

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

ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES DA ENZIMA FERRO SUPERÓXIDO DISMUTASE-A E
DA PROTEÍNA DE MEMBRANA DOS KINETOPLASTÍDEOS-11 EM LINHAGENS DE
Leishmania SELVAGENS E RESISTENTES AO ANTIMONIAL TRIVALENTE.

por

Nayara Gusmão Tessarollo

Belo Horizonte
Fevereiro / 2013

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

ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES DA ENZIMA FERRO SUPERÓXIDO DISMUTASE-A E
DA PROTEÍNA DE MEMBRANA DOS KINETOPLASTÍDEOS-11 EM LINHAGENS DE
Leishmania SELVAGENS E RESISTENTES AO ANTIMONIAL TRIVALENTE.

por

Nayara Gusmão Tessarollo

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do título de Mestre em Ciências na
área de concentração Biologia Celular e
Molecular.

Orientação: Dr(a). Silvane Maria Fonseca Murta

Belo Horizonte
Fevereiro / 2013

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

T338a Tassarollo, Nayara Gusmão.
2013

Análise funcional dos genes Ferro Superóxido Dismutase-A e Proteína de Membrana dos Kinetoplastídeos-11 em linhagens de *Leishmania* selvagens e resistentes ao antimonial trivalente / Nayara Gusmão Tassarollo. – Belo Horizonte, 2013.

xviii, 114 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 126 - 132

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre 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. Resistência a Medicamentos/efeitos de drogas I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES DA ENZIMA FERRO SUPERÓXIDO DISMUTASE-A E
DA PROTEÍNA DE MEMBRANA DOS KINETOPLASTÍDEOS-11 EM LINHAGENS DE
Leishmania SELVAGENS E RESISTENTES AO ANTIMONIAL TRIVALENTE.

por

Nayara Gusmão Tessarollo

Banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Presidente)

Prof. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Carlos Renato Machado (UFMG)

Suplentes: Dra. Caryne Margotto Bertollo (CPqRR/FIOCRUZ)

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2013.

*Dedico aos meus pais, Luiz e Marli,
e a minha irmã Rayelle.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho, guiar meus passos e tornar tudo isso possível.

Ao meu pai, a minha mãe e à Rayelle pelo amor incondicional, pela força em todos os momentos e por acreditarem em mim.

À Dra. Silvane Maria Fonseca Murta pela oportunidade e orientação durante a execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, Dr. Carlos Renato Machado e Dra. Caryne Margotto Bertollo por aceitarem prontamente o nosso convite.

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 coordenação do programa de Pós-Graduação do CPqRR.

À agência de fomento Capes pela bolsa de estudo concedida.

Ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, na pessoa do Dr. Guilherme Correa de Oliveira pela excelente infraestrutura de trabalho oferecida.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação e pela catalogação.

À Plataforma de PCR em Tempo Real, através da Dra. Isabela Cerávolo e da Dra. Fernanda Nogueira, pelos serviços prestados.

À equipe do Biotério e Central de Esterilização pela ajuda e colaboração sempre que necessário.

Ao senhor Jaci de Souza pela ajuda na imunização de coelhos.

Ao Dr. Policarpo por todo o auxílio nos experimentos realizados no Biotério.

À Dra. Caryne Margotto Bertollo por ter prontamente me ajudado nos experimentos de infecção em células THP-1. Obrigada por todo aprendizado, amizade e incentivo.

Às secretárias Mara e Márcia pelo excelente trabalho realizado.

À Rosana, Joyce e Kênia por todo o empenho na organização do laboratório.

Aos pesquisadores Rosiane, Marina, Jerônimo e Laila pela convivência e pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos do LPCM por ter me recebido tão bem, pela amizade, carinho e pelo apoio: Anna Christina, Bárbara, Elisângela, Fernanda Sales, Fernanda Ludolf, Flávio, Karina, Lívia, Luciana, Maíra, Mariana, Mercedes, Núbia e Paola.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa: Aízes Tatiane, Antônio, Ana Maria, Ana Paula, Douglas, Fabiana, Isabella, Juvana, Laila, Rafael e por toda ajuda, amizade, companheirismo e aprendizado.

À minha amiga Sandra pela amizade, paciência, palavras de incentivo e por toda a ajuda.

À Juvana pela grande amizade e por todo o apoio para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia.....	1
1.2 Agente etiológico.....	3
1.3 Ciclo biológico do parasito	4
1.4 Organização genômica de <i>Leishmania</i> spp.	6
1.5 Quimioterapia.....	8
1.7 Mecanismos de resistência ao antimonial.....	10
1.8 Ferro Superóxido Dismutase-A	12
1.9 Proteína de Membrana dos Kinetoplastídeos-11	14
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Obtenção das linhagens de <i>Leishmania</i> spp. e cultivo dos parasitos	20
4.2 Extração de DNA Genômico	21
4.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	22
4.4 Extração de proteínas totais	23
4.5 Condições utilizadas para amplificação pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	24
4.6 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida.....	25
4.7 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	26
4.8 Preparo das sondas e Ensaios de Hibridização.....	26
4.9 <i>Southern blot</i>	27
4.10 <i>Northern blot</i>	28
4.11 Análise da expressão gênica usando RT-qPCR	29
4.12 Preparo de Células Cálcio competentes	30
4.13 Clonagem em vetor pGEM [®] -T Easy.....	30

4.14 Sequenciamento	31
4.15 Sub-clonagem das regiões codificadoras dos genes <i>kmp-11</i> e <i>fesod-a</i>	32
4.16 Expressão da proteína recombinante KMP-11	33
4.16.1 Clonagem do gene <i>kmp-11</i> no vetor de expressão	33
4.16.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	34
4.16.3 Teste de solubilidade e purificação da proteína recombinante KMP-11 ..	35
4.16.4 Obtenção do anticorpo policlonal anti- KMP-11	36
4.17 <i>Western blot</i>	36
4.18 Transfecção em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	37
4.19 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente.....	38
4.20 Efeito da superexpressão de FESOD-A na tolerância de linhagens de <i>Leishmania</i> spp. ao paraquat.....	39
4.21 Ensaio da atividade enzimática de FeSOD-A em <i>Leishmania</i> spp.	39
4.22 Infecção de células THP-1 com linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagens e transfectadas com o gene <i>kmp-11</i>	40
4.23 Infectividade de linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagens e transfectadas com o gene <i>kmp-11</i> em camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ	41
4.24 Análise Densitométrica	41
4.25 Análises estatísticas.....	41
5. RESULTADOS	43
5.1 Ferro superóxido dismutase-A	43
5.1.1 Análise da região codificadora do gene <i>fesod-a</i> de <i>L. (V.) guyanensis</i> selvagem	43
5.1.2 Organização do gene <i>fesod-a</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII	43
5.1.3 Nível de mRNA em <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	45
5.1.4 Expressão da proteína FeSOD-A em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII	48
5.1.5 Transfecção da construção pIR1-BSD-FeSOD-A em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII	49
5.1.6 Curva de crescimento dos parasitos transfectados	54
5.1.7 Atividade enzimática da SOD em linhagens de <i>Leishmania</i> spp.	55
5.1.8 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente	58
5.1.9 Efeito da superexpressão de FeSOD-A na susceptibilidade de linhagens de <i>Leishmania</i> spp. ao paraquat.....	62

5.2 Proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11	65
5.2.1 Análise da região codificadora do gene <i>kmp-11</i> de <i>L. (V.) braziliensis</i>	65
5.2.2 Organização do gene <i>kmp-11</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII	65
5.2.3 Nível de mRNA em <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	67
5.2.4 Clonagem e expressão da proteína recombinante KMP-11	70
5.2.5 Caracterização da proteína recombinante KMP-11	71
5.2.5.1 Teste de solubilidade e purificação da proteína recombinante.....	71
5.2.6 Expressão da proteína KMP-11 em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII	73
5.2.7 Transfecção da construção pIR1-BSD-KMP-11 em linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagens e resistentes ao SbIII	74
5.2.8 Curva de crescimento dos parasitos transfectados	77
5.2.9 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente	78
5.2.10 Infecção de células THP-1 com linhagens selvagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> não-transfectadas e transfectadas com o gene <i>kmp-11</i>	81
5.2.11 Infectividade de linhagens de selvagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> não-transfectadas e transfectadas com o gene <i>kmp-11</i> em camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ	84
6. DISCUSSÃO	87
8.0 PERSPECTIVAS	99
9. ANEXOS	101
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica das leishmanioses.	2
Figura 2: Ciclo de vida digenético do parasito <i>Leishmania</i>	5
Figura 3: Metabolismo do antimonial e transporte para o macrófago e o parasito. .	10
Figura 4: Fluxograma dos experimentos realizados para a caracterização dos genes <i>fesod-a</i> e <i>kmp-11</i> nas linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	21
Figura 5: Mapa do vetor pGEM-T Easy.....	31
Figura 6: Fluxograma dos experimentos realizados para análise funcional dos gene <i>fesod-a</i> e <i>kmp-11</i>	32
Figura 7: Análise de Southern blot do gene FeSOD-A em linhagens de <i>Leishmania</i> spp selvagens e resistentes ao SbIII.....	44
Figura 8: Análise de Northern blot do gene <i>fesod-a</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	46
Figura 9: Quantificação do nível de mRNA do gene <i>fesod-a</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII por RT-qPCR.....	48
Figura 10: Quantificação da expressão do gene <i>fesod-a</i> em linhagens selvagens e resistentes de <i>Leishmania</i> ssp.	48
Figura 11: Expressão da proteína FeSOD-A em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	49
Figura 12: Clonagem in silico da região codificadora do gene <i>fesod-a</i> em vetor de expressão pIR1-BSD.....	50
Figura 13: Construção pIR1-BSD-FeSOD-A digerido com a endonuclease <i>SphI</i> para confirmar a correta orientação do inserto.	50
Figura 14: Seleção dos clones transfectados com vetor sem inserto (controle) e com a construção pIR1-BSD-FeSOD-A por PCR das linhagens selvagens e resistentes de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	52
Figura 15: Análise de Western blot das linhagens de LbWTS e LbSbR não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e os clones superexpressores.....	53
Figura 16: Análise de Western blot das linhagens de LcWTS e LcSbR não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e os clones superexpressores.....	54
Figura 17: Curva de crescimento dos parasitos não-transfectados, transfectados com o vetor sem inserto e superexpressando a enzima FeSOD-A de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i> selvagens e resistentes ao SbIII	55
Figura 18: Inibição da autoxidação do pirogalol utilizando a enzima superóxido dismutase bovina (SOD Bovina) como padrão.	56

Figura 19: Inibição da autoxidação de várias concentrações de pirogalol medida em 405nm em 5, 10 e 15 min.....	56
Figura 20: Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> ao SbIII em linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagens e resistentes ao SbIII.....	60
Figura 21: Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> ao SbIII em linhagens de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> selvagens e resistentes ao SbIII.....	61
Figura 22: Efeito do paraquat em linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i> selvagens e resistentes ao SbIII.	63
Figura 23: Análise de Southern blot do gene <i>kmp-11</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	66
Figura 24: Análise de Northern blot da expressão do gene <i>kmp-11</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	68
Figura 25: Quantificação do nível de mRNA do gene <i>kmp-11</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII por RT-qPCR.....	69
Figura 26: Quantificação da expressão do gene <i>kmp-11</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII por RT-qPCR.....	70
Figura 27: Indução da expressão da proteína recombinante KMP-11 em células M15 [pREP4].....	71
Figura 28: Purificação da proteína recombinante KMP-11 em resina Ni ²⁺ -NTA.	72
Figura 29: Western blot usando o anticorpo policlonal de coelho contra a proteína recombinante KMP-11.....	73
Figura 30: Expressão da proteína KMP-11 em linhagens de <i>Leishmania</i> spp. selvagens e resistentes ao SbIII.....	74
Figura 31: Clonagem <i>in silico</i> da região codificadora do gene <i>kmp-11</i> em vetor de expressão pIR1-BSD.....	75
Figura 32: Construção pIR1-BSD-KMP-11 digerido com a endonuclease <i>Sma</i> I para confirmar a correta orientação do inserto.....	75
Figura 33: Seleção dos clones transfectados com vetor sem inserto (controle) e com a construção pIR1-BSD-FeSOD-A por PCR das linhagens selvagens e resistente de <i>L. (V.) braziliensis</i> transfectadas com a construção pIR1-BSD-KMP-11.....	76
Figura 34: Análise de <i>Western blot</i> das linhagens de LbWTS e LbSbR não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e os clones superexpressores.....	77
Figura 35: Curva de crescimento dos parasitos não-transfectados, transfectados com o vetor sem inserto e com a construção pIR1-BSD_KMP-11 em <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagens e resistentes ao SbIII.....	78
Figura 36: Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> ao SbIII em linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagens e resistentes, não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio e transfectadas com a construção pIR1-BSD-KMP-11.....	80

Figura 37: Patologia induzida em camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ por linhagens selvagens de <i>L. (V.) braziliensis</i>	84
Figura 38: Infectividade das linhagens selvagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> não-transfectadas (LbWTS) e transfectadas com o gene <i>kmp-11</i>	85

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Digestão do DNA genômico de <i>Leishmania</i> spp. com enzimas de restrição para <i>Southern blot</i>	28
Tabela 1: Espécies de <i>Leishmania</i> que causam doenças em humanos.	3
Tabela 2: Susceptibilidade das linhagens de <i>Leishmania</i> selvagens (WTS) e resistentes (SbR) ao SbIII obtidas por Liarte & Murta (2010).	21
Tabela 3: Iniciadores usados na clonagem, RT-PCR, expressão da proteína recombinante KMP-11 e na seleção dos clones transfectados com o marcador molecular que confere resistência a blasticidina.	25
Tabela 4: Atividade superóxido dismutase (SOD) de extratos protéicos brutos de amostras de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i> selvagens e resistentes ao SbIII.	58
Tabela 5: Resumo dos resultados dos ensaios de RT-qPCR, <i>Western blot</i> e atividade enzimática em linhagens de <i>Leishmania</i> spp.	64
Tabela 6: Resumo dos resultados de transfecção da enzima FeSOD-A, atividade da enzima e ensaios de susceptibilidade ao SbIII das linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i> selvagens e resistentes ao SbIII.	64
Tabela 7: Avaliação do número de macrófagos infectados.	81
Tabela 8: Curso da infecção avaliado em três tempos 2,5 h, 5h e 24 h após a interação parasito-macróforo.	82
Tabela 9: Porcentagem de inibição da infecção dos macrófagos pelos clone 6 e 7 de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagem após o tratamento com diferentes concentrações de SbIII.	83
Tabela 10: Porcentagem de inibição da infecção dos macrófagos pelos clone 6 e 7 de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagem após o tratamento com diferentes concentrações de Anfotericina B.	83
Tabela 11: Resumo dos resultados dos ensaios de RT-qPCR e <i>Western blot</i> em linhagens de <i>Leishmania</i> spp.	85
Tabela 12: Resumo dos resultados de transfecção da proteína KMP-11 e ensaios de susceptibilidade ao SbIII das linhagens de <i>L. (V.) braziliensis</i> selvagens e resistentes ao SbIII.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- CIAP – Fosfatase Alcalina de Intestino de bezerro
- cDNA – DNA complementar
- Ct – Cycle threshold
- dATP – desoxiadenosina trifosfato
- dCTP – desoxicitidina trifosfato
- DEPC – dietil-pirocarbonato
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- dNTP – Deoxinucleosídeo trifosfato
- DTT – Ditioneitol
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- HCl – Ácido clorídrico
- HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
- IPTG – Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
- Kb – Kilobases
- KCl – Cloreto de potássio
- kDa – Kilodáltons
- KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
- K₂HPO₄ – Fosfato de potássio dibásico
- Mb – Megabase
- Meio 199 – Meio de cultura
- MgCl₂ – Cloreto de magnésio
- MOPS – Ácido 3-(N- morfolino)- propanossulfônico
- mRNA – RNA mensageiro
- NaCl – Cloreto de sódio
- Na₂H₂PO₄ – Fosfato de sódio dibásico
- NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico
- NaOH – Hidróxido de sódio
- oligo-d(T) – pequena sequência de nucleotídeos de deoxitimina
- pb – Pares de bases
- [³²P] – Fósforo 32 radioativo
- PBS – Tampão salina fosfato

PBS-T – Tampão salina fosfato acrescido de Tween 20
pH – Potencial hidrogeniônico
pmoles – Picomoles
RNA – Ácido ribonucléico
RNase – Ribonuclease
rRNA – RNA ribossomal
RPMI – Meio de cultura e de tecido
mRNA – RNA mensageiro
SDS – Dodecil sulfato de sódio
spp. – Espécie
SSC – Tampão citrato de sódio
TBE – Tampão Tris-borato EDTA, pH 8,0
TBS-T Tampão Tris-borato Sódio acrescido Tween 20
TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

