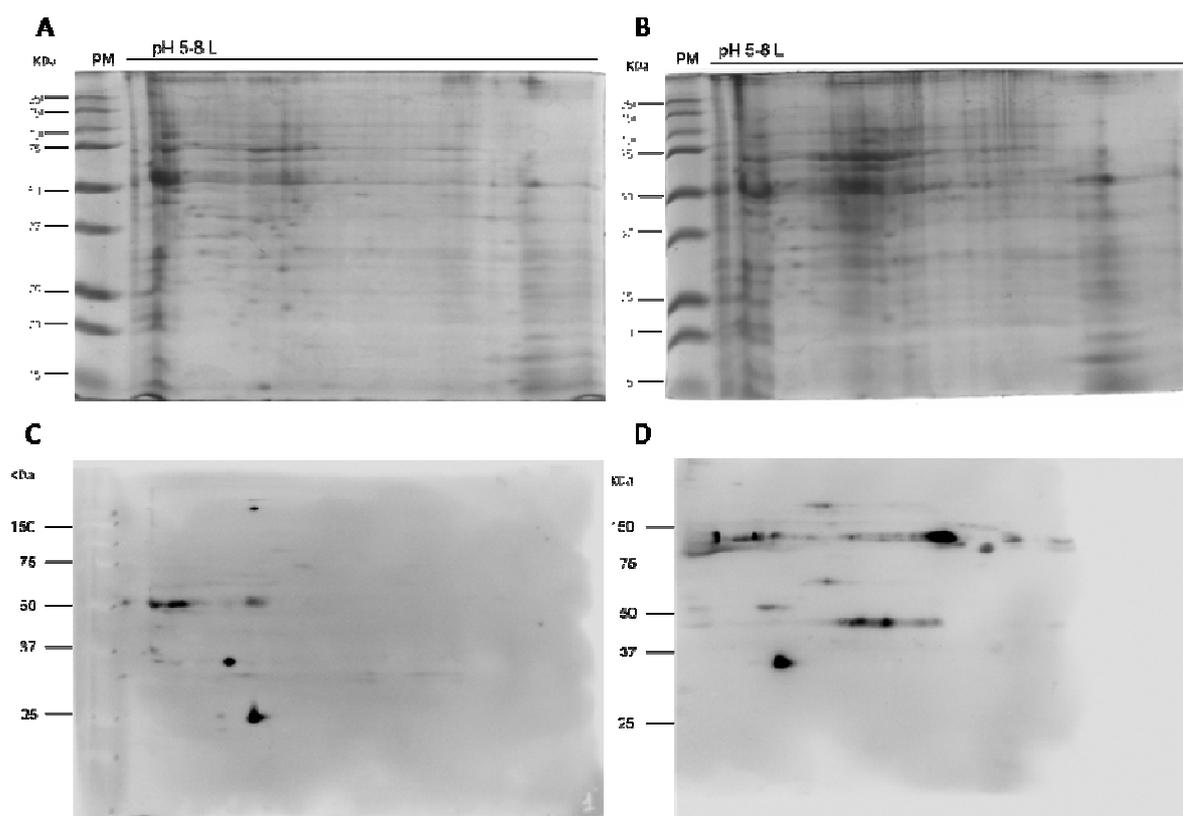
Eletroforese de proteínas bidimensional e *Western Blot* 2D de amostras de proteína solúvel total de *L. braziliensis* M2904 selvagem e superexpressando Tripanotiona Redutase



Legenda: Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis totais (A e B) e *Western Blot* (C e D) usando anticorpo anti-Tripanotiona Redutase (TR) de amostras de *L. braziliensis* M2904 (A e C) selvagem e (B e D) clone superexpressor de TR. A focalização isoelétrica foi realizada com 100 μ M de proteína usando tiras IPGs de 7 cm pH de 5-8, submetidos à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) em géis de poliacrilamida 12% corados com Azul de Coomassie Coloidal G-250.

Apêndice XVI

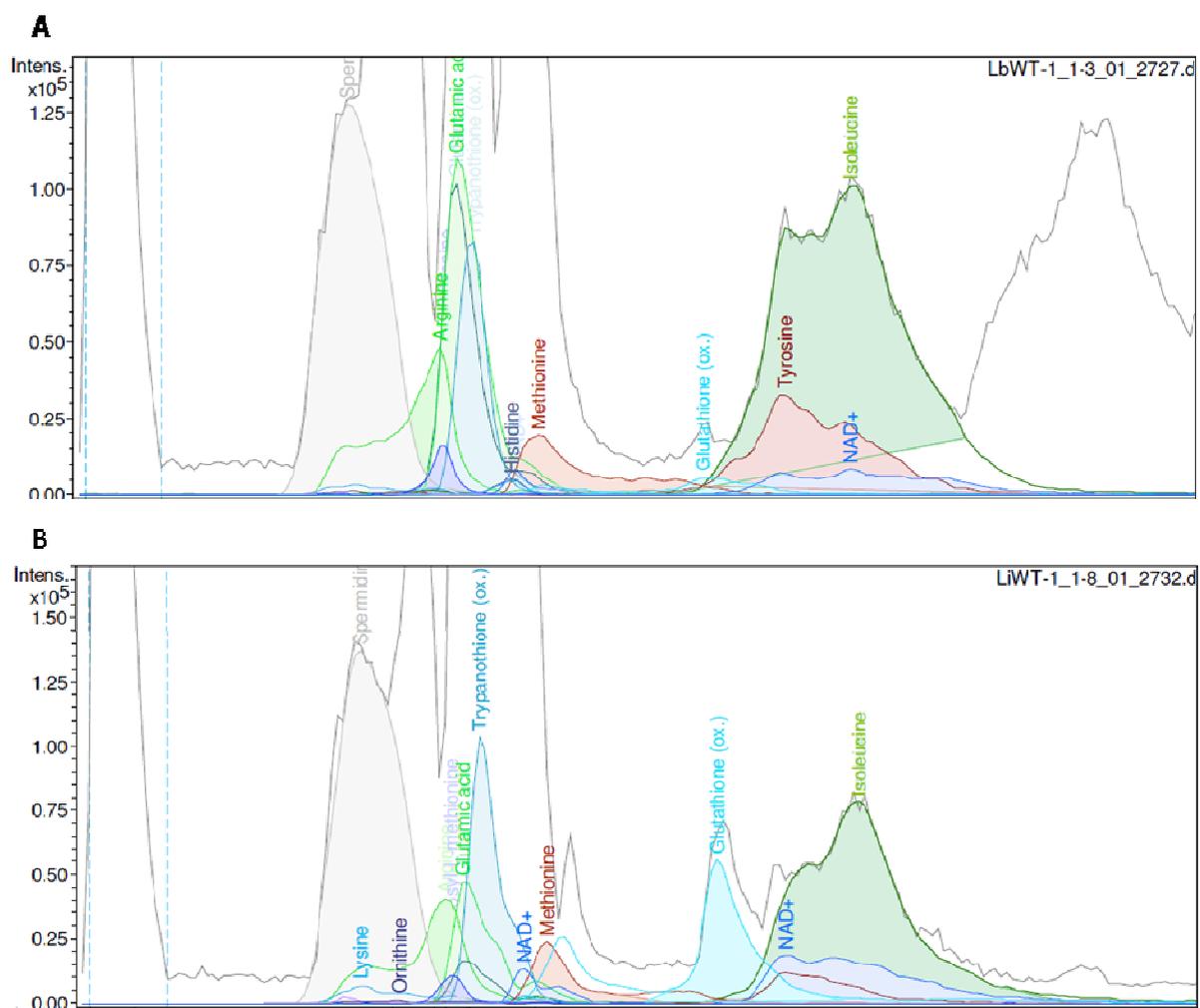
Eletroforese de proteínas bidimensional e *Western Blot* 2D de amostras de proteína solúvel total de *L. guyanensis* M9945 selvagem e superexpressando Tripanotiona Redutase



Legenda: Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis totais (A e B) e *Western Blot* (C e D) usando anticorpo anti-Tripanotiona Redutase (TR) de amostras de *L. guyanensis* M9945 (A e C) selvagem e (B e D) clone superexpressor de TR. A focalização isoelétrica foi realizada com 100 μ M de proteína usando tiras IPGs de 7 cm pH de 5-8, submetidos à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) em géis de poliacrilamida 12% corados com Azul de Coomassie Coloidal G-250.

Apêndice XVII

Cromatogramas 'base peak' (em cinza) de metabolitos purificados (coloridos) de (A) *L. braziliensis* M2904 e (B) *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) PP75 selvagens



Apêndice XVIII

Artigo Publicado com os dados provenientes da Tese de Doutorado

Experimental Parasitology 175 (2017) 36e43



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexprOrnithine decarboxylase or gamma-glutamylcysteine synthetase overexpression protects *Leishmania (Vianna) guyanensis* against antimony

Maisa S. Fonseca^a, Marcelo A. Comini^b, Bethania[^] V. Resende^a, Ana Maria M. Santi^a, Antonio[^] P. Zobili^a, Douglas S. Moreira^a, Silvane M.F. Murta^{a,*}

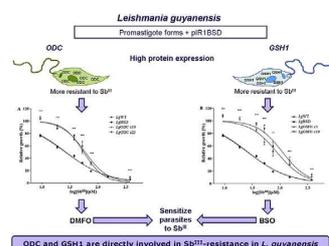
^a Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Rene Rachou CPqRR/Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715 301190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Laboratório de Biología Redox de Tripanosomatídeos, Institut Pasteur de Montevideo, Matajao 2020 11400, Montevideo, Uruguay

highlights

ODC- or GSH1-overexpressing *L. guyanensis* are more resistant to Sb^{III}.
DFMO and BSO sensitize LgWT and ODC and GSH1-overexpressors to Sb^{III}.
DFMO and BSO increase the anti-leishmanial effect of Sb^{III}.
ODC and GSH1 are implicated in Sb^{III}-resistance in New World Leishmania.

graphical abstract



article info

Article history:
Received 5 October 2016 Received in revised form 16 December 2016
Accepted 1 February 2017 Available online 3 February 2017

Keywords:

Leishmania guyanensis Ornithine decarboxylase Gamma-glutamylcysteine synthetase Antimony-resistance Trypanothione

abstract

Trypanosomatids present a unique mechanism for detoxification of peroxides that is dependent on trypanothione (bisglutathionylspermidine). Ornithine decarboxylase (ODC) and γ -glutamylcysteine synthetase (GSH1) produce molecules that are direct precursors of trypanothione. In this study, *Leishmania guyanensis* odc and gsh1 overexpressor cell lines were generated to investigate the contribution of these genes to the trivalent antimony (Sb^{III})-resistance phenotype. The ODC- or GSH1-overexpressors parasites presented an increase of two and four-fold in Sb^{III}-resistance index, respectively, when compared with the wild-type line. Pharmacological inhibition of ODC and GSH1 with the specific inhibitors α -difluoromethylornithine (DFMO) and buthionine sulfoximine (BSO), respectively, increased the antileishmanial effect of Sb^{III} in all cell lines. However, the ODC- and GSH1-overexpressor were still more resistant to Sb^{III} than the parental cell line. Together, our data shows that modulation of ODC and GSH1 levels and activity is sufficient to affect *L. guyanensis* susceptibility to Sb^{III}, and confirms a role of these genes in the Sb^{III}-resistance phenotype.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by 21e30 different species of protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. This neglected tropical disease is endemic in 98

Abbreviations: Lg, *Leishmania guyanensis*; ODC, ornithine decarboxylase; GSH1, gamma-glutamylcysteine synthetase; Sb^{III}, trivalent antimony; DFMO, α -difluoromethylornithine; BSO, buthionine sulfoximine.

* Corresponding author.

E-mail address: silvane@cpqrr.fiocruz.br (S.M.F. Murta).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.001> 0014-4894/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

countries, especially in Central and South America, Southern Europe, North and East Africa, Middle East, and in the Indian sub-continent (Alvar et al., 2012). Annually, it has been estimated 1.3 million of new cases of the disease and about 30,000 deaths worldwide (WHO, 2016). Leishmaniasis comprises three different main clinical manifestations that range from self-healing cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL) skin lesions to a visceral (VL) form that is lethal if untreated (WHO, 2016). In the New World, Leishmania (Viannia) guyanensis causes both CL and MCL (Guerra et al., 2011).

The control of leishmaniasis is based on chemotherapy and there is no human vaccine available to date (Kumar and Engwerda, 2014). Pentavalent antimony-containing compounds such as N-methyl-glucamine (Glucantime®) and sodium stibogluconate (SSG) (Pentostam®) are the main drugs used to treat all forms of the disease for almost eight decades (Mohapatra, 2014). The mechanism of action of this drug is not fully understood. It is known that the pentavalent (Sb^V) form needs to be reduced to the active trivalent form (Sb^{III}), which has leishmanicidal effect against both amastigote and promastigote forms of the parasite (Shaked-Mishan et al., 2001). The antimony has been proposed to inhibit glycolysis, fatty acid oxidation (Berman et al., 1987) and trypanothione reductase, the enzyme responsible for sustaining the parasite's redox homeostasis (Cunningham and Fairlamb, 1995). The cyto-toxicity of Sb^{III} has also been associated to alterations in the mitochondrial membrane potential that lead to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and in the influx of Ca²⁺ (Mukherjee et al., 2002; Sudhandiran and Shaha, 2003; Mehta and Shaha, 2006).

In the last 25 years, many cases of treatment failure and resistance to antimonials were reported in several countries including Brazil (Oliveira-Neto et al., 1997), Bolivia (Bemúdez et al., 2006) Colombia (Palacios et al., 2001), India (Sundar, 2001), Iran (Sarkari et al., 2016) and Peru (Arevalo et al., 2007). The most extreme situation takes place in Bihar (India) where 50e65% of the patients are unresponsive to Sb^V-treatment (Sundar, 2001). Parasites use a range of mechanisms to acquire resistance to these drugs such as increase in drug efflux/sequestration or decrease in drug uptake, lower rate of drug activation/reduction and gene amplification (Beverley, 1991; Haldar et al., 2011). Several reports link the level and activity of enzymes from the thiol-redox metabolism of Leishmania spp. to antimony resistance (Guimond et al., 2003; Mukherjee et al., 2007; Rai et al., 2013). The central molecule of this metabolism is based on the low molecular mass dithiol trypanothione (bisglutathionylspermidine), which provides reducing power for several cellular functions including the protection against reactive oxygen species (Olin-Sandoval et al., 2010; Manta et al., 2013). The two building blocks of trypanothione, glutathione and spermidine are provided by the glutathione- and polyamine-biosynthetic pathway, respectively (Manta et al., 2013). g-Glutamylcysteine synthetase (GSH1) is the first enzyme of the glutathione pathway that produces g-glutamylcysteine, a direct precursor of glutathione (Meister and Anderson, 1983). An increase of GSH1 mRNA levels have been reported in some L. tarentolae samples with in vitro-induced resistance to antimony (Guimond et al., 2003) and some Sb^V-resistant L. donovani field isolates (Mukherjee et al., 2007; Singh et al., 2014). Amplification of gsh1 gene was also observed in Sb^V-resistant L. donovani field isolates (Mukherjee et al., 2007; Singh et al., 2014) and in L. tarentolae mutants selected for resistance to arsenite (As^{III}) or Sb^{III} (Grondin et al., 1997; Haimeur et al., 1999, 2000).