RESUMO

Em nosso estudo caracterizamos a enzima ferro superóxido dismutase-A (FeSOD-A) e a proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 (KMP-11) em linhagens de *Leishmania* spp. do Novo Mundo selvagens e resistentes aos antimoniais. Ambas proteínas apresentam grande relevância no metabolismo do parasito, visto que a enzima FeSOD-A está envolvida na defesa antioxidante e KMP-11, presente na superfície da membrana dos kinetoplastídeos, pode estar relacionada ao fenótipo de resistência do parasito ao antimonial. Análise de *Southern blot* mostrou a presença de polimorfismos na sequência do gene FeSOD-A entre as linhagens de *Leishmania* avaliadas. A expressão de FeSOD-A foi analisada utilizando anticorpo policlonal (TcFeSOD) que reconheceu um polipeptídeo de 26 kDa em todas as linhagens estudadas. Quantificação por qPCR mostrou que o mRNA do gene é 3,6X menos expresso na linhagem *L. guyanensis* resistente LgSbR, por outro lado a proteína está 2,0X mais expressa nessa linhagem. A FeSOD-A está 3,0X menos expressa em *L. amazonensis* resistente LaSbR, mas o nível de mRNA foi o mesmo entre as linhagens LaWTS e LaSbR. Ensaio de atividade enzimática mostraram que FeSOD-A possui maior atividade nas linhagens resistentes de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* (LbSbR e LcSbR) comparado com as linhagens selvagens. A análise funcional foi realizada para determinar se a superexpressão do gene FeSOD-A nas linhagens LbWTS/LbSbR e LcWTS/LcSbR iria alterar o fenótipo de resistência dos parasitos transfectados. Ensaio de *Western blot* e de atividade enzimática mostraram que o nível de expressão da proteína e atividade da FeSOD-A foram maiores nos parasitos transfectados em comparação com os não-transfectados. Análise IC₅₀ do SbIII mostrou que a superexpressão FeSOD-A nas linhagens de LbWTS e LcWTS aumentou 1,7X e 1,6X o fenótipo de resistência ao antimônio, respectivamente. A superexpressão da enzima FeSOD-A na linhagem LbSbR reduziu o fenótipo resistência, enquanto que na linhagem LcSbR não houve alteração no fenótipo. Resultados de tolerância ao estresse oxidativo induzido por paraquat mostrou que o clone superexpressor de LbWTS apresentou maior proteção ao estresse comparado à linhagem não-transfectada. Concluindo, nossos resultados sugerem que a enzima FeSOD-A está envolvida no fenótipo de resistência de *L. braziliensis* e *L. chagasi* ao antimonial. Para o gene KMP-11 análise por *Southern blot* mostrou semelhante perfil de hibridização entre as diferentes espécies analisadas, com exceção da linhagem LgWTS que apresentou perfil de fragmentos diferentes. Análise de *Northern blot* revelou a presença de dois transcritos, 1,0 Kb e 3,0 Kb, em todas as linhagens de *Leishmania* spp., com exceção da linhagem LgWTS que apresentou apenas um transcrito de 1,0 Kb. Quantificação por qPCR mostrou que mRNA do gene KMP-11 está 2,9X menos expresso na linhagem de LbSbR e 1,5X mais expresso na linhagem LcSbR comparado com os respectivos pares selvagens. A expressão de KMP-11 utilizando anticorpo policlonal anti-KMP-11, mostrou que ele reconheceu um polipeptídeo de 11 kDa em todas as linhagens de *Leishmania* spp. estudadas. Análises de densitometria mostraram que KMP-11 está 1,5X mais expressa em LcSbR comparado com o par selvagem LcWTS e 2,0X menos expressa em LbSbR comparado ao par LbWTS. Ensaio de transfecção do gene KMP-11 foram realizados nas linhagens LbWTS e LbSbR. Análise de *Western blot* mostrou maior expressão da proteína KMP-11 nos parasitos resistentes transfectados. Avaliação da susceptibilidade ao SbIII mostrou que a superexpressão de KMP-11 na linhagem selvagem de LbWTS não alterou o fenótipo. Por outro lado, a superexpressão dessa proteína na linhagem resistente (LbSbR) reduziu o fenótipo resistência. Ensaio *in vitro* e *in vivo* com as linhagens LbWTS não-transfectadas e os clones transfectados com KMP-11 não mostraram diferenças quanto à infectividade dos parasitos em células THP-1 e em camundongos nocaute para interferon- γ . Apenas o clone 6 apresentou menor infectividade em camundongos. Estudos adicionais são necessários para investigar melhor a possível participação da proteína KMP-11 no fenótipo de resistência ao antimonial e na infectividade dos parasitos.

ABSTRACT

In this study, we characterize the iron superoxide dismutase-A (FeSOD-A) enzyme and kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) in New World *Leishmania* spp. lines wild and resistant to antimonials. Both proteins are very important in metabolism of the parasite, since that FeSOD-A is involved in antioxidant defense and KMP-11, present on the surface of kinetoplastids membrane, may be related to antimony-resistance phenotype. *Southern blot* analysis showed the presence of polymorphisms in the FeSOD-A gene sequence between the *Leishmania* lines evaluated. The expression level of FeSOD-A was analyzed using polyclonal antibody (anti-TcFeSOD) that recognized a polypeptide of 26 kDa in all lines studied. Quantification by qPCR showed that the FeSOD-A mRNA is 3.6-fold less expressed in SbIII-resistant *L. guyanensis* line (LgSbR), on the other hand the protein is 2.0-fold more expressed in this line. FeSOD-A is 3.0-fold less expressed in *L. amazonensis* resistant line (LaSbR), but the level of mRNA was the same between LaWTS and LaSbR lines. Enzymatic activity assays showed that SbIII-resistant *L. braziliensis* and *L. infantum chagasi* lines (LbSbR and LcSbR) present a higher FeSOD-A activity than their susceptible pairs. Functional analysis was performed to determine whether overexpression of the FeSOD-A gene in LbWTS/LbrSbR and LcWTS/LcSbR lines should alter the SbIII-resistance phenotype of transfected parasites. *Western blot* and enzymatic activity assays showed that the protein expression level and activity of FeSOD-A were higher in the transfected parasites compared to non-transfected ones. Analysis of IC₅₀ for SbIII showed that the overexpression of FeSOD-A in the LbWTS and LcWTS lines increased 1.7- and 1.6-fold the SbIII-resistance phenotype, respectively. Overexpression of FeSOD-A enzyme in the LbSbR line reduced the SbIII-resistance phenotype, whereas in the LcSbR line no change in phenotype was observed. Results about the tolerance of parasites to oxidative stress induced by paraquat showed that the clone from LbWTS overexpressor of FeSOD-A presented higher protection to stress compared to non-transfected lines. In conclusion, our results suggest that the FeSOD-A enzyme may be involved to antimony-resistance phenotype in *L. braziliensis* and *L. chagasi* lines. Concerning KMP-11 gene, *Southern blot* analysis showed similar hybridization profile between different *Leishmania* lines analyzed, with exception of LgWTS line that presented different profile. *Northern blot* analysis revealed the presence of two transcripts, 1.0 kb and 3.0 kb in all lines of *Leishmania* analyzed, except for LgWTS line that showed only a transcript of 1.0 kb. Quantification by qPCR showed that mRNA KMP-11 is 2.9-fold less expressed in LbSbR line and 1.5-fold more expressed in LcSbR line compared with their wild pairs. The expression of KMP-11 using anti-KMP11 polyclonal antibody, showed that it recognized a polypeptide of 11 kDa in all *Leishmania* lines analyzed. Densitometry analysis showed that KMP-11 is 1.5-fold more expressed in the LcSbR line compared with its wild pair and 2.0-fold less expressed in the LbSbR line compared with its resistant pair. Transfection assays of KMP-11 gene in the LbWTS and LbSbR lines were carried out. *Western blot* analysis revealed expression increased of KMP-11 protein in transfected resistant parasites. Evaluation of SbIII susceptibility showed that transfection of KMP-11 in the wild LbWTS line did not alter the phenotype. On the other hand, overexpression of this protein in the resistant LbrSbR line reduced the SbIII-resistance phenotype. In vitro and in vivo assays using LbWTS lines and non-transfected clones overexpressors of KMP-11 showed no difference in infectivity of the parasite in THP-1 cells and in interferon- γ knockout mice. Only the clone 6 showed lower infectivity in mice. Additional studies are needed to further investigate a possible involvement of KMP-11 protein in SbIII-resistance phenotype and in infectivity of parasites.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As leishmanioses são classificadas como doenças tropicais negligenciadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde e constituem um problema de saúde pública em diversos países em desenvolvimento, a exemplo, o Leste da África, o subcontinente Indiano e a América Latina (WHO, 2013). O número de casos relatados é provavelmente subestimado, sendo reportado em somente 40 dos 88 países onde a doença é conhecida (Croft *et al.*, 2006). Cerca de 2 milhões de novos casos (1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 000 casos de leishmaniose visceral) ocorrem anualmente, com 12 milhões de pessoas infectadas. Entre as doenças tropicais, a leishmaniose ocupa a segunda posição na lista de doenças com maior mortalidade e a quarta em morbidade (WHO, 2013).

A incidência da leishmaniose é geograficamente heterogênea: no norte de África, Sul da Ásia e no Brasil há predominância de leishmaniose visceral (Figura 1B), enquanto na América Latina, Ásia Central e Sudoeste da Ásia predomina leishmaniose cutânea. A estimativa do impacto da doença é ainda um desafio, devido à diversidade clínica e epidemiológica, à distribuição geográfica e à falta de dados sobre reincidência. Os efeitos como desfiguração e estigma aumentam a complexidade da doença (Bern *et al.*, 2008).

O Brasil responde por 90% dos casos de leishmaniose visceral na América, sendo o terceiro foco mundial mais importante. Surtos urbanos surgiram após a migração da população de áreas rurais para a periferia das grandes cidade. O crescimento desordenado de favelas e a falta de saneamento básico contribuíram para a proliferação de vetores e a transmissão da doença (Ministério da Saúde - Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006). Em Minas Gerais, Belo Horizonte está entre os municípios de alta densidade populacional que mais sofre com a ocorrência da leishmaniose visceral. Durante o período de 1994 à 2009 foram confirmados 1215 casos, sendo que 64% estão concentrados nas regiões Nordeste, Norte, Venda Nova e Noroeste. As taxas de letalidade são altas, aumentou de 10,5% em 2008 para 19,3% em 2009. As ações de controle são voltadas para o

principal reservatório urbano, o cão, com realização de exames laboratoriais e eutanásia de cães soropositivos, além do uso de inseticidas de ação residual para combate dos insetos adultos (Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, 2013)

A epidemiologia da leishmaniose cutânea na América é complexa, com variações intra e inter-específica nos ciclos de transmissão, hospedeiros, vetores, manifestações clínicas e resposta à quimioterapia (Figura 1B) (Davies *et al.*, 1997). A doença era predominantemente ocupacional, relacionada a atividades em florestas e outras áreas zoonóticas, entretanto, se expandiu para áreas urbanas aumentando os fatores de risco para sua transmissão (Campbell-Lendrum *et al.*, 2001).

No Brasil, no período de 1991 a 2010, a leishmaniose cutânea apresentou média anual de 27374 casos registrados e coeficiente de detecção médio de 16,4 casos por 100.000 habitantes. A região Norte contribuiu com o maior número de casos, 36,4% do total de casos registrados, e apresenta coeficiente médio elevado (80 casos por 100.000 habitantes), seguido da região Centro-Oeste (36,5 casos por 100.000 habitantes) e do Nordeste (19,9 casos por 100.000 habitantes). A diversidade de agentes etiológicos, reservatórios, vetores e o conhecimento ainda insuficiente sobre vários aspectos epidemiológicos, evidenciam a complexidade do controle desta endemia (Ministério da Saúde - Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007).

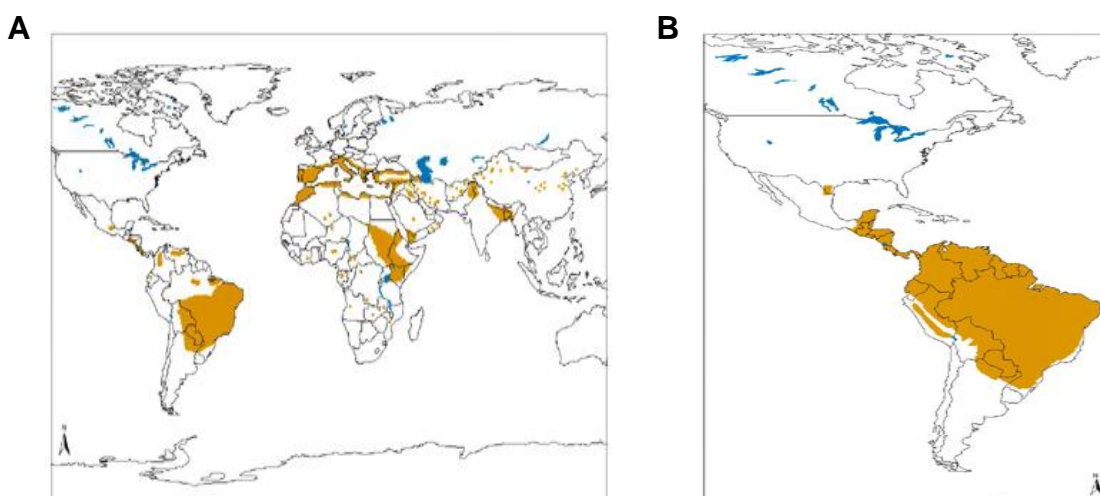


Figura 1: Distribuição geográfica das leishmanioses. (A) Leishmaniose visceral e (B) Leishmanioses cutânea e mucocutânea . Fonte WHO, 2010.

1.2 Agente etiológico

Leishmanioses são causadas por mais de 21 diferentes espécies de protozoários parasitos unicelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*. Elas são transmitidas para os hospedeiros mamíferos por diferentes espécies de flebotomíneos (gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomya* no Novo Mundo). A doença é caracterizada pela diversidade e complexidade (Pearson & Sousa, 1996; WHO, 2013).

O gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Tripanosomatidae é subdividido em dois subgêneros (*Viannia* e *Leishmania*), baseado no sítio de desenvolvimento da forma promastigota no intestino do vetor flebotomíneo. Por outro lado, as espécies são identificadas e classificadas conforme características biológicas, bioquímicas e moleculares (Grimaldi & McMahon-Pratt, 1996; Croan *et al.*, 1997). Classificação das espécies de *Leishmania* de acordo com a origem epidemiológica e manifestações clínicas está descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos.(Adaptado de WHO Technical Report Series, 2010)

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. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
	<i>chagasi</i>	<i>L. killicki</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
	<i>chagasi</i>	<i>chagasi</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. pifanoi</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. garnhami</i>	<i>L. lainsoni</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis</i>	
Principal tropismo	Visceral	Cutânea	Cutânea	Mucocutânea

O polimorfismo clínico da doença é decorrente de complexas interações entre diversos fatores como virulência de cada espécie de *Leishmania*, os vetores de transmissão e aspectos nutricionais e imunológicos do hospedeiro

vertebrado. O resultado é um amplo espectro de manifestações clínicas desde lesões cutâneas localizadas à difusão para o sistema retículo-endotelial (Pearson & Sousa, 1996). Exemplo, no Novo Mundo, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* são os agentes das leishmanioses cutânea e mucocutânea, enquanto *L. (L.) infantum chagasi* é o agente etiológico da leishmaniose visceral (Marzochi & Marzochi, 1994; Murray *et al.*, 2005).

Na leishmaniose cutânea o paciente apresenta úlceras na pele e, embora elas desapareçam espontaneamente em indivíduos imunocompetentes, podem provocar desfigurações. Na leishmaniose mucocutânea, os pacientes sofrem de ulcerações destrutivas na mucosa que progridem do nariz e da boca, para a faringe e laringe. As lesões não se curam espontaneamente e usualmente aparecem meses ou anos após o primeiro episódio de leishmaniose cutânea, quando os macrófagos da mucosa nasofaríngeas se encontram colonizados. A espécie *L. (V.) braziliensis* é responsável pela maioria dos casos diagnosticados da doença (Chappuis *et al.*, 2007).

A leishmaniose visceral é uma doença letal, caso não tratada. Ela é causada por *Leishmania* do complexo donovani - *L. (L.) donovani* (Leste da África e subcontinente indiano) e *L. (L.) infantum chagasi* (Europa, Norte da África e América Latina) e existem dois tipos de leishmaniose visceral que se diferem na forma de transmissão: leishmaniose visceral zoonótica encontrada em áreas de transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* e a antroponótica em áreas de transmissão de *L. (L.) donovani* (Lukes *et al.*, 2007). Após o período de incubação que varia de dois a seis meses, os pacientes apresentam sintomas de infecção sistêmica (febre, fadiga e perda de peso) e, também pode ser detectado carga parasitária no sangue e no sistema retículo-endotelial (geralmente no sistema fagocitário), como linfonodos, fígado e baço. Em estágios mais avançados da doença, os indivíduos apresentam esplenomegalia (Chappuis *et al.*, 2007).

1.3 Ciclo biológico do parasito

Parasitas do gênero *Leishmania* completam o seu ciclo de vida alternando entre formas: promastigotas de vida livre no intestino de fêmeas do vetor flebotomíneo e amastigotas, forma intracelular, no interior de

fagolisossomos de células do sistema fagocitário de uma variedade de hospedeiros vertebrados (Gupta, 2011).

O ciclo de transmissão da doença inicia quando fêmeas dos flebotomíneos ingerem macrófagos infectados com formas amastigotas do parasito durante o repasto sanguíneo. No intestino do flebótomo, formas amastigotas se transformam em promastigotas e, estas se multiplicam e diferenciam. O ciclo de vida está completo em aproximadamente uma semana após a infecção e, então promastigotas metacíclicos migram para a probóscide e são inoculados pelo vetor no hospedeiro mamífero no repasto sanguíneo. Fatores presentes na saliva dos flebotomíneos melhoram a infectividade dos promastigotas. No homem, formas promastigotas se ligam a receptores nos macrófagos, incluindo o receptor do complemento CR3, o receptor de manose/fucose e o receptor de glicosilação e, são então fagocitadas. No interior dessas células as formas promastigotas se transformam em amastigotas pela perda do flagelo e, se multiplicam e sobrevivem através de uma complexa interação parasito-hospedeiro. Os parasitos podem disseminar pelo sistema vascular e linfático e infectar outros monócitos e macrófagos do sistema retículo-endotelial (Figura 2) (Pearson & Sousa, 1996).