Ornithine decarboxylase (ODC) converts L-ornithine in putrescine that will be transformed in spermidine by spermidine synthase (Müller et al., 2001). Polyamines contribute to parasite growth and in the As^{III}/antimony-resistance in Leishmania parasites

(Haimeur et al., 1999; Singh et al., 2007; Birkholtz et al., 2011). Gene amplification and increase in the ODC levels were observed in Sb^V-resistant L. donovani field isolates (Mukherjee et al., 2007; Rai et al., 2013) and in L. tarentolae mutants selected for resistance to As^{III} (Haimeur et al., 1999).

Despite these evidences, the potential role of ODC and GSH1 enzymes in Sb^{III} resistance for the New World Leishmania species has not yet been addressed in detail. In the present study we used a genetic and pharmacological approach to dissect the contribution of ODC and GSH1 enzymes from L. (V.) guyanensis (a New World Leishmania species) to Sb^{III}-resistance.

2. Material and methods

2.1. Parasites

Promastigotes forms of Leishmania (Viannia) guyanensis (IUMB/BR/1985/M9945) were grown at 26 C in M199 medium (Liarte and Murta, 2010). All assays were performed using parasites in the logarithmic growth phase.

2.2. Cloning, expression and purification of recombinant L. guyanensis GSH1

A 2067 bp fragment corresponding to the complete open reading frame (ORF) of the gsh1 gene (LbrM.18.1700) was amplified from L. guyanensis genomic DNA using primers: GSH1 pQE-31 forward: 5'-CGCGGATCCGATGGGTCTCTTGACAACCTGG-3' and GSH1 pQE-31 reverse: 5'-CGCAAGCTTTTATGCGTGTCTCTCTGTT-3'. The underlined sequences correspond to BamHI and HindIII restriction sites, respectively, to facilitate cloning. PCR amplification was carried as follows: 94 C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 C for 1 min, 60 C for 1 min, and 72 C for 2 min. The PCR amplicons of gsh1 were digested with restriction enzymes and then inserted into the corresponding sites of the pQE-31 (Qiagen, Valencia, CA, USA). Escherichia coli M15 strain transformed with the pQE31-GSH1 construct were cultured for 12 h in the presence of

1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Promega, Madison, WI, U.S.A.) at 30 C, harvested and lysed. The His-tagged recombinant GSH1 was purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) coupled to sepharose (Qiagen) columns. The recombinant protein was used to generate polyclonal antiserum in New Zealand white rabbits according to an immunization protocol previously described (Murta et al., 2006).

2.3. Generation of ODC and GSH1 overexpressor cells from L. guyanensis

Fragments of 1911 and 2067 bp corresponding to odc (LbrM.12.0300) and gsh1 (LbrM.18.1700) encoding regions, respectively, were amplified with Pfx DNA polymerase (Invitrogen) from L. guyanensis genomic DNA using the forward primer: 5'-TAGATCTCCACCATGATGAAGATGGTTACCGCC-3' and the reverse primer: 5'-TTAGATCTCTATAAGGCAATAGAGCTCACC-3' to amplify odc and the forward primer 5'-TGGATCCCACCATGGGTCTCTTGACAACCTGG-3' and the reverse primer: 5'-ATGGATCCTATGCGTGTCTCTCTGTTTCTCAGC-3' to amplify gsh1. Bold letters indicate the Kosak sequence and the underlined sequences correspond to BglII and BamHI restriction sites of odc and gsh1 genes, respectively. The odc and gsh1 amplicons were cloned into pGEM T-Easy™ vector (Invitrogen) and subsequently submitted to DNA sequencing. The constructs containing odc or gsh1 were digested with BglII and BamHI, respectively, and the fragments released were introduced into the dephosphorylated pIR1-BSD expression vector, kindly provided by Dr. Stephen Beverley (Washington

University in St. Louis e USA). To confirm the correct cloning, constructs were digested with Sall and SmaI for odc and gsh1, respectively. The constructs, pIR1-BSD (empty vector), pIR1-BSD-ODC and pIR1-BSD-GSH1 were linearized upon SmaI digestion, precipitated and transfected into wild-type *L. guyanensis* using a GenePulser XCell (BioRad) electroporator by electroporation as described in Robinson and Beverley (2003). pIR1 vector allows constructs integration into the 18S ribosomal small subunit (SSU) DNA locus (Robinson and Beverley, 2003). Colonies were obtained following plating on semisolid M199 medium containing 10 mg/mL blasticidin (BSD). After 2e3 weeks, clonal lines were selected and the integration of the ectopic genes was confirmed by PCR tests using genomic DNA with specific primers for the BSD marker according previously described (Tessarollo et al., 2015).

2.4. ODC and GSH1 levels

Protein extracts (40 mg) from *L. guyanensis* were obtained as previously described (Gammaro et al., 1994). Proteins were separated by electrophoresis on 12% SDS polyacrylamide gel and electrotransferred onto nitrocellulose membrane (BioRad). The membrane was blocked by incubation with 5% instant non-fat dried milk in PBS with 0.05% Tween 20 (PBS-T) for 1 h. The blots were then washed twice on PBS-T and incubated for 1 h at room temperature in the presence of the antibodies: rabbit polyclonal *L. donovani* anti-LdODC (1:200) (kindly provided by Dr. Buddy Ulman e Oregon Health & Science University e USA) and for 2 h with rabbit polyclonal *L. guyanensis* anti-LgGSH1 (1:200) (obtained according to item 2.2). The blots were washed with PBS-T and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) (GE Healthcare) for 1 h at room temperature. The blots were exposed to Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions and revealed in ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). The results were normalized using the anti- α -tubulin monoclonal antibody (Sigma, St. Louis, USA). The intensity of the bands was analyzed using the software CP ATLAS 2.0.

2.5. Susceptibility of *L. guyanensis* cell lines to Sb^{III}

Promastigotes of *L. guyanensis* wild-type, gsh1- or odc-over-expressor cell lines, were seeded at 2×10^6 cells mL⁻¹ into 24-wells plates in absence (control) or presence of several concentrations (9.3e374.2 mM) of potassium antimonyl tartrate/trivalent antimony (Sb^{III}) (Sigma Aldrich) for 48 h. The Sb^{III} effective concentration required to decrease growth by 50% (EC₅₀) was determined using Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

2.6. Pharmacological inhibition tests of ODC and GSH1

Initially, the EC₅₀ of the selective ODC and GSH1 inhibitors DL- α -difluoromethylornithine (DFMO) and L-buthionine-sulfoximine (BSO) (both from Sigma Aldrich), respectively, was determined for each *Leishmania* cell line as described above. Then 2×10^6 parasites mL⁻¹ from each cell line (wild-type, ODC-over-expressor clone 10 and GSH1-over-expressor clone 3) were pre-incubated for 24 h with the corresponding inhibitors added at their EC₅₀ values for the wild-type *L. guyanensis* line: 50 mM for DFMO and 10 mM BSO. Next, these same pre-treated cells were seeded in a 24-well plate and added of Sb^{III} at different concentrations (4.7e74.9 mM), incubated for additional 24 h and finally the percentage of relative growth determined by automated cell counting using a Z1 Coulter Counter.

In addition, WT and GSH1-over-expressor (clone 3) cells were seeded at 2×10^6 parasites mL⁻¹ (24-wells plate) in culture medium containing BSO (5 mM for the WT line and 5 or 15 mM for the

GSH1-over-expressor). After 5 min, Sb^{III} was added at 9.3 mM (Sb^{III} concentration required to decrease growth by 15 a 20% of both lines) to all wells and incubation extended for 48 h. Cell density was assessed as described above.

2.7. Statistical analysis

The EC₅₀ values were determined using the dose-response inhibition equation provided with GraphPad Prism 5.0. Statistical analysis of the data from the susceptibility assays were performed with the ANOVA one-way test using Tukey post-test. Student t-test was used for independent samples in assays with the inhibitors. All analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. ODC and GSH1 overexpression in *L. guyanensis*

We transfected the wild-type *L. guyanensis* line with the constructs pIR1-LgODC or pIR1-LgGSH1 to generate transfectants overexpressing ODC or GSH1. In order to confirm the integration of the vectors, clonal cell lines resistant to blasticidin were subjected to PCR using genomic DNA as template and with specific primers for the BSD marker. Five colonies transfected with the construct pIR1-BSD and ten with pIR1-LgODC or pIR1-LgGSH1 were evaluated. All 25 analyzed colonies presented a fragment of 399 bp, corresponding to the BSD marker (data not shown). These clones were subjected to western blot analysis to evaluate the levels of ODC and GSH1. The polyclonal antibodies anti-LdODC and anti-LgGSH1 recognized respectively polypeptides of 69 and 77 kDa in all *Leishmania* cell lines analyzed (Fig. 1A and B). Densitometry analysis of the ODC and GSH1 bands using anti- α -tubulin monoclonal antibody as a reference showed that the levels of ODC and GSH1 were about 2-fold higher in the transfected clones than in cells from the wild-type line or transfected with the empty vector (Fig. 1A and B).

3.2. ODC and GSH1 protect *L. guyanensis* against the inhibitory effect of DFMO and BSO

In order to determine whether the transgenic cell lines from *L. guyanensis* express the active forms of ODC and GSH1, the untransfected and transfected parasites were treated with the corresponding enzyme-specific inhibitors DFMO and BSO, respectively. The EC₅₀ of DFMO was 2.2-fold higher for the ODC-over-expressor clones (110 mM) compared to the LgWT (50 mM) whereas the EC₅₀ of BSO was at least 3-fold higher for the GSH1-over-expressor clones (>30 mM) than for the LgWT cells (10 mM). The level of resistance towards DFMO and BSO displayed by the over-expressor cell lines that present increased content on ODC and GSH1, confirms that the transgenic parasites express the active form of these enzymes and the selectivity of the inhibitors.

3.3. ODC or GSH1-overexpressing parasites are less susceptible to Sb^{III}

In order to investigate whether overexpression of ODC or GSH1 contributes to the antimony-resistance phenotype, cell lines over-expressing ODC or GSH1, and the parental wild-type line transfected or not with the empty vector (controls) were exposed to different concentrations of Sb^{III} (9.3e374.2 mM) during 48 h. The LgWT and LgBSD cell lines displayed an identical susceptibility towards Sb^{III} (Fig. 2A), presenting EC₅₀ of 25.9 and 26.4 mM, respectively. In contrast, the clones overexpressing LgODC and LgGSH1

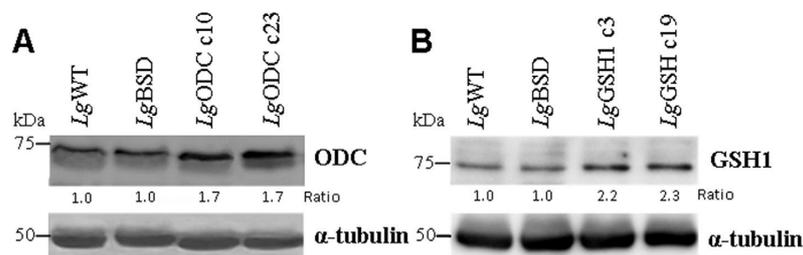


Fig. 1. Expression level of (A) ornithine decarboxylase (ODC) and (B) g-glutamylcysteine synthetase (GSH1) in *L. (V.) guyanensis*. Western blot from total cell lysates (40 mg protein/lane) separated on a 12% SDS polyacrylamide gel and probed with rabbit polyclonal antibodies anti-LgODC or anti-LgGSH1 (both diluted 1:200) and HRP-conjugated anti-rabbit IgG (dilution 1:5000). The signals for ODC and GSH1 were normalized using the anti- α -tubulin monoclonal antibody (dilution 1:5000). The *L. guyanensis* cell lines tested are LgWT: wild-type, LgBSD: LgWT transfected with the empty vector, LgODC c10 or c23: clone 10 or 23 from ODC overexpressor, LgGSH1 c3 or c19: clone 3 and 19 from GSH1 overexpressor.

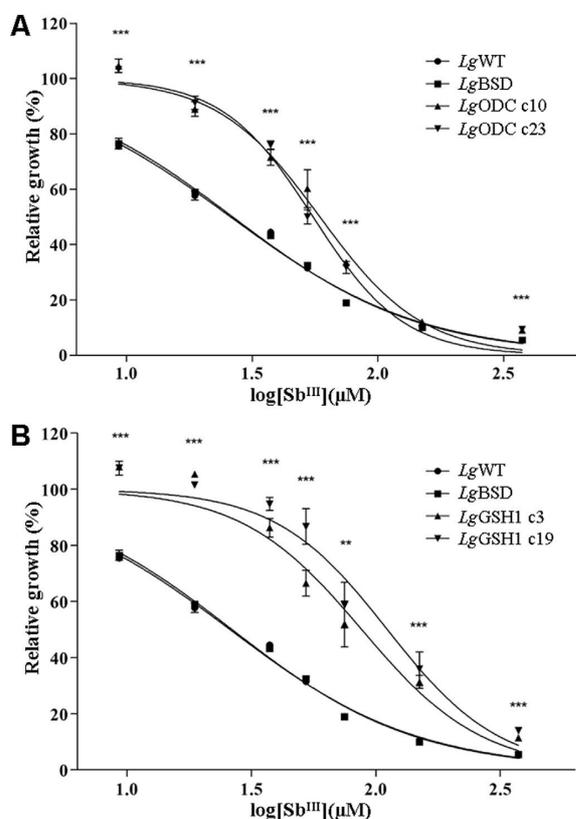


Fig. 2. Susceptibility to Sb^{III} of *L. (V.) guyanensis* cell lines overexpressing (A) ODC and (B) GSH1. Parasites were incubated in M199 medium in the absence or presence of various concentrations of Sb^{III} (9.3e374.2 mM) for 48 h and the percentage of relative growth determined using Z1 Coulter Counter. Mean values and standard deviations from four independent experiments are shown. Statistically different values (ANOVA one-way test, GraphPad Prism 5.0) are indicated as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$. LgWT: wild-type, LgBSD: LgWT transfected with the empty vector, LgODC c10 or c23: clone 10 or 23 from ODC overexpressor, LgGSH1 c3 or c19: clone 3 and 19 from GSH1 overexpressor.