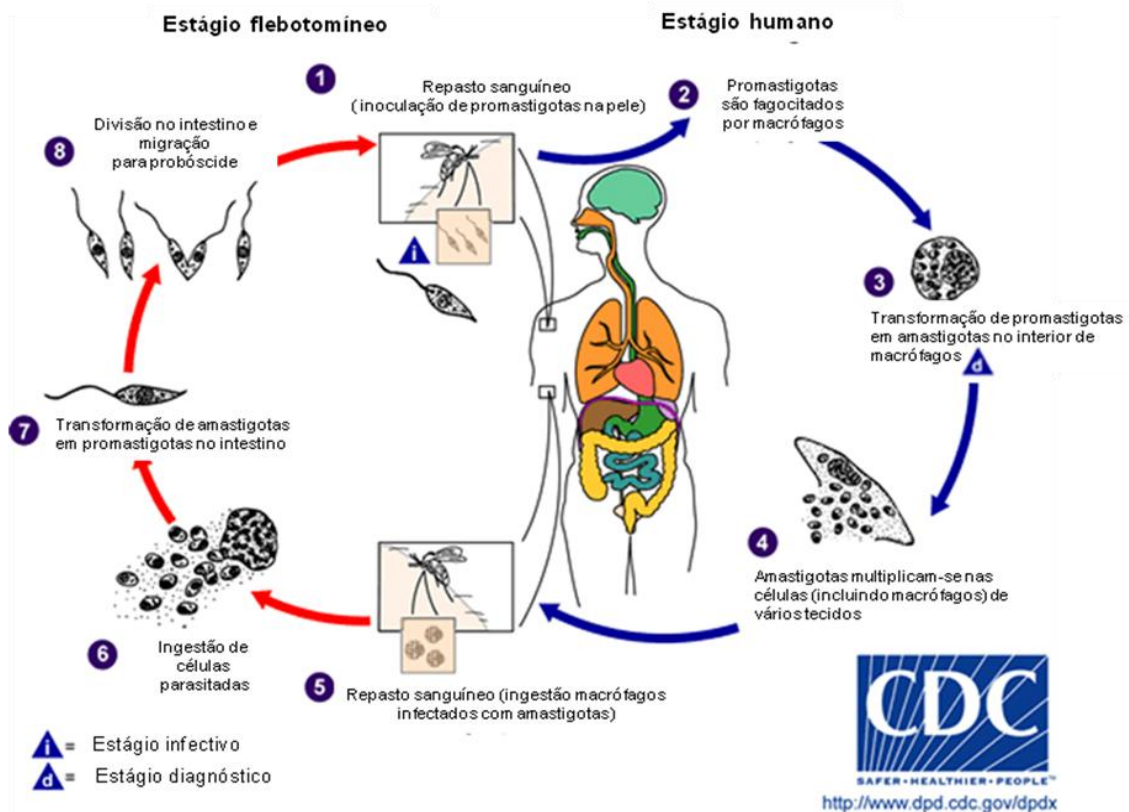


Figura 2: Ciclo de vida digenético do parasito *Leishmania*. (Adaptado WHO, 2010).

A resposta imune celular possui um importante papel no controle da doença. A ativação de linfócitos T CD4⁺ induz a produção de citocinas inflamatórias como interferon- γ e IL-2 e, conseqüente ativação de macrófagos que produzem óxido nítrico (NO), levando a destruição do parasito. Células T CD8⁺ secretando interferon- γ também contribuem para o controle da doença. A resposta celular do tipo 1 (TH1) modula a leishmaniose tegumentar e, quando exacerbada, leva a evolução da doença para forma cutânea e ao dano tecidual. A resposta do tipo 2 (TH2) induz a produção de IL-4 e essa citocina atua como supressora da resposta TH1 e da ativação de macrófagos por interferon- γ . A natureza crônica da leishmaniose cutânea é devida a predominância da resposta TH2 no sítio da infecção na pele. Outros fatores que aumentam os riscos para o desenvolvimento da doença são: estado de desnutrição do paciente, presença concomitante de doenças imunossupressivas, idade, diminuição da produção de interferon- γ , dentre outros (Chappuis *et al.*, 2007).

1.4 Organização genômica de *Leishmania* spp.

A organização genômica dos tripanosomatídeos é singular nos eucariotos. Os genes não possuem íntrons e são transcritos como longas unidades policistrônicas por promotores desconhecidos. mRNA monocistrônico é produzido por mecanismos acoplados de *trans-splicing* e poliadenilação do transcrito primário. O mecanismo de *trans-splicing* inclui um mini-éxon de 39 nucleotídeos no qual não é traduzido (Kazemi, 2011; Toledo *et al.*, 2010). Elementos regulatórios foram descritos em mRNAs sugerindo um mecanismo para a manutenção e degradação de mRNAs transcritos de agrupamentos policistrônicos. Logo, o controle da expressão gênica é principalmente pós-transcricional e regulada por eventos *downstream* que afeta a estabilidade do mRNA e o processo de tradução (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Além do DNA organizado no núcleo, os tripanosomatídeos possuem DNA extra-cromossomal localizado em uma organela denominada kinetoplasto. O kinetoplasto possui uma topologia particular, não é encontrado em células eucarióticas, e é composto por grandes moléculas circulares denominadas maxi-círculos. Essas moléculas circulares carregam genes que codificam enzimas e coenzimas envolvidas no Ciclo de Krebs (Chen *et al.*, 1995).

Estudos comparando os genomas de *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* mostraram que os genomas apresentam tamanho similar, em torno de 33 Mb, grande conservação entre os genes e sintonia nos cromossomos ortólogos. Entretanto, apresentam diferenças quanto ao cariótipo. Enquanto *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum chagasi* exibem 36 cromossomos, *L. (V.) braziliensis* apresenta 35 cromossomos. Essa diferença é devido à fusão dos cromossomos 20 e 34. O sequenciamento do genoma de *L. (V.) braziliensis* revelou que somente esta espécie exibe os genes que codificam para maquinaria da via RNA de interferência (Peacock *et al.*, 2007)

Considerando que a divergência entre as espécies de *Leishmania* ocorreu há 20-100 milhões e que as três espécies analisadas apresentam diferenças quanto ao fenótipo da doença, era esperado uma grande variação no conteúdo genômico entre as espécies. Entretanto, somente 2,5 % dos genes presentes em cada genoma são espécie-específicos, os quais se encontram distribuídos ao longo do genoma e não concentrados em regiões sub-teloméricas ou entre regiões de agrupamentos de genes, conforme observado em outras espécies de kinetoplastídeos. As análises mostraram que a especificidade de 80% dos genes de cada espécie pode ter sido gerada a partir da alteração de uma sequência codificante existente nas outras duas espécies: em cada espécie existe uma sequência degenerada na região correspondente de sintonia nas espécies em que falta o gene “funcional”. Esta observação contrasta com análises em outras espécies de parasitos kinetoplastídeos, nos quais os eventos mais encontrados para a geração de sequências específicas de genes são inserção ou substituição (Peacock *et al.*, 2007).

Os parasitos possuem um genoma “maleável” com capacidade de alterar o número de cópias de um gene individual, de grupos de genes, de cromossomos ou do genoma como um meio de se ajustar às condições adversas. Essa característica única é conhecida como plasticidade genética e ocorre por meio de rearranjos no cromossomo, variação na ploidia ou presença de moléculas circulares que modificam a expressão do gene envolvido no processo de “amplificação do número de cópias”. Sítios em sequências repetidas altamente conservadas parecem facilitar o rearranjo e a

amplificação de genes importantes durante mudanças adversas (Toledo *et al.*, 2010). Genes que estão envolvidos no fenótipo de resistência a drogas encontram-se aumentados de 2 a 20 vezes. Exemplo, as drogas metotrexato e arsenato induzem a amplificação de genes em *Leishmania spp.* O metotrexato induz a amplificação de regiões genômicas R-DNA e H-DNA. (Ouellette & Papadopoulou, 1993).

1.5 Quimioterapia

O sal orgânico de antimônio pentavalente (SbV) tem sido usado como droga de primeira linha no tratamento contra todas as formas de leishmanioses por mais de 60 anos (Herwaldt, 1999). Resistência a essa classe de droga tem sido descrito em diversas partes do mundo, e alcançou proporções epidêmicas em Bihar, Índia (Guerin *et al.*, 2002), onde mais de 60% dos pacientes com leishmaniose visceral são não-responsivos ao tratamento com antimonial SbV (Sundar, 2001). O aumento da tolerância do parasito ao SbV pode estar relacionado com a exposição inapropriada à droga, resultado da suspensão do tratamento e/ou uso de doses sub-terapêuticas (Sundar *et al.*, 1994). Outras drogas têm sido introduzidas como agentes quimioterápicos incluindo pentamidina, paramomicina, anfotericina B lipossomal e miltefosina. Entretanto, a baixa efetividade e o alto custo têm limitado o uso destas drogas (Croft *et al.*, 2006). Exemplo, pentamidina foi a primeira droga a ser utilizada em pacientes refratários ao SbV e apresentava taxa de cura inicial de 99%, no entanto, nas duas décadas seguintes sua eficácia reduziu para 70%. Atualmente, essa droga não é mais utilizada no tratamento de leishmaniose visceral devido à baixa eficiência e alta toxicidade. Entretanto, apresenta bons resultados no tratamento para leishmaniose cutânea e mucocutânea (Singh *et al.*, 2003). A resistência ao SbV e a busca de novos compostos para o tratamento das leishmanioses estão entre as prioridades da Organização Mundial da Saúde juntamente com o DNDi *Drugs for Neglected Diseases Initiative* ("Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas") (Brochu *et al.*, 2003; <http://www.dndi.org>).

1.6 Mecanismos de ação do antimonial

Embora o uso clínico do antimonial seja indicado há mais de 50 anos, o seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado. Acredita-se que, para ser ativo, SbV precisa ser reduzido para forma trivalente (SbIII) (Ouellette *et al.*, 2002). O local (amastigota ou macrófago) e o mecanismo de redução (enzimático ou não-enzimático) permanecem controversos. O modelo do principal mecanismo de ação do antimonial está elucidado na Figura 3.

Diversos estudos têm demonstrado que amastigotas axênicos são suscetíveis ao SbV. Por outro lado, esse composto não é eficaz contra promastigotas, sugerindo que a redução é estágio específico (Callahan *et al.*, 1997; Ephros *et al.*, 1999; Goyard *et al.*, 2003). Embora a redução estágio específico já foi demonstrado (Shaked-Mishan *et al.*, 2001), o mecanismo pelo qual amastigotas reduzem SbV ainda não está claro. Os macrófagos não reduzem eficientemente SbV a SbIII (Wyllie & Fairlamb, 2006), assim, os parasitos não são expostos a quantidades letais de SbIII dentro do macrófago e, a diminuição da atividade de redução do SbV no parasito pode levar à resistência (Ashutosh *et al.*, 2007).

Os compostos glutaciona e tripanotiona podem reduzir SbV a SbIII não-enzimaticamente, particularmente sob condições ácidas (Ferreira *et al.*, 2003; Frézard *et al.*, 2001; Ouellette *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 2003). No entanto, a relevância fisiológica dessas observações é questionada, visto que as taxas de redução são muito baixas. Além disso, promastigotas contêm concentrações intracelulares de tripanotiona e glutaciona maiores que aquelas encontradas em amastigotas (Ariyanayagam & Fairlamb, 2001; Wyllie *et al.*, 2004). Diante disto, é difícil apontar a ação seletiva de SbV contra o estágio amastigota pelo mecanismo não-enzimático. Como ambos os estágios podem absorver SbIII e SbV, a insensibilidade de promastigotas a SbV não pode ser atribuída a exclusão da droga (Brochu *et al.*, 2003).

Dois possíveis candidatos para a redução enzimática de SbV a SbIII em amastigotas foram identificados. A enzima redutase dependente de tiol (TDR1), específica deste parasito, catalisa a redução enzimática de antimoniais pentavalentes a trivalentes (Denton *et al.*, 2004). Embora essa enzima seja mais expressa em amastigotas, a relação direta entre a atividade enzimática e

a sensibilidade a antimoniais ainda não foi estabelecida (Ashutosh *et al.*, 2007). A segunda é uma enzima homóloga a arsenato redutase de levedura dependente de glutaredoxina, porém os níveis de expressão dessa proteína em promastigotas e amastigotas não foram estabelecidos (Zhou *et al.*, 2004).

Alguns estudos sugerem que SbV inibe a biossíntese de macromoléculas em amastigotas (Berman *et al.*, 1985), possivelmente alterando o metabolismo energético devido à inibição de glicólise e oxidação dos ácidos graxos (Berman *et al.*, 1987). Entretanto, os alvos específicos nessas vias ainda não foram identificados. Estudos têm mostrado que amastigotas tratadas com SbIII podem sofrer apoptose e, conseqüente fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (Serenio *et al.*, 2001; Sudhandiran & Shaha, 2003).

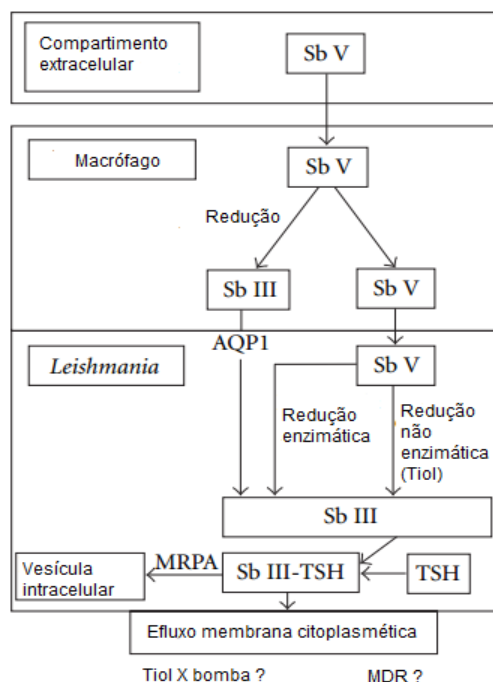


Figura 3: Metabolismo do antimônio e transporte para o macrófago e o parasito. O influxo de SbIII é mediado pela proteína aquaglicoporina (AQP1). Os mecanismos para o efluxo de SbIII incluem proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR) e SbIII associado à tióis. TSH: tripanotona; MRPA: proteína de resistência a múltiplas drogas A. (Adaptado de Jeddi *et al.*, 2011).

1.7 Mecanismos de resistência ao antimônio

Diferenças bioquímicas e moleculares entre as espécies de *Leishmania* são responsáveis por variações na sensibilidade dos parasitos aos tipos de drogas. Estudos realizados por Decuypere *et al.* (2012) com parasitos da

espécie *L. (L). donovani* isolados de duas linhagens genéticas distintas de *Leishmania*, com diferentes índices de susceptibilidade ao antimonial em uma região endêmica do Nepal, fornecem evidências de que as mudanças moleculares associadas à resistência ao antimonial dependem da genética de cada linhagem do parasito. Foi encontrado um conjunto de marcadores de resistência divergente nas linhagens de *Leishmania*. A heterogeneidade do parasito é um grave desafio para o controle da resistência no campo e para a identificação de alvos moleculares com aplicabilidade generalizada.

Alterações na concentração intracelular da droga ou da capacidade da mesma em afetar o alvo são comumente observadas em uma grande variedade de organismos. O nível da droga no sítio de ação pode ser reduzido por uma variedade de mecanismos, incluindo a diminuição da captação, o aumento da exportação e a inativação da droga pelo metabolismo do parasito ou sequestro. Da mesma forma, alterações nos níveis do alvo primário pode ocorrer devido à diminuição da afinidade do alvo com a droga ou a perda total do alvo, geralmente associadas a mecanismos de desvios do metabolismo (Croft *et al.*, 2006).

Complexos eventos a jusante que conduzem a degradação e morte celular são muitas vezes provocados por inibição de um alvo primário. Exemplo, muitos antiparasitários promovem ciclos de redução fúteis produzindo espécies reativas de oxigênio (ROs) que podem danificar membranas celulares, proteínas ou DNA (Docampo & Moreno, 1996). Assim, a superexpressão de enzimas do sistema de reparo do DNA também podem desempenhar um papel importante na resistência às drogas (Croft *et al.*, 2006).

O acúmulo de SbV e SbIII em promastigotas e amastigotas ocorre por diferentes sistemas de transportes (Bray *et al.*, 2003). Foi demonstrado que aquaglicoporinas auxiliam a absorção de SbIII em *Leishmania* spp. A superexpressão de aquaglicoporina-1 levou à hipersensibilidade a este composto e a deleção de um alelo do gene AQP-1 aumentou a resistência dos parasitos (Gourbal *et al.*, 2004).

O aumento nos níveis de tripanotona também tem sido observado em algumas linhagens de *Leishmania* resistentes ao SbIII (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). Esse fato está relacionado ao aumento nos níveis das enzimas envolvidas na síntese de glutathiona (γ -Glutamylcisteína sintetase) e poliaminas

(ornitina descarboxilase) (Haimeur *et al.*, 1999), dois precursores metabólicos de tripanotiona. O aumento da síntese de glutatona e tripanotiona pode ajudar a substituir tióis perdidos devido ao efluxo, bem como o restabelecimento do potencial redox de tiol alterado pelo acúmulo de dissulfetos (Wyllie *et al.*, 2004).

O efluxo da droga ou do seu derivado ativo é muito comum em bactérias, leveduras, fungos e protozoários patogênicos, exemplos *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*. Esse mecanismo de resistência também pode estar presente em *Leishmania* (Ashutosh *et al.*, 2007). Existem duas rotas de eliminação do complexo Sb-tiol que envolvem o sequestro no compartimento intracelular e o efluxo direto através da membrana plasmática. Estudos mostraram que a glicoproteína de membrana, PgpA, encontra-se amplificada em algumas linhagens de *Leishmania* resistentes (Callahan & Beverley, 1991; Ouellette & Borst, 1991). No entanto, este transportador não é responsável pelo efluxo da droga em toda a membrana plasmática, pois a superexpressão de PgpA diminui o influxo de Sb ao invés de aumentar o efluxo, possivelmente devido a um efeito dominante negativo por meio de interações com outras proteínas de membrana (Callahan *et al.*, 1994). A identificação da bomba de efluxo na membrana plasmática e o seu papel na resistência aos antimoniais permanecem a ser determinados.