showed a higher resistance against Sb^{III} (Fig. 2A and B). The Sb^{III} resistance indexes determined for the clones 10 and 23 from the LgODC cell line are about 2-fold higher than that of the LgWT cell

line (Table 1), showing EC_{50} of 58.7 and 55.2 mM, respectively. This result is in agreement with the expression level obtained for the ODC transgenic parasites. Interestingly, the LgGSH1 overexpressors clones 3 and 19 presented resistance indexes 3.4e4.3-fold than the LgWT line, presenting EC_{50} of 87.7 and 111.2 mM, respectively (Table 1).

In the pharmacological inhibition tests, the different *L. guyanensis* cell lines were pre-treated during 24 h with 50 mM DFMO or 10 mM BSO (EC_{50} concentration corresponding to the LgWT cell line) and subsequently exposed to different Sb^{III} concentrations for additional 24 h. The results show that treatment with DFMO or BSO reduced drastically parasite growth of LgWT in the presence of Sb^{III} . In contrast, cells overexpressing ODC or GSH1

were significantly more resistant to an identical treatment with the selective inhibitors and Sb^{III} (Fig. 3A and B). For instance, the susceptibility to Sb^{III} increased 648-fold for LgWT and only 1.5-fold for LgODC (clone 10) when parasites were pre-treated with DFMO (Table 1). Although to a minor extent, BSO treatment increased 20- and 4.1-fold the sensitivity towards Sb^{III} of LgWT and LgGSH1 (clone 3) parasites, respectively (Table 1). These data clearly demonstrate that inhibition of ODC and GSH1 sensitize parasites against anti-mony and, the opposite, overexpression of these enzymes confers resistance towards this drug.

In addition, the effect of a 48 h-combined treatment with BSO and Sb^{III} on LgWT and LgGSH1 (clone 3) lines was evaluated (Fig. 4). No difference on cell proliferation between LgWT and LgGSH1 lines was observed when 9.3 mM Sb^{III} was added alone (15e22% growth inhibition). We observed a reduction of 20% on cell proliferation of LgWT line and no change in the growth of LgGSH1 line when 5 mM BSO was added individually. On the other hand, an inhibition of approximately 6% was detected on cell proliferation of LgGSH1 line at concentration of 15 mM BSO. Interestingly, for the LgWT parasites, co-incubation with both 9.3 mM Sb^{III} and 5 mM BSO impaired cell growth to a significant extent (88% growth inhibition). In contrast, an identical treatment only halved the proliferation of LgGSH1 cells (45% growth inhibition) and it was necessary to increase 3 times the concentration of BSO (15 mM) to produce an inhibition of cell growth 73%. These results point to an important involvement of this enzyme in the Sb^{III} -resistance phenotype of *L. guyanensis*.

4. Discussion

Trypanosomatids present a unique thiol-based redox system that depends on a low molecular mass thiol, trypanothione, absent in mammals and indispensable for parasite survival, hence, being a promising target for chemotherapy. Besides of its central role in

Table 1

Effective concentration (EC₅₀) of Sb^{III} of *L. guyanensis* lines in the absence or presence of DMFO or BSO.

Leishmania lines	Sb ^{III} EC ₅₀ (95% CI)		Pharmacological inhibition tests				
	Sb ^{III} susceptibility assay		Pre-treated 50 mM DFMO - 24 h		Pre-treated 10 mM BSO - 24 h		
	Sb ^{III} (mM) 48 h	RI	Sb ^{III} (mM) 24 h	SI	Sb ^{III} (mM) - 24 h	SI	
LgWT	25.9 (24.45e27.51)	e	32.4 (30.53e34.4)	0.05 (0.0054e0.49)	648	1.6 (0.946e2.8)	20
LgBSD	26.4 (25.08e27.86)	e	e	e	e	e	e
LgODC c10	58.7 (53.99e63.95)	2.2	78.4 (63.3e97.05)	50.9 (42.33e61.42)	1.5	e	e
LgODC c23	55.2 (52.16e58.44)	2.1	e	e	e	e	e
LgGSH1 c3	87.7 (75.64e101.8)	3.4	99.3 (68.08e145)	e	e	24.06 (19.62e29.5)	4.1
LgGSH1 c19	111.2 (92.9e133.1)	4.3	e	e	e	e	e

95% CI: Confidence Interval.

LgWT: *L. guyanensis* wild-type.LgBSD: *L. guyanensis* transfected with pIR1-BSD empty vector.LgODC: *L. guyanensis* transfected with pIR1-LgODC.LgGSH1: *L. guyanensis* transfected with pIR1-LgGSH1.

c: clones.

RI: Resistance Index $\frac{1}{4}$ Sb^{III} EC₅₀ from LgODC or LgGSH1 clones/Sb^{III} EC₅₀ from LgWT.SI: Susceptibility Index $\frac{1}{4}$ Sb^{III} EC₅₀ from LgWT, LgODC or LgGSH1 clones without inhibitor/Sb^{III} EC₅₀ from each line in the presence of the specific inhibitor.

antioxidant metabolism, trypanothione is a target of antimony since this compound has been shown to alter the parasite's intra-cellular redox homeostasis by depleting trypanothione and glutathione and by inhibiting trypanothione reductase (Wyllie et al., 2004). Moreover, several studies have demonstrated an association between high trypanothione levels and antimony-resistant in *Leishmania* spp. (Mukhopadhyay et al., 1996, 2011; Mandal et al., 2007), which was ascribed to the overexpression of enzymes from its biosynthetic pathway such as: ODC and GSH1. However the majority of these studies were carried out in *Leishmania* species from Old World. Thus, understanding the role of ODC and GSH1 enzymes in antimony-resistance in New World *Leishmania* species can help to identify new targets and design appropriate combination therapies for disease treatment.

Leishmania species are capable to produce de novo and obtain polyamines from the host (Jiang et al., 1999; Boitz et al., 2009). Ornithine decarboxylase, the rate limiting enzyme of the spermidine biosynthetic pathway, has been shown to play an important role in parasite growth and virulence. A *L. donovani* strain knockout for *odc* was unable to sustain an efficient in vitro growth and infection of macrophages or mice except that intracellular poly-amine levels were restored in the parasite by genetic or metabolic (Boitz et al., 2009; Olenyik et al., 2011). The biological relevance of ODC for parasite survival in vitro and in vivo was further confirmed in these studies by pharmacological inhibition of the enzyme with DFMO, a specific and irreversible inhibitor of ODC (Bacchi et al., 1980; Kaur et al., 1986). Moreover, several studies reported a link between polyamine levels and drug resistance. For instance, transfection of *odc* in *L. donovani* increased the mRNA, protein and enzymatic activity levels of ODC, which yielded parasites resistant to antimony (Singh et al., 2007). The ODC mRNA levels, enzymatic activity, as well as putrescine and spermidine levels were increased in in vitro selected As^{III}-resistant *L. tarentolae* (Haimour et al., 1999). However, Sb^{III}-resistant *L. tarentolae* showed no difference in ODC mRNA levels when compared to the parental cell line (Haimour et al., 2000). *L. donovani* field isolates resistant to sodium antimony gluconate (SAG) presented gene amplification and an increased content and activity of ODC, as well as of putrescine and spermidine (Mukherjee et al., 2007; Singh et al., 2007; Rai et al., 2013). On the other hand, isolates of *L. donovani* resistant to Sb^V from Nepal presented lower ODC expression level compared to a sensitive isolate (Decuypere et al., 2005). Altogether, these data show differences in the expression and regulation of *odc* gene among antimony-resistant *Leishmania* species isolated from field or

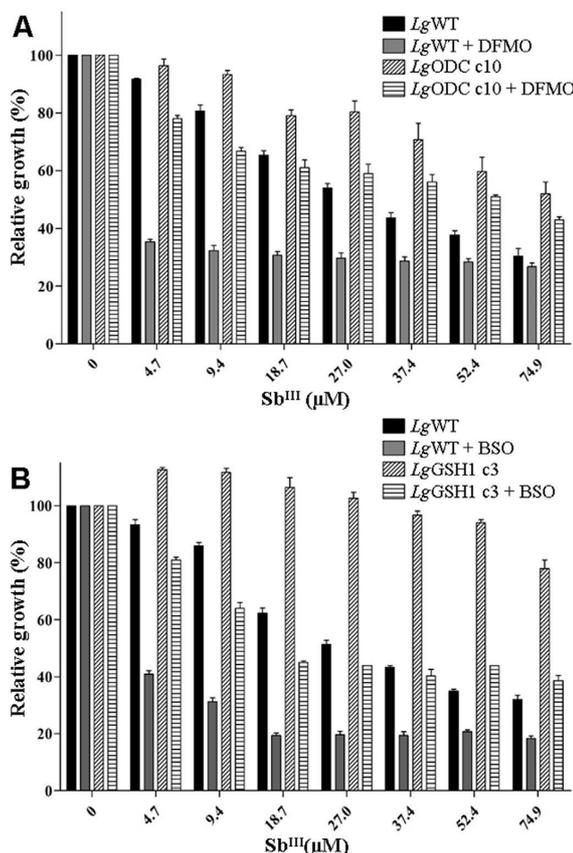


Fig. 3. Susceptibility to Sb^{III} of *L. (V) guyanensis* cell lines treated with a specific inhibitor of (A) ODC (DFMO) and (B) GSH1 (BSO). (A) LgWT and LgODC c10 parasites were pre-incubated with 50 mM DFMO (EC₅₀ for LgWT) for 24 h (B) LgWT and LgGSH1 c3 were pre-treated with 10 mM BSO (EC₅₀ for LgWT) for 24 h. Subsequently the parasites were plated and incubated additional 24 h with different Sb^{III} concentrations (4.7e74.9 μM). Cells were counted using a Z1 Coulter Counter and the relative cell growth with respect to non-treated parasites was estimated. The values shown represent the mean and standard deviations from three independent experiments. LgWT: wild-type, LgODC c10: clone 10 from ODC overexpressor, LgGSH1 c3: clone 3 from GSH1 overexpressor.

obtained by in vitro selection.

As shown here, overexpression of ODC in the New World species *Leishmania guyanensis* conferred a higher resistance towards DFMO and Sb^{III}, added alone or in combination. The degree of resistance to Sb^{III} of the transgenic cell line was proportional to its ODC content, where against the combination DFMO/Sb^{III} the ODC-over-expressor displayed a 600-fold lower susceptibility than wild-type parasites. At this point it is important to recall that DFMO is an irreversible inhibitor and that the half-life of *L. mexicana* ODC (76% protein sequence identity with LgODC) was estimated in >6 h (Carrillo et al., 2000). Thus, the striking difference in sensitive towards DFMO/Sb^{III} between both cell lines can be ascribed to the fact that under the assay conditions (DFMO added at the EC₅₀ for wild-type cells, 50 mM, for 24 h) a higher fraction of the endogenous ODC remains inhibited in the parental cell line with respect to that expressed by the transgenic cell line. Studies carried out with several *L. (V.) panamensis* laboratory- or field-strains resistant to Sb^V revealed that except for Sb^V-resistant amastigotes, which pre-sented a 21% lower antimony-resistance upon treatment with DFMO, the sensitivity towards Sb^{III} of most strains was not enhanced in the presence of high DFMO concentrations (6 mM (Goyeneche-Patino et al., 2008)). Probably *L. panamensis*, at variance with *L. guyanensis*, have efficient mechanisms to import exogenous polyamines (Basselin et al., 2000) and, thus, succeed in circumventing the effects of ODC inhibition.

g-Glutamylcysteine synthetase is the first and rate limiting step enzyme from the glutathione biosynthetic pathway that in related Trypanosoma species has been shown to exert kinetic control on the trypanothione pool (Lueder and Phillips, 1996; Olin-Sandoval et al., 2012). GSH1 has been shown to be essential for *L. infantum*, where it confers protection against oxidative stress and Sb^V (Mukherjee et al., 2009). Several reports have identified *gsh1* as a marker of resistance to (Arana et al., 1998; Mukherjee et al., 2007; Goyeneche-Patino et al., 2008; Moreira et al., 2013; Rai et al., 2013; Singh et al., 2014) and to therapeutic failure (Torres et al., 2010) in different pathogenic *Leishmania* species. For the non-pathogenic *L. tarentolae*, the co-amplification of a region containing the *mrpa* and *gsh1* genes was observed in As^{III} and Sb^{III}-resistant cells, which was associated with high levels of their transcripts, glutathione and trypanothione (Grondin et al., 1997; Haimeur et al., 2000; Guimond et al., 2003). However, the overexpression of *gsh1* alone or in combination with *mrpa* did not confer *L. tarentolae* with

resistance to Sb^{III} but, only the latter, to As^{III} (Grondin et al., 1997; Haimeur et al., 2000), suggesting the participation of additional molecules in the resistant mechanism towards these drugs. Different Sb^{III}/As^{III}-resistant *Leishmania* species reduced their resistance index to these drugs when treated with BSO (3e5 mM) (Grondin et al., 1997; Arana et al., 1998; Goyeneche-Patino et al., 2008). Here we show that overexpression or pharmacological inhibition of GSH1 in *L. guyanensis* de- or sensitize, respectively, the parasites against the detrimental effect of Sb^{III}.