O surgimento de amostras de *Leishmania* resistente aos antimoniais enfatizam a importância da identificação de mecanismos diretamente envolvidos na resistência, assim como as mudanças fisiológicas que podem ocorrer nestes parasitos. Tais mudanças fisiológicas, relacionados ou não aos mecanismos de resistência, contribuem para as características globais do fenótipo de resistência. Além disto, novas estratégias quimioterapêuticas podem ser desenvolvidas a partir destes estudos (Ponte-Sucre, 2003). É importante ressaltar ainda que a maioria destes estudos foram realizados em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo.

1.8 Ferro Superóxido Dismutase-A

Espécies de *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético. Na transformação de promastigota em amastigota, os parasitos sofrem inúmeras alterações bioquímicas, morfológicas e metabólicas e, diversos genes são diferencialmente expressos em ambas as fases (Pleues *et al.*, 2003).

Após fagocitose do parasito, os macrófagos sofrem uma intensa atividade respiratória com produção de subprodutos tóxicos, como ânion superóxido (O_2^-), oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) (Beaman & Beaman, 1984; Fridovich, 1978). Tais compostos compreendem os mecanismos dependentes de oxigênio que a célula fagocítica usa para eliminar patógenos invasores.

É bem conhecido que os parasitos possuem um armamento de proteínas antioxidantes responsáveis pela desintoxicação de ROs (Pearson *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1994) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), e estes antioxidantes são importantes para a sobrevivência do parasito (Bhattacharyya *et al.*, 2002; Green *et al.*, 1990; Roach *et al.*, 1991). A metaloenzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) metaboliza o ânion superóxido, produzindo H_2O_2 e O_2 (Mccord & Fridovich, 1969). SODs foram isoladas e caracterizadas de diversos organismos (Bannister *et al.*, 1987), e são classificadas de acordo com metal presente no seu sítio ativo: SOD de cobre-zinco (Cu: Zn- SOD), SOD manganês (MnSOD) e SOD de ferro (FeSOD) (Paramchuk *et al.*, 1997). Até o momento, a única classe de superóxido dismutase detectada em espécies de *Leishmania* é FeSOD.

Pearson *et al.* (1983) determinaram que em um sistema axênico, a forma amastigota do parasito *L. (L.) donovani* apresentou índice de resistência sete vezes maior em relação aos efeitos letais do peróxido de hidrogênio quando comparado com a promastigota. Quando formas promastigotas são fagocitadas, elas desencadeiam uma intensa atividade oxidativa, e a maioria dos parasitos morrem por mecanismos oxidativos microbicidas. Por outro lado, quando formas amastigotas são fagocitadas, elas sobrevivem com sucesso em monócitos humanos, embora também induzam atividade oxidativa.

Em um outro estudo, Bahrami *et al.* (2011) avaliaram a enzima superóxido dismutase (SOD) em diferentes estágios de *L. (L.) donovani* e observaram que SOD possui maior atividade em amastigotas axênicas. Aparentemente, o alto nível de atividade da SOD é importante para a sobrevivência do parasito no interior dos macrófagos. Um maior nível de atividade da SOD foi encontrado na fase promastigota estacionária em comparação com a exponencial. Em termos de virulência, a fase estacionária é mais infecciosa, assim, promastigotas sofrem mudanças no desenvolvimento à

medida que passam da fase exponencial para a estacionária. Essas mudanças são acompanhadas por um aumento na resistência à ROs e da virulência.

Paramchuk *et al.* (1997) mostraram a função de proteção desempenhada pela enzima SOD na presença de agentes oxidantes como paraquat e nitroprussiato de sódio. O percentual de parasitos viáveis de *L. (L.) infantum chagasi* superexpressando SOD permaneceu notavelmente alto na presença desses compostos.

Ghosh *et al.* (2003) demonstraram que formas promastigotas de *L. (L.) tropica* e *L. (L.) donovani*, transformadas com vetor de expressão contendo fragmento do gene SOD em orientação antisenso, apresentaram níveis reduzidos de mRNA e da enzima funcional. Parasitos deficientes em SOD são mais sensíveis à produção de ânion superóxido que o tipo selvagem, e também ao peróxido de hidrogênio em culturas axênicas. A deficiência dessa enzima resultou em sobrevivência significativamente reduzida de formas amastigotas de *L. (L.) donovani* em macrófagos de camundongos.

Em um estudo prévio realizado em nosso laboratório foi demonstrado que a enzima FeSOD-A do *T. cruzi* está superexpressa em uma população do parasito com resistência induzida *in vitro* ao benzonidazol (Nogueira *et al.*, 2006). Entretanto, em *Leishmania* spp. a caracterização desta enzima em linhagens selvagens e resistentes ao antimônio SbIII ainda não foi demonstrada na literatura.

FeSOD é um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas, pois não está presente nos seres humanos (Getachew & Gedamu, 2007).

1.9 Proteína de Membrana dos Kinetoplastídeos-11

A proteína de membrana dos kinetoplastídeos de 11 kDa (KMP-11) foi identificada por reatividade imunológica utilizando anticorpo monoclonal específico contra uma proteína historicamente denominada proteína associada a lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania* (Hill *et al.*, 1978). Devido sua ampla distribuição na membrana celular de kinetoplastídeos, incluindo *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas collosoma* e *Phytomonas* spp. e ausência em outros protozoários parasitos e células de mamíferos essa proteína foi denominada de proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 (Stebeck *et al.*, 1995).

KMP-11 foi primeiramente isolada de *L. (L.) donovani* e sua estrutura primária determinada por sequenciamento. Predições da estrutura secundária da KMP-11 mostraram que a proteína contém um elevado conteúdo helicoidal, sugerindo a presença de duas hélices anfipáticas separadas por um segmento aleatório curto. As possíveis hélices anfipáticas permitem a interação da proteína com lipídios, possibilitando a proteína KMP-11 perturbar a estabilidade das membranas. A função biológica da KMP-11 é ainda desconhecida, embora tenha sido relacionada à manutenção da bicamada lipídica na membrana do parasito (Jardim *et al.*, 1995).

Berberich *et al.* (1998) mostraram que em *L. (L.) infantum chagasi* o gene que codifica KMP-11 é estágio-específico e a proteína é fortemente regulada negativamente não somente na transição de promastigota na fase exponencial para fase estacionária, mas também durante a transformação em amastigota. Jardim *et al.* (1995) observaram níveis significativos de KMP-11 em preparações de lipofosfoglicanos de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) donovani*. Porém, os autores não compararam os níveis de expressão da proteína nos dois estágios. É interessante notar que KMP-11 é expressa na forma amastigota de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum chagasi* e ambas espécies pertencem ao complexo *L. (L.) donovani*. Os resultados encontrados por Matos *et al.* (2010) também mostram que a proteína KMP-11 é diferencialmente expressa em ambas as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo maior na superfície de amastigotas e, aumenta durante a metaciclogênese. O aumento da expressão de KMP-11 em promastigotas metacíclicos e, especialmente em amastigotas, indica um papel dessa proteína na interação parasito-hospedeiro mamífero (Matos *et al.*, 2010).

Estudos imunológicos mostram que KMP-11 atua como potente agente imunogênico de células B e células T durante infecções por espécies de *Leishmania*. Esses resultados sugerem que KMP-11 pode ser usada como marcador de diagnóstico e candidata à vacina contra doenças induzidas por kinetoplastídeos (Berberich *et al.*, 1997; Jardim *et al.*, 1995). A presença dessa molécula em amastigotas está de acordo com a capacidade imunoprotetora de protótipos de vacinas com base no gene codificador de KMP-11 e a resposta imune humoral e celular à KMP-11 em humanos e animais infectados por *Leishmania* (Matos *et al.*, 2010).

Fadili *et al.* (2009) através de um estudo proteômico comparativo utilizando linhagens de *L. (L.) infantum chagasi* sensível e com resistência induzida *in vitro* ao antimônio trivalente verificaram diversas proteínas novas que podem estar envolvidas no fenótipo de resistência aos antimônios, como argininosuccinato sintetase, alfa-tubulina, piruvato quinase e KMP-11. Os autores observaram que a expressão da proteína KMP-11 está regulada negativamente em mutantes resistentes ao SbIII, incluindo um mutante no qual a resistência foi induzida na fase amastigota. Estudos adicionais são necessários para investigar se existe uma correlação entre a expressão desta proteína e o fenótipo de resistência de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo ao SbIII.

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos descrevem os mecanismos relacionados à resistência aos antimoniais em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. No entanto, os mecanismos envolvidos na resistência à droga em espécies do Novo Mundo ainda não foram completamente descritos. Com o objetivo de estudar os mecanismos de resistência em espécies de *Leishmania* que acometem o Brasil, Liarte & Murta (2010) selecionaram *in vitro* linhagens de espécies de *Leishmania* resistentes ao antimonial trivalente: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) guyanensis*. Estes parasitos apresentaram resistência de 4 a 20 vezes maior ao SbIII comparado aos seus respectivos pares sensíveis. Em nosso estudo caracterizamos a enzima ferro superóxido dismutase-A e a proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 em linhagens de *Leishmania* spp. do Novo Mundo sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente. Ambas proteínas apresentam grande relevância no metabolismo do parasito, visto que a enzima ferro superóxido dismutase-A está envolvida na defesa antioxidante do parasito no interior de macrófagos e a proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11, presente na superfície da membrana, pode estar relacionada ao fenótipo de resistência do parasito ao antimonial. Compreender os mecanismos responsáveis pela resistência do parasito pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o sucesso do tratamento contra as leishmanioses.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Fazer caracterização molecular e funcional dos genes que codificam a enzima ferro superóxido dismutase-A e a proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 em linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente.

3.2 Objetivos Específicos

Nas linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao antimônio trivalente:

- FeSOD-A:
 1. Analisar a organização genômica;
 2. Quantificar o nível de mRNA;
 3. Avaliar o nível de expressão da proteína;
 4. Transfectar o gene *fesod-a* nas linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* sensíveis e resistentes ao SbIII;
 5. Analisar a susceptibilidade dos parasitos não-transfectados e transfectados com o gene *fesod-a* ao SbIII;
 6. Avaliar a tolerância dos parasitos superexpressando a enzima FeSOD-A ao paraquat;
 7. Avaliar a atividade enzimática da enzima FeSOD-A.

- KMP-11:
 1. Analisar a organização genômica;
 2. Quantificar o nível de mRNA;
 3. Clonar, expressar e caracterizar a proteína recombinante KMP-11;
 4. Produzir o anticorpo policlonal anti-KMP-11 em coelhos;
 5. Avaliar o nível de expressão da proteína;
 6. Transfectar o gene *kmp-11* nas linhagens de *L. (V.) braziliensis* sensível e resistente ao SbIII;
 7. Verificar a susceptibilidade dos parasitos não-transfectados e transfectados com o gene *kmp-11* ao SbIII;

8. Analisar a infectividade *in vitro* das linhagens de *L. (V.) braziliensis* sensíveis ao SbIII e clones superexpressando o gene *kmp-11* em células THP-1;

9. Avaliar o curso da infecção de linhagens de *L. (V.) braziliensis* sensíveis ao SbIII e clones superexpressando o gene *kmp-11* em modelo *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ .

4. MATERIAL E MÉTODOS

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

Neste estudo foram utilizadas quatro espécies de *Leishmania* selvagens e resistentes ao antimonial trivalente: *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/2904), *L. (V.) guyanensis* (IUMB/BR/85/M9945), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) (Tabela 2). As linhagens resistentes foram previamente obtidas por Liarte & Murta (2010) por seleção *in vitro* usando concentrações crescentes de SbIII. Os parasitos apresentaram índices de resistência de 4 a 20 vezes maior comparado aos seus respectivos pares sensíveis. Sucintamente, os parasitos foram inicialmente expostos a 0,1 µM de SbIII, valor corresponde ao IC₅₀ (concentração de droga que inibe 50% do crescimento dos parasitos) de *L. (V.) guyanensis*, espécie mais sensível ao SbIII. Um aumento gradual na concentração de droga foi realizado apenas quando as culturas expostas ao SbIII apresentavam taxas de crescimento semelhantes aquelas das culturas selvagens. As linhagens selvagens de *Leishmania* foram mantidas em meio M199 (Gibco) na ausência de droga. A susceptibilidade *in vitro* ao SbIII para as quatro linhagens resistentes foi determinada pelo valor de IC₅₀. As linhagens resistentes de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* foram cultivadas em meio M199 adicionado com 1 mg/mL de SbIII e a linhagem resistente de *L. (V.) braziliensis* com 2 mg/mL.

Formas promastigotas de linhagens de *Leishmania* spp. foram cultivadas a 27°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) 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 III Diluent (Beckman Coulter™) e contados utilizando o contador de células Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). A manutenção da cultura era feita através de dois repiques semanais nas proporções 1:10 para os parasitos resistentes e 1:20 para os selvagens. Os parasitos resistentes eram mantidos na presença da droga SbIII na concentração do IC₅₀.

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

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

Os genes *fesod-a* e *kmp-11* foram caracterizados quanto à organização genômica, ao nível de mRNA e à expressão de proteína nas linhagens de *Leishmania* selvagens e resistentes ao SbIII conforme demonstrado no fluxograma (Figura 4).

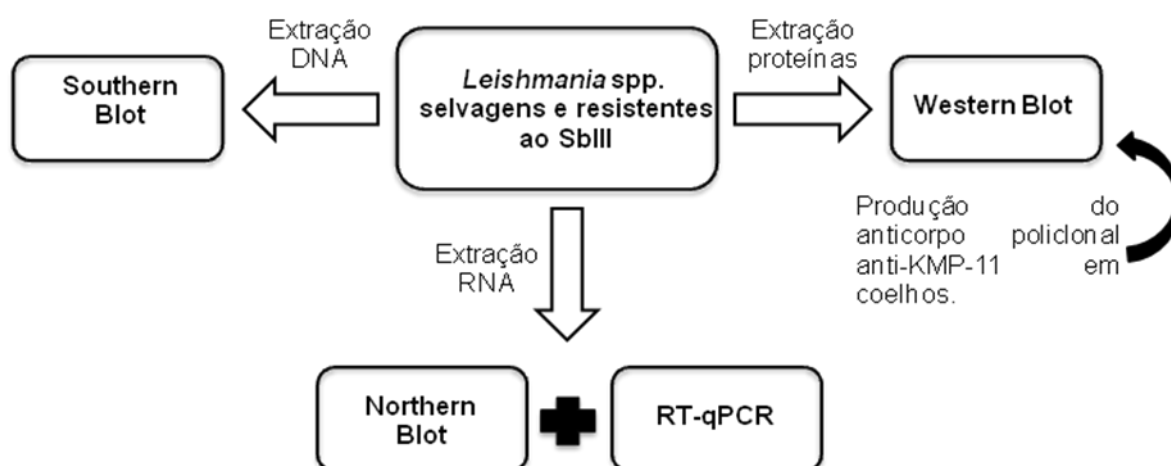


Figura 4: Fluxograma dos experimentos realizados para a caracterização dos genes *fesod-a* e *kmp-11* nas linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII.

4.2 Extração de DNA Genômico

O DNA das formas promastigotas de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII foi extraído pelo método fenol:clorofórmio, conforme descrito por Sambrook, J. & Russel, W. D. (2001). As culturas de parasitos em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 728 x g por 10 min a 4 °C. Os sedimentos (aproximadamente 10⁸ parasitos) foram ressuspensos em 700 µL tampão de extração (50 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA, 100 mM NaCl e 0,5% SDS, pH 8,0) e incubados com Proteinase K (20 mg/mL) por 16 horas a 37 °C. Após a adição de mesmo volume de fenol neutralizado (pH 8,0), as amostras foram agitadas

suavemente por 10 min e centrifugadas a 19000 x g, a temperatura ambiente, por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo já acrescido com mesma proporção de fenol neutralizado (pH 8,0) e clorofórmio /álcool isoamílico 1:24, mantida em agitação suave por 10 min e centrifugada nas condições acima descritas. A fase aquosa foi transferida novamente para um novo tubo já acrescido de clorofórmio /álcool isoamílico 1:24, mantida em agitação suave por 10 min e novamente centrifugada. O DNA foi precipitado pela adição de 3 volumes de etanol e 1:10 do volume de acetado de sódio 3 M (v/v). As amostras foram mantidas a -70 °C por 1 hora e, então centrifugadas a 19000 x g, por 20 min, a 4 °C. O DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% e ressuscendido em água estéril. Posteriormente, o DNA foi tratado com RNase (20 µg/mL) em tampão (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM) a 37 °C por 2 h. A concentração do DNA foi determinada utilizando Nanodrop Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®).

4.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total das amostras de *Leishmania* spp. foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen™) de acordo com o protocolo do fabricante. As culturas de parasitos em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 728 x g por 10 min a 4 °C e os sedimentos (aproximadamente 10⁸ parasitos) ressuscendidos em 1 mL de TRIZOL (Invitrogen™). Após a adição de 200 µL de clorofórmio, as suspensões foram homogeneizadas e incubadas por 15 min no gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 17900 x g a 4 °C por 15 min e a fase aquosa cuidadosamente transferida para novo tubo contendo igual volume de isopropanol 95%, incubada a -20 °C por 15 min e centrifugada nas condições acima descritas. O sobrenadante foi descartado e, o sedimento lavado com etanol 95% e centrifugado. O RNA foi ressuscendido em água DEPC. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®).

Para obter preparações de RNA mais puras, os RNAs obtidos pelo método do TRIZOL (Invitrogen™) foram purificados utilizando *RNeasy Mini kit* (QIAGEN). Posteriormente, com a finalidade de eliminar a contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase (*Ambion® TURBO DNA-free™ kit*) conforme protocolo descrito pelo fabricante.