The mode of action of Sb^{III} in *Leishmania* parasites is not completely understood, but it has been shown that the drug alters the mitochondrial membrane potential, leading to an increase in ROS production with concomitant fragmentation of DNA (Mehta and Shaha, 2006). On the other hand, Sb^{III} forms conjugates with glutathione and/or trypanothione, which are extruded from the cell by membrane pumps or sequestered into vesicles (Rai et al., 2013), hence contributing to deplete the pool of free thiols required to counteract the cytotoxic effect of ROS. Although our data indicate that ODC and GSH1 protects against the cytotoxic effects of anti-mony, the degree of contribution of each protein differs significantly. For instance, the susceptibility index of WT cells towards Sb^{III} was two orders of magnitude higher in parasites treated with DFMO than in those exposed to BSO. While ODC inhibition should only deplete trypanothione but not glutathione, the inhibition of GSH1 should lower the content of both thiols. A possible explanation for such discrepancy between this hypothetical metabolic scenario and our susceptibility data lies on a protective effect exerted by free polyamines. Cumulative evidence shows that polyamines are able to scavenge ROS and present a high affinity to bind, in particular spermidine, at varied sites of the DNA, where they not only regulate gene expression (e.g. stress-related genes) but also provide protection against ROS damage in vitro and in vivo (Bryson and Greenall, 2000; Rhee et al., 2007). Thus, it is tempting to speculate that upon ODC inhibition, the concomitant depletion of polyamines and trypanothione, will render the WT cells far more sensitive to Sb^{III} than those with a low thiol content. Future studies determining the polyamines or trypanothione levels of over-expressors lines and analyzing the reversion of growth inhibition by adding exogenous products of the GSH1 and ODC enzymes activities using their specific inhibitors will address all these issues and dissect the contribution to the antimony-resistance phenotype of other components from the parasite redox-system.

experiments. Statistically different values (Student t-test, GraphPad Prism 5.0) are indicated as follows: *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.0001.

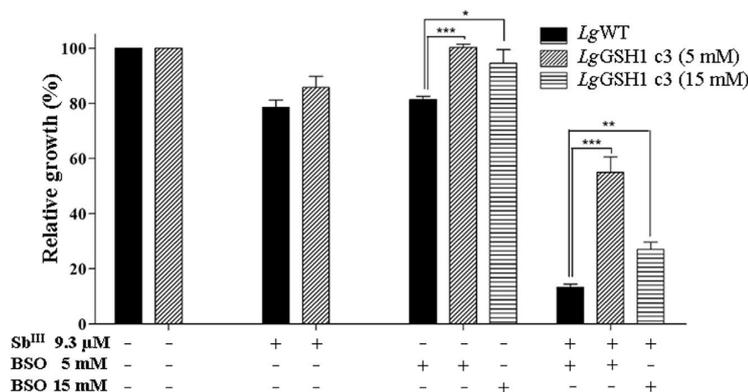


Fig. 4. Effect of BSO on the growth of *L. (V.) guyanensis* wild-type and GSH1-overexpressor treated with a sublethal concentration of Sb^{III}. Parasites (2 × 10⁶ cells mL⁻¹) were seeded into 24-well plates containing M199 medium. Parasites were exposed or not to Sb^{III} (9.3 mM) alone or with 5 mM (for LgWT and LgGSH1 c3) or 15 mM (only for LgGSH1 c3) BSO. The incubation was extended for 48 h and parasite number was assessed using a ZI Coulter Counter. The values represent mean and standard deviations from three independent experiments. Statistically different values (Student t-test, GraphPad Prism 5.0) are indicated as follows: *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.0001.

In conclusion, our data showed the direct involvement of ODC and GSH1 in Sb^{III}-resistance in *L. guyanensis* and provided evidence that a combined therapy with inhibitors of polyamine and/or glutathione/trypanothione biosynthesis may be a valuable strategy to minimize emergence of drug resistance, reduce drug toxicity and increase Sb^{III}-treatment efficacy for the disease caused by this parasite species.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities. We also thank to Dr. Stephen Beverley (Washington University in St. Louis e USA) for gently provided the pIR1-BSD plasmid and to Dr. Buddy Ullman (Oregon Health & Science University e USA) for kindly provided the polyclonal antibody anti-LdODC. Thank also to Dr. Rubens Lima do Monte Neto for suggestions during the development of the work and for critical reading of the manuscript and M.Sc. Jeronimo Rugani for the molecular characterization of *Leishmania* lines used in this study. The financial support for this investigation was provided by Conselho Nacional de Desenvolvi-

mento Científico e Tecnológico (CNPq/Universal 475782/2012-7), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - CBB-PPM 00196/13 and 00610/15), UNICEF/UNDP/ World Bank/WHO/TDR (A800692), P3D-Programa de descoberta e desenvolvimento de drogas (PROEPCNPq/FIOCRUZ 401988/2012-0) and RIPAg/CNPq/FIOCRUZ (402010/2012-4). S.M.F. Murta is research fellows supported by CNPq (National Council for the Development of Research of Brazil (304483/2015-0)), M.S. Fonseca is supported by CAPES and D.S. Moreira by CNPq (140435/2013-1). The support of FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund, COF 03/11) is gratefully acknowledged by M.A. Comini.