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), conforme protocolo descrito abaixo. Em um

microtubo 0,2 mL foram adicionados 2 µg de RNA total, 1 µL oligo d(T) (500 µg/mL), 1 µL de 10 µM dNTP e o volume completado para 12 µL com água deionizada estéril. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 min e colocadas imediatamente no gelo por 1 min. Posteriormente, em cada amostra foi adicionado 4 µL de tampão RT 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µL 0,1 M DTT e 1 µL *RNaseOut* (40 U/µL) e, então incubadas a 42 °C por 2 min. Em seguida, foi adicionado 1 µL *SuperScript II RT* (200 U/µL) e as amostras incubadas a 42 °C por 50 min. Após a síntese da primeira fita de cDNA, a reação foi inativada a 70 °C por 15 min e, armazenada a -70 °C para posterior utilização. O cDNA foi diluído 10X em água deionizada estéril para ser utilizado nos ensaios de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

4.4 Extração de proteínas totais

Formas promastigotas de linhagens *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII em fase exponencial de crescimento (aproximadamente 10⁸ parasitos) foram centrifugadas a 728 x g por 10 min a 4 °C. Os sedimentos foram lavados três vezes com PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) e ressuspensos em 500 µL de tampão de lise [50 mM NaCl; 20mM Tris-HCl pH 8,0; 1% detergente NONIDET P-40 (SIGMA)] adicionado de coquetel de inibidores de proteases completo (Roche). As amostras foram incubadas por 10 min no gelo, e posteriormente lisadas através de 3 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido (-196 °C) e banho-maria a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 350 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante correspondente a proteínas totais foi armazenado a -70 °C para posterior utilização. A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), em triplicata. A curva padrão foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão nas quantidades 0,6; 1,2; 2,4; 3,6 e 4,8 µg, em microplaca de 96 poços. Para o ensaio foram adicionados em cada poço, 20 µL da proteína diluída em PBS (1:80) e 180 µL do Reagente de Bradford (100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%). A placa foi mantida a temperatura ambiente por 10 min. A leitura foi realizada em Leitor de Elisa (Spectra Max 190 Molecular Devices) em absorbância 595 nm. O resultado foi analisado utilizando o programa SoftMax.

4.5 Condições utilizadas para amplificação pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As regiões codificadoras e os fragmentos do genes *fesod-a* e *kmp-11*, bem como o fragmento do gene constitutivo subunidade 18S do *RNA ribossomal* (SSU rRNA) foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores foram desenhados a partir das sequências nucleotídicas dos genes *fesod-a*, *kmp-11* e SSU rRNA depositadas no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) (XM_001568275.1, XM_001562044.1, 12982829 respectivamente) (Tabela 3).

Para a amplificação das regiões codificantes dos genes *fesod-a* e *kmp-11* foi utilizado *PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen™), conforme protocolo descrito pelo fabricante. A região codificadora do gene *fesod-a* foi amplificada utilizando como molde DNA genômico de *L. (V.) guyanensis* selvagem. Para amplificação da região codificadora do gene *kmp-11* e dos fragmentos dos genes *kmp-11*, *fesod-a* e SSU rRNA, foi utilizado como molde da reação o DNA de *L. (V.) braziliensis* selvagem. Os fragmentos dos genes *kmp-11*, *fesod-a* e SSU rRNA e o gene *bsd*, que confere resistência a blasticidina, foram submetidos à reação de PCR utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (Phoentria). Em cada reação foram adicionados 2 µL Tampão IVB 5X, 1 µL 10 mM dNTPs, 1 µL de cada iniciador Senso ou Antisenso (10 pmoles), 0,15 µL enzima Taq DNA polimerase, 1 µL de DNA molde (10 ng/ µL) e o volume foi ajustado para 10 µL com água deionizada estéril.

As reações de PCR foram submetidas a amplificação em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 95 °C por 30 seg, pareamento (55 °C ou 60 °C dependendo dos iniciadores (Tabela 3) por 30 seg) e extensão a 72 °C por 1 min) e extensão final a 72 °C por 5 min. As condições estabelecidas para as amplificações estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores usados na clonagem, RT-PCR, expressão da proteína recombinante KMP-11 e na seleção dos clones transfectados com o marcador molecular que confere resistência a blasticidina.

Gene	Iniciadores	Sequências (5' → 3')	Tamanho Fragmento	Temp. Pareamento
<i>kmp-11</i> (RT-PCR)*	Senso	AGCAGAACGCCAAGTTCTTTG	98pb	55 °C
	Antiseno	CTCCTTGATCATGCGCATCG		
<i>fesod-a</i> (RT-PCR)*	Senso	ACAAGGCGTACGTGGATAA	139pb	60 °C
	Antiseno	GTGTGGTTGAAGTGCTGAGAG		
SSU rRNA (RT-PCR)*	Senso	TCTAGGCTACCGTTTCGGCTT	93pb	60 °C
	Antiseno	CACACACCGAACCGAAGTTG		
<i>fesod-a-BglII</i> (clonagem**/ sonda)	Senso	<u>TAGATCT</u> CCACCATGCTCCGCCGTGTCTCCAT	693pb	55 °C
	Antiseno	TT <u>AGATCT</u> TTTACTTGATAGCCCTACTGT		
<i>kmp-11-BglII</i> (clonagem**/ sonda)	Senso	<u>TAGATCT</u> CCACCATGGCCACCACGTACGAGGA	279pb	55 °C
	Antiseno	TT <u>AGATCT</u> TTTACTTGCCCGGGTACTGCG		
<i>kmp-11-pQE</i> (expressão proteína)***	Senso-KpnI	CGCGGT <u>ACCGAT</u> GGCCACCACGTACGAGGA	279pb	55 °C
	Antiseno-HindIII	CGCA <u>AGCTT</u> TTTACTTGCCCGGGTACTGCG		
<i>bsd</i> (transfecção)****	Senso	ATGGCCAAGCCTTTGTCTCA	399pb	60 °C
	Antiseno	TTAGCCCTCCACACATAACCAGAG		

As regiões sublinhadas correspondem ao sítio de restrição de cada enzima.

*qPCR (RT-PCR quantitativo em tempo real); **clonagem dos genes *fesod-a* e *kmp-11* em vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy (Promega); ***clonagem do gene *kmp-11* em vetor de expressão pQE-30 (Quiagen) para produção da proteína recombinante; ****Seleção dos clones transfectados com o gene *bsd* que confere resistência à blasticidina (droga utilizada na seleção dos parasitos transfectados).

4.6 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

A amplificação dos fragmentos dos genes *kmp-11*, *fesod-a* e SSU rRNA utilizando os iniciadores descritos na Tabela 3 foi analisada por eletroforese em gel

de poliacrilamida 10%. Após a PCR, 5 µL do produto da reação juntamente com 5 µL do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 30% de glicerol) foram submetidos à eletroforese. Para a confecção do gel foi utilizado 10 mL de solução de bis/bis-acrilamida 10% (3,32 mL bis/bis-acrilamida 30%, 2 mL TBE 5X (0,45 M Tris-Borato; 0,01 M EDTA, pH 8,3), 4,68 mL água MILLIQ), 125 µL persulfato de amônio 10% (v/v) e 12,5 µL TEMED (N,N,N',N' –tetrametil-etilenodiamina) 0,05% (v/v). A eletroforese foi realizada a 100V em tampão de corrida TBE 1X (89 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA, pH 8,0). O gel foi fixado em 150 mL de solução de etanol 10% (v/v) e 0,5% de ácido acético (v/v) por 30 min e, impregnados por nitrato de prata 0,2% (p/v). Posteriormente, o gel foi lavado com água deionizada e revelado em solução aquosa de NaOH 7,5 M com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas (Sanguinetti *et al.*, 1994). Para estimar o tamanho dos fragmentos foi utilizado o marcador *DNA Ladder 100pb* (Invitrogen™).

4.7 Eletroforese de DNA em gel de agarose

As regiões codificantes dos genes *fesod-a* e *kmp-11* amplificadas por PCR utilizando os iniciadores descritos na Tabela 3 foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Agarose foi fundida em tampão de corrida TBE 1X por aquecimento em forno de microondas e a solução resfriada foi colocada ao suporte de eletroforese *BRL Horizontal Gel Electrophoresis Horizon 11.14* (Gibco-Life Technologies) para gelificação. A eletroforese foi realizada a 100V em tampão de corrida TBE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e a imagem digitalizada em equipamento ImageQuant Las 4000 (GE). Para estimar o tamanho dos fragmentos foi utilizado o marcador *DNA Ladder 100pb* (Invitrogen™).

4.8 Preparo das sondas e Ensaios de Hibridização

As sondas utilizadas nos ensaios de *Southern* e *Northern blot* foram amplificadas das regiões codificantes dos genes *fesod-a* e *kmp-11* utilizando os iniciadores descritos na Tabela 3. Como molde para reação de PCR, foi utilizado o DNA de *L. (V.) braziliensis* selvagem. Após a amplificação, 10 µL do produto de PCR foram adicionados em 23 µL de água deionizada estéril. A mistura foi fervida por 5 min e colocada imediatamente no gelo. Para marcação com [³²P] foi utilizado o kit *Nick Translation* (Invitrogen™). Foram adicionados à mistura, 2 µL [³²P] dCTP, 5 µL da enzima Polimerase I e 2 µL dNTPs com exceção do dCTP e a reação

incubada a 16 °C por 1 h. A sonda foi purificada com o kit *MicroSpin™ G50 Columns* (Amershan). Primeiramente, a resina foi homogeneizada e centrifugada a 2000 x g por 1 min. A sonda foi aplicada no centro da coluna contendo a resina empacotada e centrifugada nas mesmas condições descritas. A sonda purificada foi coletada em um novo tubo e a coluna descartada. As membranas foram pré-hibridizadas em 15 mL de solução de pré-hibridização (1% BSA; 250 mM NaH₂PO₄; 1 mM EDTA e 7% SDS) (Church & Gilbert, 1984) por 2h a 60 °C. Posteriormente, a sonda foi adicionada à solução de pré-hibridização e as membranas incubadas por 16 h a 60 °C para *Southern blot* e a 56 °C para *Northern blot*. Após a hibridização, as membranas foram lavadas três vezes com SSC 2X (150 mM NaCl; 15 mM citrato de sódio) e 0,1% SDS em diferentes temperaturas: *Southern blot* 56 °C, 42 °C e 27 °C por 20 min, cada lavagem e *Northern blot* 50 °C por 10 min, 42 °C e 27 °C por 20 min, cada lavagem. Após as lavagens, as membranas foram expostas aos filmes de raio X (Kodak) e mantidas a -70 °C por 7 a 10 dias. Posteriormente, os filmes foram revelados e fixados.

4.9 Southern blot

As enzimas de restrição foram selecionadas através de análises de digestão *in silico* utilizando como molde as sequências de nucleotídeos das regiões codificantes dos genes *fesod-a* e *kmp-11* de *L. (V.) braziliensis* depositadas nos bancos de dados do NCBI. A região codificadora do gene *fesod-a* não possui sítio interno para a enzima *Bam*HI (Promega) e apenas um sítio de clivagem para a enzima *Hin*FI (Promega) e a região codificadora do gene *kmp-11* não possui sítio interno para a enzima *Eco*RI (Promega) e possui apenas um sítio de clivagem para a enzima *Sal*I (Promega). Para análise da organização gênica, 10 µg de DNA genômico de linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII foram digeridos utilizando as endonucleases de restrição selecionadas. As condições utilizadas nas reações de digestão estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Digestão do DNA genômico de *Leishmania* spp. com enzimas de restrição para *Southern blot*.

<i>Southern blot</i>	Enzimas de restrição				Tampão de reação (10X) (µL)				BSA (10mg/mL) (µL)	H ₂ O + DNA (µL)
	<i>Bam</i> HI (10 U/µL)	<i>Hin</i> FI (10 U/µL)	<i>Eco</i> RI (10 U/µL)	<i>Sal</i> I (10 U/µL)	E	B	H	D		
<i>kmp-11</i>	-	-	-	1 µL	-	-	-	2,5	2	19,5
<i>kmp-11</i>	-	-	1 µL	-	-	-	2,5	-	2	19,5
<i>fesod-a</i>	-	1 µL	-	-	-	2,5	-	-	2	19,5
<i>fesod-a</i>	1 µL	-	-	-	2,5	-	-	-	2	19,5

As reações de digestão foram incubadas a 37 °C por 16 h. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 V por 3 h. Para estimar o tamanho dos fragmentos foi utilizado o marcador *DNA Ladder 1kb Plus* (Invitrogen™). Os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL) e digitalizados em equipamento ImageQuant LAS 4000. Posteriormente, os géis foram tratados com solução desnaturante (2 lavagens com 250 mL da 0,25 M HCl por 15 min), solução de neutralização (2 lavagens com 250 mL 0,5 M NaOH e 150 mL de 1,5 M NaCl por 15 min) e solução de equilíbrio (2 lavagens com 250 mL de Tris-0,5 M HCl pH 7,4 e 150 mL 1,5 M NaCl por 20 min). Os fragmentos foram transferidos por capilaridade para membranas de náilon (Hybond-Amersham Biosciences) em tampão SSC 10X (1,5 M NaCl; 150 mM citrato de sódio), por 24-30 h. Após a transferência, o DNA foi fixado na membrana com luz ultra-violeta em equipamento UV Stratalinker® 1800. As membranas foram hibridizadas com as sondas dos genes marcadas com [³²P] conforme descrito no item 4.8. Os ensaios de *Southern blot* foram realizados em duplicata.

4.10 Northern blot

Para análise do tamanho dos transcritos, 10 µg de RNA das linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão MOPS 1X (0,02 M MOPS pH 7,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 8 mM acetato de sódio e 7,7% de formaldeído). Para o preparo das amostra 15 µL de RNA foram adicionados em 15 µL de uma solução contendo 2 µL MOPS 5X (0,1 M MOPS pH 7,0; 40 mM acetato de sódio; 5 mM EDTA pH 8,0), 3 µL de formaldeído e 10 µL de formamida deionizada. As amostras foram aquecidas a 56 °C por 15 min e colocadas imediatamente no gelo. Posteriormente, foram

adicionados aos tubos 3 µL do tampão de amostra de RNA 10X (50% glicerol; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % de azul de bromofenol e 0,25 % de xilenocianol) e as mesmas submetidas à eletroforese a 50 V por 4-5 h. Para estimar tamanho dos fragmentos foi utilizado o marcador de RNA 0,5-10kb *RNA Ladder* (Invitrogen™). Os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL) e as imagens digitalizadas em equipamento ImageQuant LAS 4000. Os géis foram transferidos para a membrana de náilon (Hybond-Amersham Biosciences) em tampão SSC 10X por 24-30 h. As membranas foram hibridizadas com as sondas dos genes marcadas com [³²P] conforme descrito no item acima. Os ensaios de *Northern blot* foram realizados em duplicata.

4.11 Análise da expressão gênica usando RT-qPCR

Os níveis dos genes *kmp-11* e *fesod-a* foram também avaliados por PCR quantitativo em tempo real. As reações de amplificação utilizando os iniciadores descritos na Tabela 3 foram realizadas utilizando o Sistema de Detecção da Sequência Gene-Amp 7000 (PE Applied Biosystems), vinculado à plataforma de PCR em tempo real do CPqRR/Fiocruz.

As reações foram preparadas utilizando 1 µL de cada iniciador (10 pmoles), (Applied Biosystems®), 5 µL de cDNA diluído 10X e água deionizada para volume final de 20 µL. O corante SYBR GREEN intercala na fita dupla de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Os componentes da reação foram homogeneizados e o volume de 20 µL adicionado em cada poço da placa *MicroAmp*® (Applied Biosystems), posteriormente vedada com selante *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems). O programa de amplificação consistiu de uma etapa a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg e pareamento/extensão a 60°C por 1 min. No final foi realizado o ciclo de dissociação para verificar a especificidade da amplificação.

Para construção das curvas padrão foram utilizados quantidades conhecidas do fragmento do gene constitutivo SSU rRNA clonado em plasmídeo pGEM® T-Easy (10⁷ a 10² moléculas), fragmento do gene *kmp-11* (10⁷ a 10² moléculas) e a região codificante do gene *fesod-a* (10⁷ a 10⁰ moléculas) . O gene SSU rRNA foi utilizado como normalizador para os cálculos da quantificação absoluta. Os resultados foram analisados no programa “*Sequence Detection System*” (Applied Biosystems®), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a

cada ciclo e quantificar o nível de expressão do gene estudado. Cada experimento foi realizado três vezes em triplicata.

4.12 Preparo de Células Cálcio competentes

Foram preparados pré-inóculos de colônia isolada das bactérias *E. coli* cepas TOP 10F' e M15 [pREP4] em 5 mL de meio LB líquido (10 mg NaCl; 5 mg extrato de levedura; 10 mg peptona; água deionizada qsp. 1 L, pH 7,0). A cepa M15 [pREP4] deve ser mantida em meio LB adicionado de antibiótico kanamicina (25 ug/mL) para pressão seletiva do plasmídeo repressor [pREP4]. Os pré-inóculos foram incubados a 37 °C por 16 h, sob agitação constante a 200 rpm. O volume de 1 mL dos pré-inóculos foi transferido para 100 mL de meio líquido LB, e mantido sob agitação a 37 °C. A densidade óptica da cultura foi monitorada a 600 nm até atingir valores de absorvância entre 0,4 e 0,6, e então resfriada no gelo por 15 min e transferida para tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 4170 x g por 7 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos de cada tubo foram ressuspensos em 25 mL de solução de cloreto de cálcio (100 mM CaCl₂; 10 mM HEPES, pH 7,0), gelado e estéril e, mantidos no gelo por 20 min. A suspensão foi então submetida novamente a centrifugação e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de solução de cloreto de cálcio-glicerina (100 mM CaCl₂; 10 mM HEPES; 10% glicerol, pH 7,0), gelado e estéril. As células foram aliqüotadas e armazenadas a -70°C.

4.13 Clonagem em vetor pGEM[®]-T Easy

Os fragmentos gênicos, *kmp-11* e SSU rRNA, e as regiões codificadoras dos genes *fesod-a* e *kmp-11* amplificados por PCR (item 4.5), foram purificados utilizando o *Kit PCR Purification* (Quiagen) segundo orientações do fabricante. As regiões codificadoras amplificadas utilizando o kit *PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen[™]) foram primeiramente submetidas à reação TA-tailing. Para 10 µl de reação, foram usados 1 µL do Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1 µL MgCl₂ 15mM, 1 µL 2 mM dATP, 6 µL de produto de PCR e 1 µL Taq Polymerase (5 U/µl) (Invitrogen[®]). A reação foi incubada a 70°C por 30 min. Em seguida, as amostras foram clonadas em vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy (Promega) (Figura 5), segundo orientações do fabricante. Células cálcio competentes *E. coli* cepa Top 10 F' foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por choque térmico e selecionadas em meio de cultura LB sólido

contendo ampicilina (100 µg/µL), 40 µL X-Gal (50 mg/mL) e 4 µL IPTG (1 M). As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia e sequenciamento.

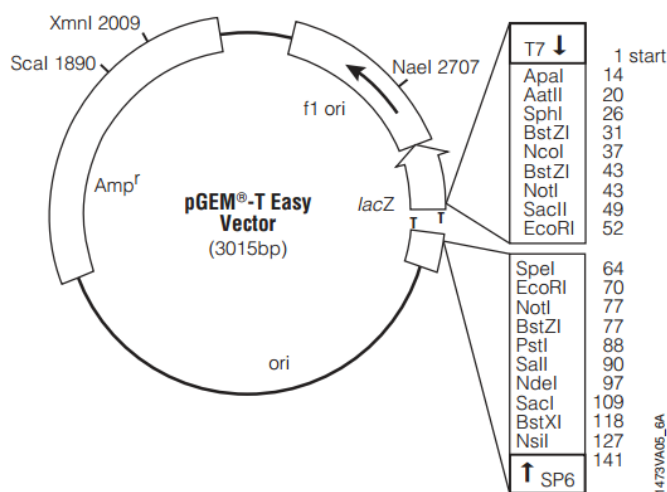


Figura 5: Mapa do vetor pGEM-T Easy.

As colônias positivas foram crescidas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/µL) a 37°C por 16 horas e submetidas à extração de DNA plasmidial utilizando o *Kit Miniprep QIAquick® Spin* (Quiagen), conforme protocolo do fabricante. A concentração das amostras foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®).

As construções contendo os fragmentos dos genes *kmp-11* e SSU rRNA foram empregadas em experimentos de RT-qPCR.

Análise funcional dos genes *fesod-a* e *kmp-11* foi realizada conforme descrito na Figura 6.

4.14 Sequenciamento

Os plasmídeos recombinantes contendo a região codificadora dos genes *kmp-11* e *fesod-a* foram sequenciados por eletroforese capilar em aparelho ABI3130 utilizando polímero POP7 e BigDye v3.1, pela empresa Valid Biotechnology. Os dados foram analisados usando os programas *BioEdit* e *Sequence Scanner*.

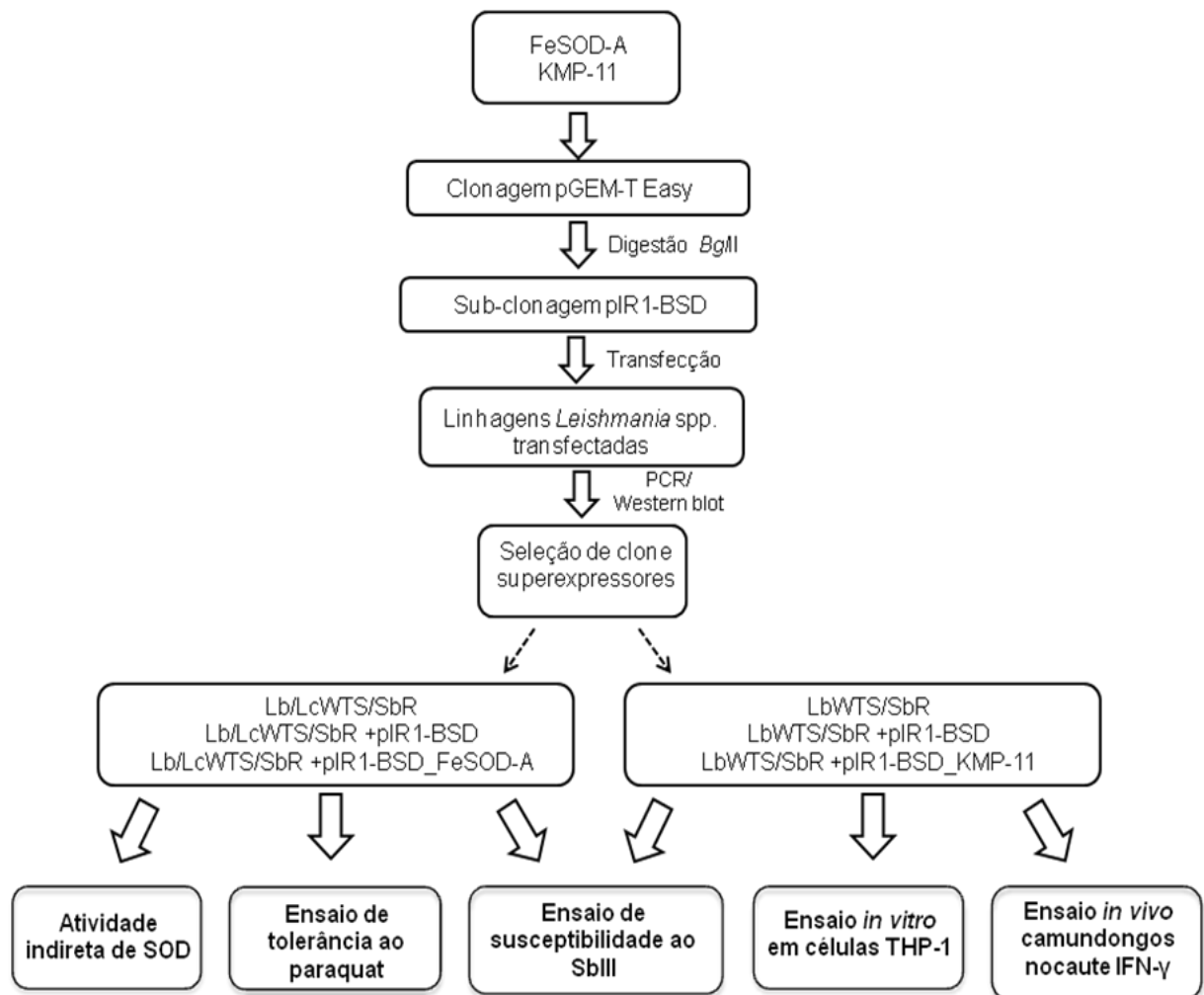


Figura 6: Fluxograma dos experimentos realizados para análise funcional dos genes *fesod-a* e *kmp-11*.

4.15 Sub-clonagem das regiões codificadoras dos genes *kmp-11* e *fesod-a*

Os plasmídeos recombinantes contendo as regiões codificadoras dos genes *kmp-11* e *fesod-a* (item 4.13) foram digeridos com a enzima de restrição *BglII* (New England BioLabs). Na reação de digestão foram utilizados 30 µg do plasmídeo recombinante, 15 µL BSA (10 mg/mL), 10 µL tampão *NEBuffer* 3 10X, 3 µL enzima (10 U/µL) e água deionizada estéril para volume final de 150 µL. O fragmento liberado após a digestão foi separado em gel de agarose 1% e purificado com o *Kit Gel Extraction QIAquick* (Qiagen), conforme protocolo descrito pelo fabricante. O vetor de expressão pIR1-BSD (10 µg), gentilmente cedido pelo Dr. Stephen Beverley - Washington University/USA, também foi digerido com *BglII* (New England BioLabs) e, em seguida, defosforilado utilizando a enzima *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal*- CIAP (Promega), conforme protocolo do fabricante. O vetor foi então precipitado com adição de 3 volumes de etanol e 1:10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (v/v). A amostra foi mantida por 30 min a -20 °C, centrifugada a

15000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado 2X com etanol 70%, centrifugado a 15000 x g por 10 min a 4 °C e ressuspensionado em água deionizada estéril. Posteriormente, o vetor defosforilado foi submetido a reação de ligação com o inserto utilizando o kit *Rapid DNA Ligation* (Roche), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células cálcio competentes *E. coli* cepa TOP 10F' por choque térmico e, os transformantes confirmados por PCR de colônia e digestão com a enzima *BglII* (New England BioLabs).

Para determinar a correta orientação do inserto, o plasmídeo recombinante contendo a região codificadora do gene *kmp-11* foi digerido com *SmaI* (Promega) a 25°C por 4 h e o plasmídeo recombinante contendo a região codificadora do gene *fesod-a* foi digerido com *SphI* (Promega) a 37°C por 4 h. Os fragmentos da digestão com *SmaI* foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg/μL) e os fragmentos resultantes da digestão com *SphI* foram separados em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, para melhor visualização dos fragmentos. Para as reações de digestão com a enzima *SphI* foram utilizados 3 μL do plasmídeo recombinante (~200 ng/μL), 2 μL tampão K 10X, 0,2 μL BSA (10mg/mL), 0,4 μL enzima (10U/ μL) e água deionizada para volume final de 20 μL. Para as reações de digestão com a enzima *SmaI* foram utilizados 5 μL do plasmídeo recombinante (~100 ng/μL), 2 μL tampão J 10X, 0,2 μL BSA (10mg/mL), 0,4 μL enzima (10 U/ μL) e água deionizada para volume final de 20 μL.

Os plasmídeos recombinantes contendo as regiões codificantes dos genes nas orientações corretas, bem como o vetor de expressão pIR1-BSD sem inserto foram digeridos com a enzima *SmaI* por 16h a 37°C, separados em gel de agarose 1%, purificados utilizando o kit *PCR Purification* (Quiagen) e quantificados. Os plasmídeos recombinantes e o vetor de expressão linearizados foram utilizados nos experimentos de transfecção estável em linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao SbIII.

4.16 Expressão da proteína recombinante KMP-11

4.16.1 Clonagem do gene *kmp-11* no vetor de expressão

A região codificadora do gene *kmp-11*, amplificada conforme descrito no item 4.5, foi clonada utilizando kit *Rapid DNA Ligation* (Roche) em vetor de expressão PQE-31 (Qiagen), previamente digerido com as endonucleases de restrição *KpnI* (Promega) e *HindIII* (Promega). Para a reação de digestão foram utilizados 2 μL

tampão Multi-Core 10X, 0,4 µL enzima *KpnI* (10 U/µL), 0,4 µL enzima *HindIII* (10 U/µL), 1 µg vetor pQE-31 e o volume completado com água deionizada para 20 µL. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 16h. O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* cepa M15 [pREP4] por choque térmico. Colônias positivas selecionadas por PCR (item 4.5) foram induzidas a expressar a proteína recombinante mediante a adição de IPTG. O IPTG é um análogo da lactose, que se liga à proteína repressora Lac. A proteína repressora na ausência de lactose permanece ligada ao sítio do início da síntese de RNA, impedindo a transcrição do gene. Na presença do IPTG, esta proteína repressora se desliga e induz a transcrição e expressão da proteína recombinante.

Para determinar as melhores condições de indução, foi realizado uma cinética variando as concentrações de IPTG (0,5, 1 e 1,5 mM) e os tempos de indução. A densidade óptica da cultura foi monitorada por espectrofotômetro a 600nm até atingir valores entre 0,4 e 0,6, e, então foi adicionado o agente indutor. Alíquotas da cultura antes da indução por IPTG e a cada 1 h após a indução por até 6 h foram coletadas, centrifugadas a 2150 x g por 10 min e os sedimentos ressuspensos em tampão de amostra (10% SDS; 0,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 1% azul de bromofenol; 5% 2β-mercaptoetanol e 10% glicerol) e armazenados a -20 °C. A eficiência na expressão da proteína recombinante foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15%, conforme Laemmli (1971).

4.16.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eficiência da expressão da proteína recombinante foi verificada por SDS-PAGE 15%, conforme Laemmli (1970) modificado. A eletroforese foi realizada em equipamento minigel (BIORAD) com géis de 1 mm de espessura. As proteínas homogeneizadas em tampão de amostra foram fervidas em banho-maria por 5 min e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 50 V por 15-20 min, para o empilhamento das mesmas no gel de concentração, e posteriormente a 100 V, em tampão para eletroforese de proteínas (25 mM de Tris-HCl; 192 mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3). A corrida foi acompanhada pelo azul de bromofenol presente no tampão da amostra. Para estimar a massa molecular das proteínas utilizou-se o marcador molecular *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (BIORAD). O gel foi corado por 2 h pela técnica Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25% azul de Coomassie brilhante R-250; 50% metanol e 10% ácido acético) a

temperatura ambiente e, em seguida descorado com solução descorante (10% metanol e 5% ácido acético).

4.16.3 Teste de solubilidade e purificação da proteína recombinante KMP-11

Para determinar a solubilidade da proteína recombinante KMP-11, uma colônia isolada foi crescida em 10 mL de meio LB com os antibióticos ampicilina (10 µg/mL) e kanamicina (25 µg/mL) a 37 °C, sob agitação constante. A densidade óptica da cultura foi monitorada até atingir o valor de 0,6 e, então foi adicionado 1,0 mM IPTG. Após 6 h de indução a cultura foi centrifugada a 2150 x g por 10 min e o sedimento ressuscitado em 5 mL tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH 8,0). Em seguida, foi adicionado lisozima (1 mg/mL) e a amostra mantida no gelo por 30 min. Posteriormente, a amostra foi submetida a 5 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido (-196 °C) e banho-maria a 37 °C e o lisado centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 30 min. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi reservado e o sedimento contendo as proteínas insolúveis ressuscitado em tampão de lise. Alíquotas das duas frações foram analisadas por SDS-PAGE conforme descrito no item 4.16.2.

A purificação da proteína KMP-11 sob condições nativas foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni²⁺- NTA) (Qiagen). Essa resina se associa à cauda de 6 histidinas presente na proteína recombinante. Um pré-inóculo foi preparado em meio LB com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e kanamicina (25 µg/mL) e crescido a 37°C por 16 h. Um volume de 20 mL do pré-inóculo foi adicionado em 1L de meio LB acrescido com os antibióticos e a cultura incubada a 37 °C, sob agitação constante, até atingir a densidade óptica de 0,6. Em seguida, foi adicionado 1mM de IPTG. Após 6h de indução, a cultura foi centrifugada a 4000 x g por 20 min e o sedimento ressuscitado em tampão de lise. A extração de proteínas sob condições nativas foi realizado conforme descrito no item 4.16.1. Para cada 4 mL do sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi adicionado 1 mL da resina 50% Ni-NTA (Qiagen). A mistura foi submetida à agitação a 4 °C por 4 h e, posteriormente adicionada à coluna (BIORAD) para o empacotamento da resina. A resina empacotada foi então lavada 2X com de tampão de lavagem (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0) e, em seguida a proteína recombinante foi eluída em tampão de eluição (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol, pH 8,0). Alíquotas de

20 µL foram armazenadas de todas as etapas de purificação e analisadas por SDS-PAGE (item 4.16.2)

4.16.4 Obtenção do anticorpo policlonal anti- KMP-11

Para produção do soro policlonal, 300 µg da proteína recombinante solubilizada em PBS foi inoculada em coelhos (Nova Zelândia) provenientes da fazenda da UFMG em Igarapé. Foi utilizado 1 coelho com aproximadamente 3 meses de idade e pesando cerca de 2,5-3 Kg para cada condição avaliada.

Os coelhos receberam três inoculações subcutâneas nos dias 0, 7 e 21. As condições de imunização foram: coelho controle inoculado apenas com tampão de eluição; um coelho inoculado apenas com a proteína recombinante e um coelho imunizado com a proteína e adjuvante completo (dia 0) e incompleto (dias 7 e 21) de Freund. O sangue foi coletado 15 e 30 dias após a última inoculação. Foi coletado 1mL de sangue dos coelhos no dia zero, sendo portanto, o controle pré-imune.

O sangue coagulado foi centrifugado a 2359 x g a 4°C por 5 min e o soro aliquoteado e armazenado a -20°C.

4.17 Western blot

A expressão das proteínas FeSOD-A e KMP-11 nas linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII foram analisada por *Western blot*. O anticorpo policlonal anti-proteína ferro superóxido dismutase de *T. cruzi* (TcFESOD) foi produzido em nosso laboratório por Nogueira *et al.*, 2006. O perfil das proteínas totais foi resolvido por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 15% (Laemmli, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-Blot[®] Bio-Rad) a 100 V por 1 h, no gelo, em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; metanol 20%) utilizando o sistema de transferência BIORAD. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS-T (Tris-HCl 100 mM; NaCl 1,5 M pH 7,5 e 0,05% Tween 20) acrescido de leite em pó desnatado 5% por 1 h a temperatura ambiente e, posteriormente lavadas 3X com TBS-T por 15 min. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-TcFESOD (1:500) e anticorpo primário anti-KMP-11 (1:2500), separadamente, a 4 °C por 16 h, lavadas 2X com TBS-T por 15 minutos e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com o conjugado anti-IgG (1:6000) de coelho marcado com peroxidase (GE). Os anticorpos utilizados foram diluídos em TBS-T acrescido de leite em pó desnatado a 3%. Posteriormente,

as membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham), de acordo com o protocolo do fabricante. As membranas foram normalizadas utilizando o anticorpo monoclonal primário anti- α -tubulina de camundongo (1:5000) (Sigma[®]) e o anticorpo secundário conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:6000) (GE).

4.18 Transfecção em formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Os ensaios de transfecção foram realizados segundo o protocolo descrito por Robinson & Beverley (2003), que utiliza o método de eletroporação de alta voltagem.