References

- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., Team, W.H.O.L.C., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- Ariana, F.E., Perez-Victoria, J.M., Repetto, Y., Morello, A., Castansy, S., Gamarro, F., 1998. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1201e1208.
- Arevalo, J., Ramirez, L., Adau, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verastegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Doncker, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J.C., Llanos-Cuentas, A., 2007. Influence of *Leishmania* (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 195, 1846e1851. <http://dx.doi.org/10.1086/518041>.
- Bacchi, C.J., Nathan, H.C., Hutner, S.H., McCann, P.P., Sjoerdsma, A., 1980. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Sci. (80-)* 210, 332e334.
- Basselin, M., Coombs, G.H., Barrett, M.P., 2000. Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 37e46. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)0234-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(00)0234-6).
- Berman, J.D., Gallalee, J.V., Best, J.M., 1987. Sodium stibogluconate (Pentostam) in-hibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem. Pharmacol.* 36, 197e201.
- Bermúdez, H., Rojas, E., García, L., Desjeux, P., Dujardin, J.C., Boelaert, M., Chappuis, F., 2006. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100, 591e600. <http://dx.doi.org/10.1179/136485906X118495>.
- Beverley, S.M., 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 417e444. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.45.100191.002221>.
- Birkholz, L.M., Williams, M., Niemand, J., Louw, A.I., Persson, L., Heby, O., 2011. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochem. J.* 438, 229e244. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20110362>.
- Boitz, J.M., Yates, P.A., Kline, C., Gaur, U., Wilson, M.E., Ullman, B., Roberts, S.C., 2009. *Leishmania donovani* ornithine decarboxylase is indispensable for parasite survival in the mammalian host. *Infect. Immun.* 77, 756e763. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01236-08>.
- Bryson, K., Greenall, R.J., 2000. Binding sites of the polyamines putrescine, cadaverine, spermidine and spermine on A- and B-DNA located by simulated annealing. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 18, 393e412. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2000.10506676>.
- Carrillo, C., Cajas, S., Cortes, M., Ceriani, C., Huber, A., Gonzalez, N.S., Algranati, I.D., 2000. Sensitivity of trypanosomatid protozoa to DFMO and metabolic turnover of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 663e668. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3996>.
- Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H., 1995. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur. J. Biochem.* 230, 460e468.
- Decuyper, S., Rijal, S., Yardley, V., De Doncker, S., Laurent, T., Khanal, B., Chappuis, F., Dujardin, J.C., 2005. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb^{III} resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4616e4621. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.11.4616-4621.2005>.
- Gamarro, F., Chiquero, M.J., Amador, M.V., Legare, D., Ouellette, M., Castansy, S., 1994. P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1939e1947.
- Goyeneche-Patino, D.A., Valderrama, L., Walker, J., Saravia, N.G., 2008. Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4503e4506. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01075-08>.
- Gronin, K., Haimeur, A., Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Ouellette, M., 1997. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J.* 16, 3057e3065. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.11.3057>.
- Guerra, J.A., Prestes, S.R., Silveira, H., Coelho, L.I., Gama, P., Moura, A., Amato, V., Barbosa, M., Ferreira, L.C., 2011. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e980. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.000980>.
- Guimond, C., Trudel, N., Brochu, C., Marquis, N., El Fadil, A., Peytavi, R., Briand, G., Richard, D., Messier, N., Papadopoulou, B., Corbeil, J., Bergeron, M.G., Legare, D., Ouellette, M., 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 31, 5886e5896.
- Haimeur, A., Guimond, C., Pilot, S., Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Poulin, R., Ouellette, M., 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* 34, 726e735.
- Haimeur, A., Brochu, C., Genest, P., Papadopoulou, B., Ouellette, M., 2000. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonate (Sb^{III}) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 131e135.
- Haldar, A.K., Sen, P., Roy, S., 2011. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol. Biol. Int.* 2011, 571242. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/571242>.
- Jiang, Y., Roberts, S.C., Jardim, A., Carter, N.S., Shih, S., Ariyanayagam, M., Fairlamb, A.H., Ullman, B., 1999. Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 274, 3781e3788.
- Kaur, K., Emmett, K., McCann, P.P., Sjoerdsma, A., Ullman, B., 1986. Effects of DL-alpha-difluoromethylornithine on *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Protozool.* 33, 518e521.
- Kumar, R., Engwerda, C., 2014. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin. Transl. Immunol.* 3, e13. <http://dx.doi.org/10.1038/cti.2014.4>.
- Liarte, D.B., Murta, S.M.F., 2010. Selection and phenotype characterization of postassium antimony tartrate-resistant populations of four new world *Leishmania* species. *Parasitol. Res.* 107, 205e212. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1852-8>.
- Lueder, D.V., Phillips, M.A., 1996. Characterization of *Trypanosoma brucei* gamma-glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionylspermidine). *J. Biol. Chem.* 271, 17485e17490.
- Mandal, G., Wylie, S., Singh, N., Sundar, S., Fairlamb, A.H., Chatterjee, M., 2007. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology* 134, 1679e1687. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182007003150>.
- Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M., Radi, R., 2013. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3199e3216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.013>.
- Melita, A., Shaña, C., 2006. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1857e1868. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.024>.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711e760. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>.
- Mohapatra, S., 2014. Drug resistance in leishmaniasis: newer developments. *Trop. Parasitol.* 4, 4e9. <http://dx.doi.org/10.4103/2229-5070.129142>.
- Moreira, D.S., Monte Neto, R.L., Andrade, J.M., Santi, A.M., Reis, P.G., Frezard, F., Murta, S.M., 2013. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four new world *Leishmania* spp. susceptible and resistant to antimony. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 3, 143e153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijddr.2013.08.001>.

- Mukherjee, S.B., Das, M., Sudhandiran, G., Shaha, C., 2002. Increase in cytosolic Ca^{2+} levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* 277, 24717–24727. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201961200>.
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P.K., Singh, S., Roy, G., Girard, I., Chatterjee, M., Ouellette, M., Madhubala, R., 2007. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 2046–2111. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl494>.
- Mukherjee, A., Roy, G., Guimond, C., Ouellette, M., 2009. The gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. *Mol. Microbiol.* 74, 914–927. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06907.x>.
- Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., Gage, D., Lightbody, J., Ouellette, M., Rosen, B.P., 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10383–10387.
- Mukhopadhyay, R., Mukherjee, S., Mukherjee, B., Naskar, K., Mondal, D., Decypere, S., Ostyn, B., Prajapati, V.K., Sundar, S., Dujardin, J.C., Roy, S., 2011. Characterisation of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. *Int. J. Parasitol.* 41, 1311–1321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.07.013>.
- Müller, S., Coombs, G.H., Walter, R.D., 2001. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends Parasitol.* 17, 242–249.
- Murta, S.M., Krieger, M.A., Montenegro, L.R., Campos, F.F., Probst, C.M., Avila, A.R., Muto, N.H., de Oliveira, R.C., Nunes, L.R., Nirde, P., Bruna-Romero, O., Goldenberg, S., Romanha, A.J., 2006. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benzimidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 151–162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.12.001>.
- Olenyik, T., Gilroy, C., Ullman, B., 2011. Oral putrescine restores virulence of ornithine decarboxylase-deficient *Leishmania donovani* in mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 176, 109–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.12.004>.
- Olin-Sandoval, V., Moreno-Sanchez, R., Saavedra, E., 2010. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr. Drug Targets* 11, 1614–1630.
- Olin-Sandoval, V., Gonzalez-Chavez, Z., Berzunza-Cruz, M., Martínez, I., Jasso-Chavez, R., Becker, I., Espinoza, B., Moreno-Sanchez, R., Saavedra, E., 2012. Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *FEBS J.* 279, 1811–1833. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08557.x>.
- Oliveira-Neto, M.P., Schubach, A., Mattos, M., Gonçalves-Costa, S.C., Pírmex, C., 1997. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 651–655.
- Palacios, R., Osorio, L.E., Grajales, L.F., Ochoa, M.T., 2001. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 187–193.
- Rai, S., Bhaskar, Goel, S.K., Nath Dwivedi, U., Sundar, S., Goyal, N., 2013. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. *PLoS One* 8, e74862. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074862>.
- Rhee, H.J., Kim, E.J., Lee, J.K., 2007. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.* <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00077.x>.
- Robinson, K.A., Beverley, S.M., 2003. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 217–228.
- Sarkari, B., Naraki, T., Ghatge, M.A., Abdolahi Khabisi, S., Davami, M.H., 2016. Visceral leishmaniasis in southwestern Iran: a retrospective clinico-hematological analysis of 380 consecutive hospitalized cases (1999–2014). *PLoS One* 11, e0150406. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150406>.
- Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M., Zilberstein, D., 2001. Novel intracellular Sb^{V} reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 276, 3971–3976. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M005423200>.
- Singh, S., Mukherjee, A., Khomutov, A.R., Persson, L., Heby, O., Chatterjee, M., Madhubala, R., 2007. Antileishmanial effect of 3-aminooxy-L-aminopropane is due to polyamine depletion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 528–534. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01055-06>.
- Singh, N., Chatterjee, M., Sundar, S., 2014. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. *Parasit. Vectors* 7, 596. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0596-1>.
- Sudhandiran, G., Shaha, C., 2003. Antimonial-induced increase in intracellular Ca^{2+} through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Biol. Chem.* 278, 25120–25132. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M301975200>.
- Sundar, S., 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Heal.* 6, 849–854.
- Tessarollo, N.G., Andrade, J.M., Moreira, D.S., Murta, S.M.F., 2015. Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasitol. Int.* 64, 125–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.11.001>.
- Torres, D.C., Adau, V., Ribeiro-Alves, M., Romero, G.A., Arvalo, J., Cupolillo, E., Dujardin, J.C., 2010. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infect. Genet. Evol.* 10, 727–733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.05.006>.
- WHO, 2016. World Health Organization. <http://www.who.int/media/centre/factsheets/fs375/en/> (accessed 6.8.16).
- Wyllie, S., Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H., 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 279, 39925–39932. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M405635200>