Formas promastigotas das linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII, em fase exponencial de crescimento, foram transfectadas com as construções pIR1-BSD_FeSOD-A, pIR1-BSD_KMP-11 e com o vetor de expressão sem inserto (pIR1-BSD), como controle da interferência do vetor na transfecção. Aproximadamente 2×10^8 parasitos foram centrifugados a 728 x g por 10 min a 4 °C e o sedimento lavado e ressuspensionado com tampão Citomix (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄; 25 mM HEPES; 2 mM EDTA e 5 mM MgCl₂; pH 7,6). A suspensão contendo os parasitos foi submetida à eletroporação com 10 μ g do plasmídeo recombinante linear. As células foram eletroporadas com 2 pulsos de 1500 V e 25 μ F, com intervalo de 10 seg entre eles, em equipamento GenePulser XCell (BIORAD). Após a eletroporação, os parasitos foram incubados por 16-24 h com 10 mL de meio M199 (Gibco) sem droga e, em seguida centrifugados a 1300 g x 4 °C por 10 min e o sedimento ressuspensionado em meio M199 (Gibco) sem droga. Um volume de 200 μ L de cultura foram plaqueados em meio M199 (Gibco) agar semi-sólido contendo a droga de seleção blasticidina (BSD) (10 μ g/ml) e, incubados a 27 °C por 15-20 dias. Após crescimento, as colônias individuais foram transferidas para 1 mL de meio M199 (Gibco) sem droga em placa de 24 poços. Após 3-4 dias, 1 mL desta cultura de parasitos foi transferido para garrafas de culturas de 25 cm² contendo 10 mL de meio M199 (Gibco) acrescido com blasticidina (10 μ g/ml).

Para avaliar a integridade do gene *bsd* no genoma dos parasitos, os clones resistentes à droga de seleção foram submetidos à extração de DNA pelo método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Resumidamente, 1 mL da cultura foi centrifugado a 17800 g x por 30 seg, a temperatura ambiente. Os sedimentos foram lavados com PBS, centrifugados nas mesmas condições descritas acima e ressuspensionados em 250 μ L de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,25 mM EDTA pH 8,0;

0,15 M NaCl e 0,5% SDS). Após homogeneização com o tampão de extração, as amostras foram incubadas com RNase (20 µg/mL) a 37 °C por 2 h. Em seguida, foi adicionado proteinase K (0,1 mg/mL) e as amostras incubadas a 37 °C por 2 h. Posteriormente, foi adicionado 250 µL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (1:1:24). As amostras foram então centrifugadas a 17800 x g por 10 min, a temperatura ambiente, e, o sobrenadante transferido cuidadosamente para outro tubo. Ao sobrenadante foi adicionado 500 µL de etanol e 25 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e incubado a 4 °C por 1 h. As amostras foram centrifugadas a 17800 x g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos contendo o DNA foram expostos a temperatura ambiente para completa secagem e, então ressuspensos em água deionizada estéril. O DNA extraído dos parasitos transfectados foram quantificados e submetidos à reação de PCR para confirmar a presença do marcador molecular, o gene *bsd* que confere resistência à blasticidina. Após a confirmação da presença da construção plasmidial no genoma de linhagens de *Leishmania* spp. transfectadas, foram realizadas análises por *Western blot* para confirmar o nível de expressão das proteínas FESOD-A e KMP-11 nos parasitos transfectados. Cultura de promastigotas (1×10^7 parasitos) foi centrifugada a 728 g x a 4 °C por 10 min, e o sedimento lavado com PBS e ressuspensado em 300 µl de tampão de amostra de proteína. As amostras foram separadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 15% (item 4.16.2) e transferidas para membrana de nitrocelulose conforme descrito no item 4.17. Os parasitos transfectados foram criopreservados em solução de congelamento (soro fetal bovino 20%, Meio M199 (Gibco) 1X e DMSO 10%) e armazenados -70°C.

4.19 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente

As linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII transfectadas com as regiões codificantes dos genes *fesod-a* e *kmp-11*, bem como os parasitos selvagens e transfectados com o vetor sem inserto, foram submetidos à análise de susceptibilidade ao SbIII. Resumidamente, formas promastigotas (2×10^6 parasitos/mL) foram semeadas em volume de 1 mL em placa de 24 poços e, então os parasitos incubados em meio sem a adição de droga (controle) e com diferentes concentrações de SbIII, em triplicata. As placas foram mantidas a 27 °C por 48 h. Posteriormente, o IC₅₀ foi determinado contando o número de parasitos crescidos na ausência e presença de diferentes concentrações

do antimonial trivalente. Foram realizados pelo menos três ensaios para cada condição analisada.

4.20 Efeito da superexpressão de FESOD-A na tolerância de linhagens de *Leishmania* spp. ao paraquat

Os parasitos do tipo selvagem, transfectados com o vetor sem inserto e transfectados com o gene *fesod-a* foram avaliados quanto à tolerância ao paraquat (SIGMA), agente indutor de ROs, conforme descrito por Paramchuck *et al.*, 1997. Formas promastigotas das linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII (2×10^6 parasitos/mL) foram semeados em volume de 1 mL em placa de 24 poços e, então submetidos a diferentes concentrações do reagente. De acordo com a curva de crescimento dos parasitos foi determinado o dia (início da fase estacionária) para contagem do número de parasitos tolerantes ao estresse oxidativo induzido pelo reagente Paraquat. Os parasitos selvagens foram contados após 4 dias de cultivo e os resistentes após 3 dias, utilizando o contador de células Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). Todos os experimentos foram realizados duas ou mais vezes e o reagente paraquat foi preparado imediatamente antes do seu uso.

4.21 Ensaio da atividade enzimática de FeSOD-A em *Leishmania* spp.

A atividade enzimática de FeSOD-A nas linhagens de *Leishmania* spp. não transfectadas e transfectadas com o gene *fesod-a* foi determinada indiretamente pela capacidade da enzima de inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar (Ahmed *et al.*, 2003). O ensaio foi realizado, em triplicata, em placa de 96 poços. O tampão de ensaio Tris-ácido cacodílico (0,05 M, pH 8,2) contendo 0,001 M de ácido dietilenotriamina pentaacético (DTPA) foi preparado pela adição de Tris (0,05 M contendo 0,001M DTPA) ao ácido cacodílico (0,05M contendo 0,001M DTPA) até atingir pH 8,2. A solução estoque de pirogalol 20 mM foi preparada em água. O oxigênio dissolvido nesta solução foi removido através do borbulhamento de hélio puro por 20 min. A solução de pirogalol foi, então, mantida fechada a 4°C e as alíquotas retiradas com cuidado para não formar bolhas e permitir a entrada do oxigênio. Uma solução estoque (200 µg/mL) de SOD bovina (SIGMA), submetida a diluições seriadas até a concentração de 6,25 µg/mL, foi utilizada como padrão. Como controle negativo foi utilizado 20 µL de água. Em cada poço foi aplicado o volume de 20 µL correspondente a 80 µg e 60 µg de proteínas de *L. (V.) braziliensis*

e *L. (L.) infantum chagasi*, respectivamente. Imediatamente antes do ensaio, uma alíquota da solução estoque de pirogalol (20 mM) foi diluída 100X em tampão de ensaio aerado e 180 µL foi adicionado em cada poço da placa com auxílio de uma pipeta multicanal.

As placas foram mantidas a temperatura ambiente e submetidas à leitura em leitor de ELISA, a 405 nm, no tempo zero e a cada 5 min de reação por um intervalo de 1 h. Para o cálculo da atividade dos extratos, foi realizado uma média dos valores de absorbância das amostras, incluindo o padrão e o controle, no tempo zero e após 5 min de reação. O valor da média da absorbância do branco no tempo de 5 min foi subtraído do valor da média da absorbância do branco no tempo zero, e o valor final obtido foi considerado como 100% de oxidação do pirogalol. Da mesma forma, foram subtraídos os valores de absorbância do padrão e das amostras no tempo de 5 min dos valores obtidos no tempo zero. Tomando como referência o controle positivo, o valor oxidado das amostras foi calculado e subtraído de 90 para encontrar a percentagem de inibição. Este valor foi utilizado devido à atividade enzimática da enzima FeSOD-A, usada como controle do experimento. Os valores apresentados na Tabela 4 mostram a média da absorbância, do desvio padrão e da percentagem de inibição da oxidação do pirogalol obtidos de três experimentos independentes.

4.22 Infecção de células THP-1 com linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens e transfectadas com o gene *kmp-11*

Macrófagos obtidos por meio da diferenciação de células THP-1 com PMA (acetato miristato de forbol) (50 ng/mL), foram semeados na densidade de 2×10^5 células/poço em placa de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm e, incubados por 72 h a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, os macrófagos foram incubados com as formas promastigotas (2×10^6 parasitos/mL) de linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens, não transfectadas e transfectadas com o vetor sem inserto e com o gene *kmp-11* em fase estacionária de crescimento. Foram avaliadas três multiplicidades de infecção (MFI), 5:1; 10:1 e 20:1 em relação ao número de parasitos por macrófago a ser infectado. Após 5 h de interação, o sobrenadante contendo os parasitos livres foi removido e foi adicionado meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino. As culturas foram novamente incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ por um período de 24 h. Após esse período, as lamínulas foram coradas com Panótico, montadas com Entellam e o número de macrófagos infectados foi determinado usando microscópio. O curso da infecção

também foi avaliado. Para a montagem dos experimentos, foi utilizado a proporção de infecção 1:10 e foram avaliados três tempos de interação, 2,5 h, 5 h e 24h. Os ensaios foram realizados conforme descrito acima.

Para avaliar se o gene KMP-11 pode estar envolvido nos mecanismos de resistência a drogas, macrófagos foram infectados com uma suspensão de parasitos (1:10) e, após 5 h de interação o sobrenadante foi removido e, então foi adicionado meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino sem droga (controle da infecção) e com concentrações crescentes de SbIII e anfotericina B, separadamente.

O número de macrófagos infectados foi determinado através da contagem dos macrófagos infectados/100 células.

4.23 Infectividade de linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens e transfectadas com o gene *kmp-11* em camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ

Formas promastigotas metacíclicas (1×10^7 parasitos) de *L. (V.) braziliensis* selvagens e transfectadas com o gene *kmp-11* foram inoculadas na pata direita de camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ e o crescimento da lesão foi medida com auxílio de um paquímetro. A pata esquerda foi utilizada como controle. O curso da infecção foi acompanhado por 52 dias e, posteriormente os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂. Foram realizados dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério do CPqRR/Fiocruz/MG e mantidos em microisoladores.

4.24 Análise Densitométrica

A análise densitométrica da intensidade das bandas das proteínas FeSOD-A e KMP-11 visualizadas nos ensaios de *Western blot* e capturadas pelo aparelho ImageQuant LAS 4000 foi realizada pelo programa Gel Analyser 2010. Foram realizados no mínimo dois experimentos para cada condição analisada e cada membrana foi analisada três vezes. Foi considerado como significativo os valores de densidade ótica das bandas superiores ou iguais a 1,5.

4.25 Análises estatísticas

Os experimentos foram analisados pelo programa Prisma 5. Para determinar se os dados seguiam distribuição normal foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Como os dados seguiam distribuição normal, foi utilizado o teste

paramétrico tradicional baseado na distribuição t-student para as análises estatísticas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O IC_{50} foi calculado por interpolação de dados, visto que, os dados não possuem variância constante.

5. RESULTADOS

5.1 Ferro superóxido dismutase-A

5.1.1 Análise da região codificadora do gene *fesod-a* de *L. (V.) guyanensis* selvagem

A região codificadora (CDS) do gene *fesod-a* foi amplificada com os iniciadores descritos no item 4.5 e como molde para reação de PCR foi utilizado o DNA genômico de *L. (V.) guyanensis* selvagem. Posteriormente, esse fragmento de 693 pb foi clonado no vetor pGEM[®]- T Easy e submetido à reação de sequenciamento. A busca por identidade de sequência foi feita utilizando o programa *Blast (Basic Local Alignment Search Tool)*, ferramenta usada para o alinhamento local entre seqüências. A CDS apresentou 99% e 81% de identidade de nucleotídeos quando alinhada com CDS de *L. (V.) braziliensis* (número de acesso GenBank XM_001562044.2) e *L. (L.) infantum chagasi* (número de acesso GenBank XM_001463334.1), respectivamente (Anexo I e II). A sequência de aminoácido da FeSOD-A de *L. (V.) guyanensis* apresentou 99% e 74% de identidade quando alinhada às seqüências de *L. (V.) braziliensis* (número de acesso XP_001562094.1) e *L. (L.) infantum chagasi* (número de acesso XP_001463371.1), respectivamente (Anexo III e IV). Como esperado, as CDS do gene *fesod-a* das espécies de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, pertencentes ao mesmo subgênero (*Viannia*), apresentaram grande identidade, com substituição de três resíduos de aminoácidos nas posições 54, 116 e 166.

5.1.2 Organização do gene *fesod-a* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII

A organização do gene *fesod-a* nas linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII foi analisada pela técnica de *Southern blot*. O DNA das amostras de *Leishmania* foi digerido com *Bam*HI e *Hin*fl, e os fragmentos separados em gel de agarose 1% foram transferidos para membrana de náilon e, então hibridizados com a sonda de 693 pb específica do gene *fesod-a* marcada com [³²P].

No *Southern blot* utilizando *Bam*HI, cuja a região codificadora do gene *fesod-a* não possui sítio de restrição para essa enzima, a sonda reconheceu uma banda única de 12 Kb em todas as amostras analisadas (Figura 7A). Por outro lado, *Southern blot* utilizando a enzima *Hin*fl, mostrou diferentes perfis de hibridização

entre as diferentes espécies e entre linhagens sensíveis e resistentes de uma mesma espécie de *Leishmania*, indicando a presença de polimorfismos no gene *fesod-a* dessas amostras (Figura 7B).

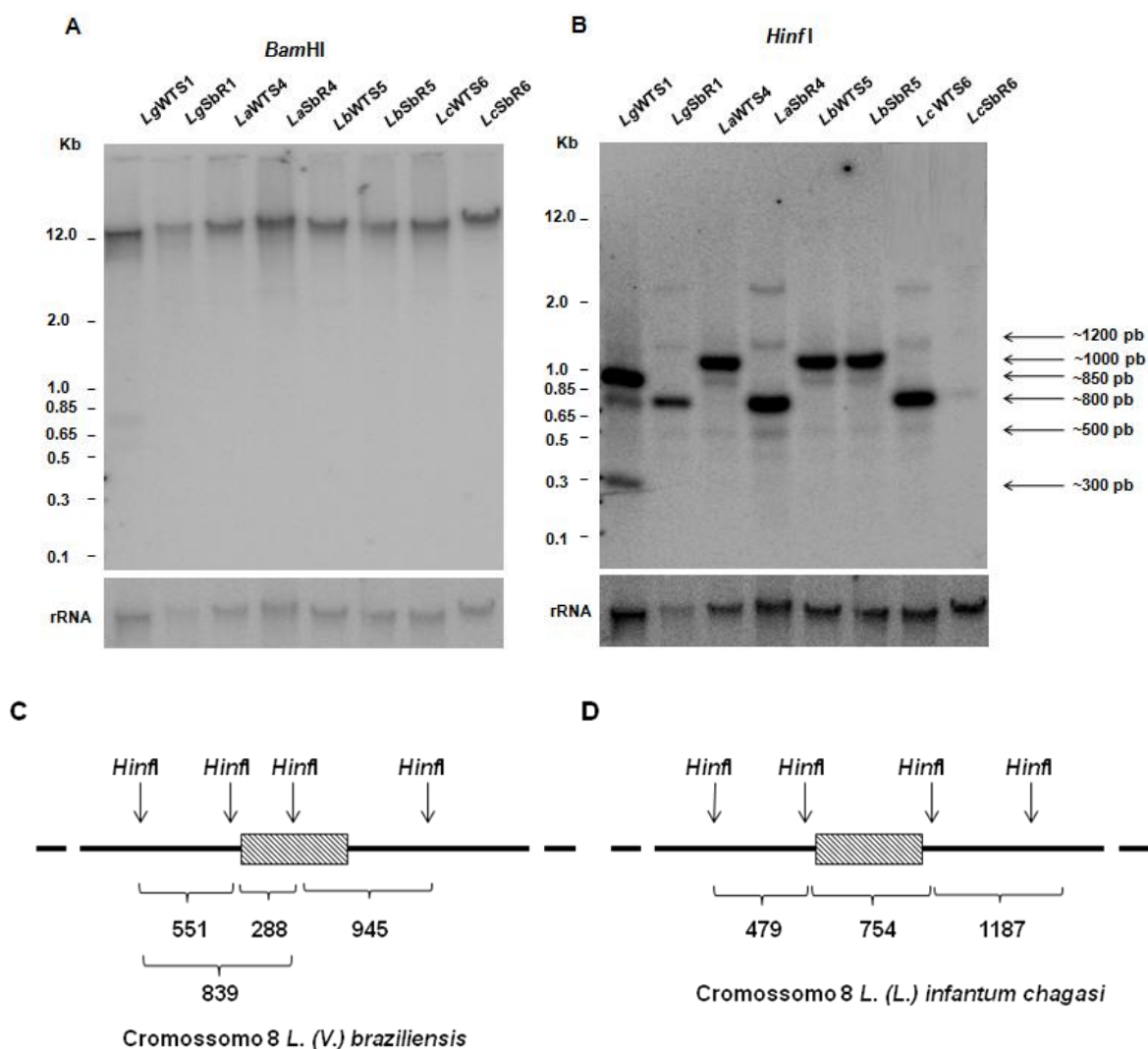


Figura 7: Análise de Southern blot do gene *FeSOD-A* em linhagens de *Leishmania* spp selvagens e resistentes ao SbIII. Amostras de DNA genômico foram digeridas com *Bam*HI (A) ou *Hinf*I (B), e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e hibridizado com sonda específica *FeSOD-A* marcado [³²P]. Como controle quantitativo, as membranas foram incubadas com a sonda do gene RNA ribossomal (24S alfa) de *Leishmania*. Esquema representativo da digestão *in silico* do DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* (C) e *L. (L.) infantum chagasi* (D) com *Hinf*I. Abreviações indicam: *L. (V.) guyanensis* selvagem (LgWTS1) e resistente (LgSbR1); *L. (L.) amazonensis* selvagem (LaWTS4) e resistente (LaSbR4); *L. (V.) braziliensis* selvagem (LbWTS5) e resistente (LbSbR5); *L. (L.) infantum chagasi* selvagem (LcWTS6) e resistente (LcSbR6).

A sonda específica do gene *fesod-a* reconheceu com forte intensidade um fragmento de aproximadamente 1000 pb em *L. (V.) braziliensis* e 700 pb na linhagem *L. (L.) infantum chagasi* selvagem, que correspondem aos tamanhos esperados conforme análise *in silico* (Figura 7C e D). Na linhagem resistente de *L. (L.) infantum chagasi* a sonda reconheceu com menor intensidade o fragmento de

800 pb devido a digestão não eficiente do DNA genômico com a enzima *HinfI*. Assim, os resultados para essa linhagem são inconclusivos. Por outro lado, a linhagem de *L. (V.) guyanensis* selvagem apresentou fragmentos de aproximadamente 950 pb, 800 pb e 300 pb e a resistente um fragmento de 800 pb. A linhagem de *L. (L.) amazonensis* selvagem apresentou um fragmento de aproximadamente 1000 pb e a resistente um fragmento de 800 pb. Outros fragmentos de menor intensidade também foram reconhecidos pela sonda do gene *fesod-a* nas diferentes amostras de *Leishmania* analisadas. Como controle quantitativo, a mesma membrana foi hibridizada com a sonda correspondente à subunidade 24S alfa do gene do RNA ribossomal de *Leishmania* (Figura 7B). Assim, pode-se inferir que o diferente padrão de bandas observado nos pares sensíveis e resistentes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* ocorreu possivelmente devido à presença de polimorfismos na região codificante do gene *fesod-a*. Esse resultado também pode ser devido à deleção de cópias do gene FeSOD nas linhagens resistentes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

A digestão *in silico* da sequência de nucleotídeos do cromossomo 8 de *L. (V.) braziliensis* (número de acesso NC_009300.2), onde o gene *fesod-a* está localizado, com a enzima *HinfI* gerou dois fragmentos principais de aproximadamente 288 pb e 945 pb e fragmentos alternativos de aproximadamente 839 pb e 551 pb, utilizando diferentes combinações de sítios de clivagem (Figura 7C). Por outro lado, a digestão *in silico* do cromossomo 8 de *L. (L.) infantum chagasi* (número de acesso NC_009392.1) com essa enzima, mostrou a presença de fragmentos de 479 pb, 754 pb e 1187 pb, correspondentes ao resultado obtido no *Southern blot* (Figura 7D).

5.1.3 Nível de mRNA em *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII

O nível de mRNA nas linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII foi analisado por *Northern blot* e PCR quantitativo em tempo real. *Northern blot* contendo as diferentes amostras de *Leishmania* e hibridizado com sonda específica do gene *fesod-a* revelou a presença de um transcrito de aproximadamente 2,1 Kb em todas as linhagens de *Leishmania* spp. analisadas, com exceção da *L. (V.) guyanensis* sensível que apresentou dois transcritos de aproximadamente 2,37 e 1,75 Kb. Como controle quantitativo, a mesma membrana foi hibridizada com a sonda correspondente à subunidade 24S alfa do gene do RNA ribossomal de *Leishmania* (Figura 8B).

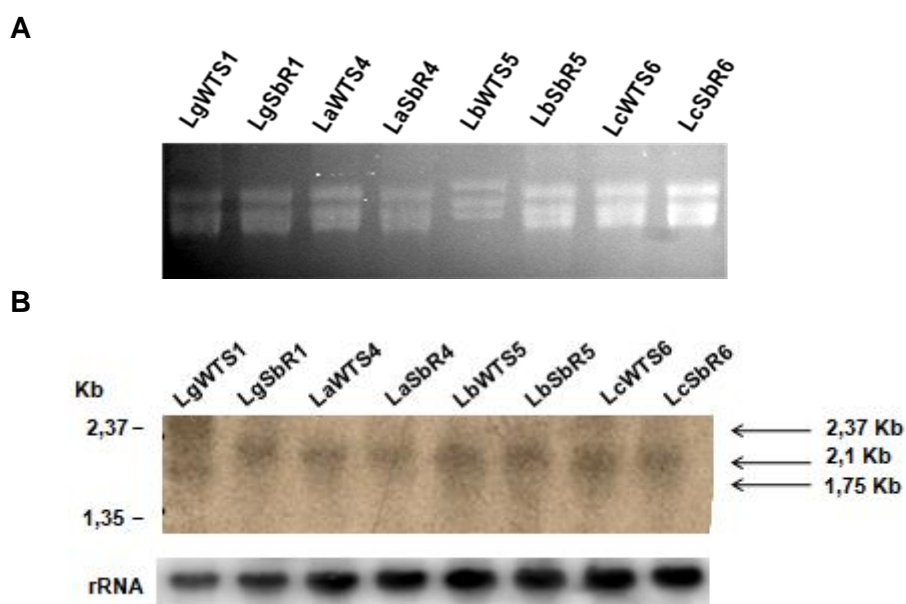


Figura 8: Análise de Northern blot do gene *fesod-a* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII. (A) A integridade do RNA total foi analisado em gel de agarose 1,2 %. (B) RNA total (10 µg) foi separado por eletroforese e a membrana hibridizada com sonda específica FeSOD-A marcado com [³²P]. Como controle quantitativo, a membrana foi incubada com a sonda do gene RNA ribossomal (subunidade 24 S alfa) de *Leishmania*. Abreviações indicam: *L. (V.) guyanensis* selvagem (LgWTS1) e resistente (LgSbR1); *L. (L.) amazonensis* selvagem (LaWTS4) e resistente (LaSbR4); *L. (V.) braziliensis* selvagem (LbWTS5) e resistente (LbSbR5); *L. (L.) infantum chagasi* selvagem (LcWTS6) e resistente (LcSbR6).

O nível de mRNA nas linhagens de *Leishmania* spp. foi quantificado por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). A quantidade de RNA total nas diferentes amostras foi normalizada utilizando o gene constitutivo subunidade menor do RNA ribossomal (SSU 18S rRNA) do parasito. As curvas padrão foram construídas utilizando diluições seriadas dos plasmídeos contendo o fragmento da região codificante do gene SSU rRNA ou a região codificadora do gene *fesod-a*. Para ambos os genes, a intensidade de fluorescência de cada amostra, proporcional à quantidade de DNA, foi expresso pelo valor do ciclo do PCR tomando como base de análise o C_T (cycle threshold). A partir da correlação de dados do C_T interpolado na curva padrão foi analisado o número de moléculas do gene *fesod-a* nas amostras de cDNA das linhagens de *Leishmania* estudadas.

As curvas padrão mostraram boa linearidade para a faixa de concentração dos plasmídeos utilizados. O coeficiente de correlação linear, que mede o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores de C_T das diluições seriadas dos plasmídeos dos genes SSU rRNA e *fesod-a* foram 0,994 e 0,995,

respectivamente (Figura 9A e B). Outro parâmetro analisado foi o *slope* que avalia a eficiência da amplificação. Valor de *slope* $-3,3 \pm 10\%$ reflete eficiência de $100\% \pm 10\%$. Nos ensaios foram encontrados valores de *slopes* de $-3,27$ e $-2,97$ para os genes de SSU rRNA e *fesod-a*, respectivamente.

Outro ponto a ser observado na análise é a curva de dissociação. Esse passo foi adicionado no programa e mostra a temperatura em que ocorreu a dissociação do corante fluorescente SYBR Green da dupla fita de DNA. O SYBR Green é um composto fluorescente utilizado na detecção de moléculas de DNA, uma vez que este composto intercala preferencialmente em DNA dupla fita. Caso haja contaminantes ou dímeros de iniciadores na amostra, o corante pode intercalar nas duplas fitas de acordo com o tamanho e a composição da sequência amplificada e, assim apresentar temperatura de dissociação diferente das amostras analisadas. A presença de apenas um pico de dissociação indica especificidade dos iniciadores para a amplificação de um único produto de PCR. Os gráficos das curvas de dissociação para os produtos amplificados com os iniciadores específicos dos genes de SSU rRNA e *fesod-a* mostram apenas um pico de dissociação, indicando que somente um único produto gênico foi amplificado pela reação de PCR (Figura 9C e D).

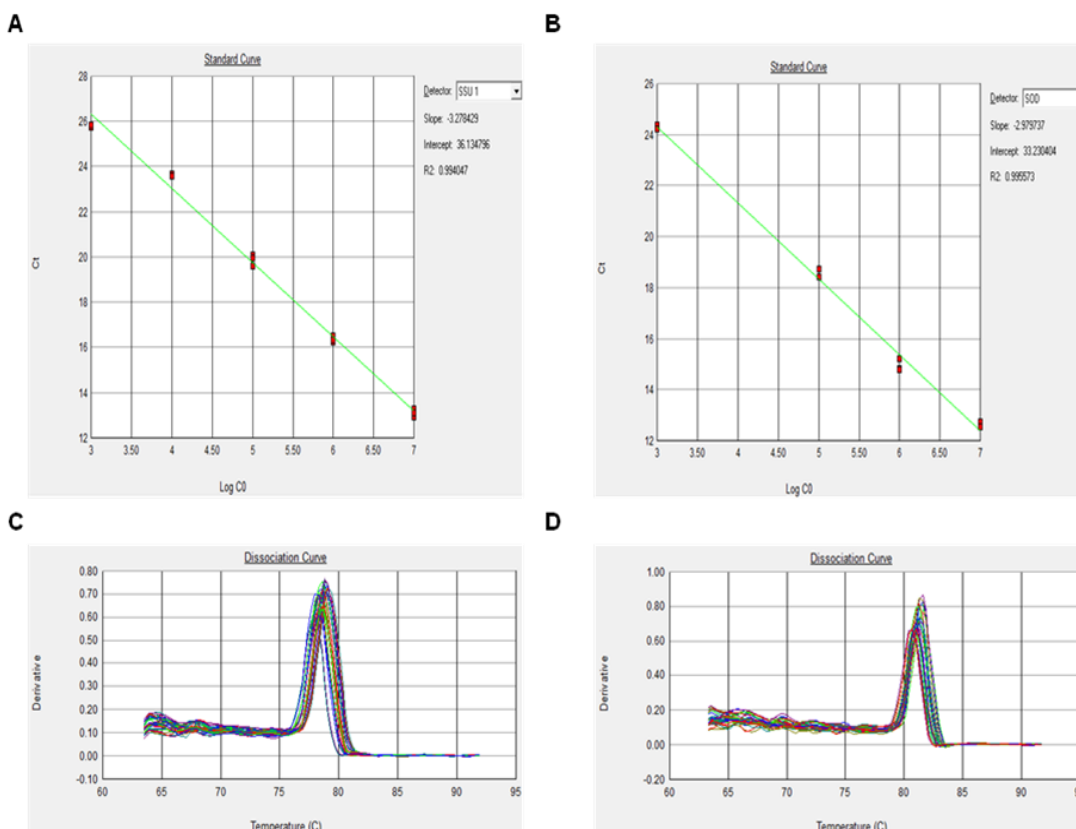


Figura 9: Quantificação do nível de mRNA do gene *fesod-a* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII por RT-qPCR. Curvas padrão dos plasmídeos recombinantes, em diluição seriada, dos genes SSU rRNA (A) e *fesod-a* (B). (C) e (D) curvas de dissociação dos genes SSU rRNA e *fesod-a*, respectivamente.

Os resultados de RT-qPCR mostraram uma diminuição de 3,6 vezes no nível de mRNA do gene *fesod-a* na linhagem resistente ao SbIII de *L. (V.) guyanensis* quando comparado com seu respectivo par. Por outro lado, não foi observado alteração na expressão do mRNA entre os pares das linhagens de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII (Figura 10).

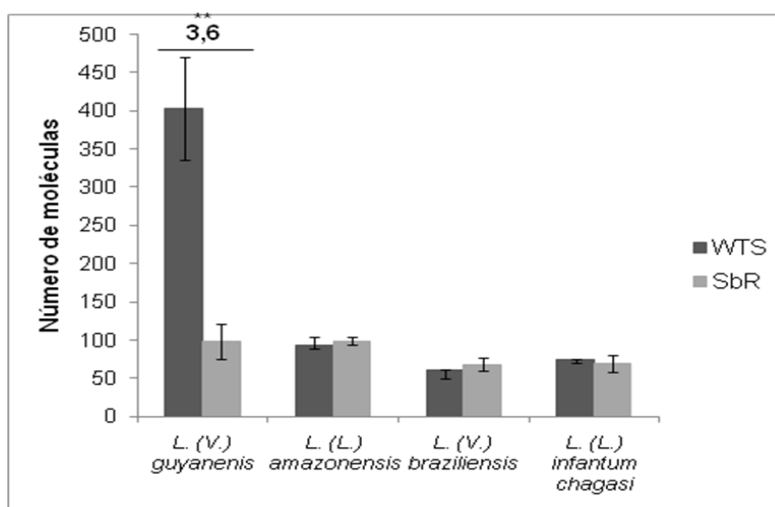


Figura 10: Quantificação da expressão do gene *fesod-a* em linhagens selvagens e resistentes de *Leishmania* spp. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. ** indica $p < 0,001$.

5.1.4 Expressão da proteína FeSOD-A em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII

A expressão da proteína FeSOD-A em linhagens de *Leishmania* spp. foi avaliada por *Western blot* utilizando o anticorpo policlonal produzido contra a proteína recombinante FeSOD-A de *T. cruzi* (anti-TcFeSOD) (Nogueira *et al.*, 2006). A sequência de aminoácidos da proteína FeSOD-A de *T. cruzi* (número de acesso XP_812157.1) quando alinhada à sequência de aminoácidos de *L. (V.) braziliensis* apresentou 62% de identidade (Anexo V). *Western blot* das proteínas totais (40 μ g) incubadas com o anticorpo anti-TcFeSOD, mostrou que esse anticorpo reconheceu um polipeptídeo de 26 kDa em todas as linhagens de *Leishmania* spp. analisadas (Figura 11A). Como controle quantitativo, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti- α -tubulina produzido em camundongo.

Análises de densitometria das bandas de FeSOD-A comparado com o normalizador α -tubulina mostraram que a enzima FeSOD-A está 2,0 e 3,0 vezes mais expressa em linhagens de *L. (V.) guyanensis* resistente ao SbIII e em *L. (L.) amazonensis* selvagem, respectivamente, comparado com os respectivos pares. Não foram observadas diferenças no nível de expressão da proteína entre os pares de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII (Figura 11).

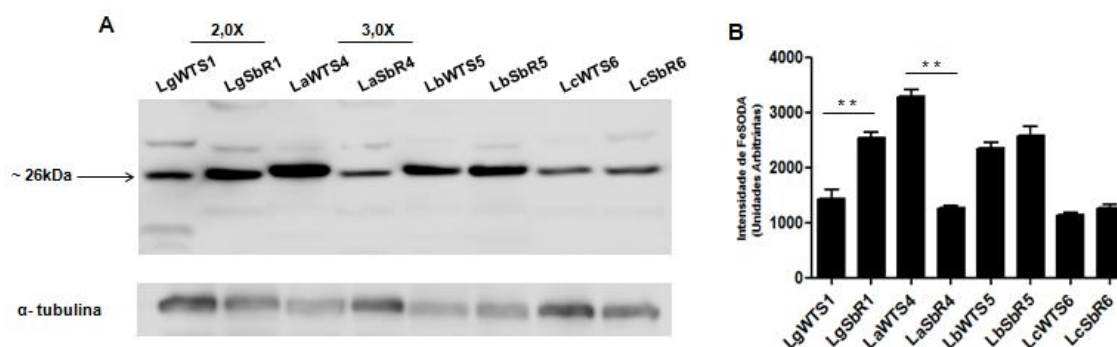


Figura 11: Expressão da proteína FeSOD-A em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII. (A) *Western blot* utilizando anticorpo policlonal anti-FeSOD (Nogueira *et al.*, 2006). Como controle quantitativo, foi utilizado anticorpo anti- α -tubulina. (B) Análise de densitometria das bandas de FeSOD-A em linhagens de *Leishmania* selvagens (WTS) e resistentes (SbR) ao SbIII normalizadas com α -tubulina. ** indica $p < 0,001$.

5.1.5 Transfecção da construção pIR1-BSD-FeSOD-A em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII

A região codificadora do gene *fesod-a* de LgWTS foi clonada em vetor pGEM[®]-T Easy. Conforme descrito no item 5.1.1 e anexo I, o plasmídeo foi sequenciado para confirmar a correta sequência do gene. Posteriormente, o plasmídeo foi digerido com a endonuclease de restrição *Bgl*II e, o fragmento liberado subclonado no vetor de expressão pIR1-BSD. Com o objetivo de confirmar a correta orientação do inserto no vetor, foi realizada análise *in silico* do fragmento clonado no vetor pIR1-BSD usando o programa Clone Manager (Figura 12). Após a análise, foi selecionado a enzima de restrição *Sph*I que possibilitou diferenciar a correta orientação do inserto no vetor devido aos diferentes fragmentos gerados após a digestão. O inserto clonado na orientação correta “senso” quando digerido com a enzima *Sph*I apresentou um padrão digestão com fragmentos de 1103 pb, 1303 pb e 6641 pb e na orientação “antisense” fragmentos de 898 pb, 1103pb e 7053 bp (Figura 12A e B). A Figura 13 mostra um gel de poliácridamida 10% corado com nitrato de prata com duas colônias que apresentaram o inserto na direção senso. A

colônia 2 contendo a construção na orientação correta “senso” foi submetida à extração de plasmídeo. Posteriormente, a construção com o gene *fesod-a* e o vetor pIR1-BSD vazios foram digeridos com a enzima *SmaI* para facilitar a integração no locus do RNA ribossomal SSU de *Leishmania*. As construções lineares foram, então, transfectadas por eletroporação nas linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII.

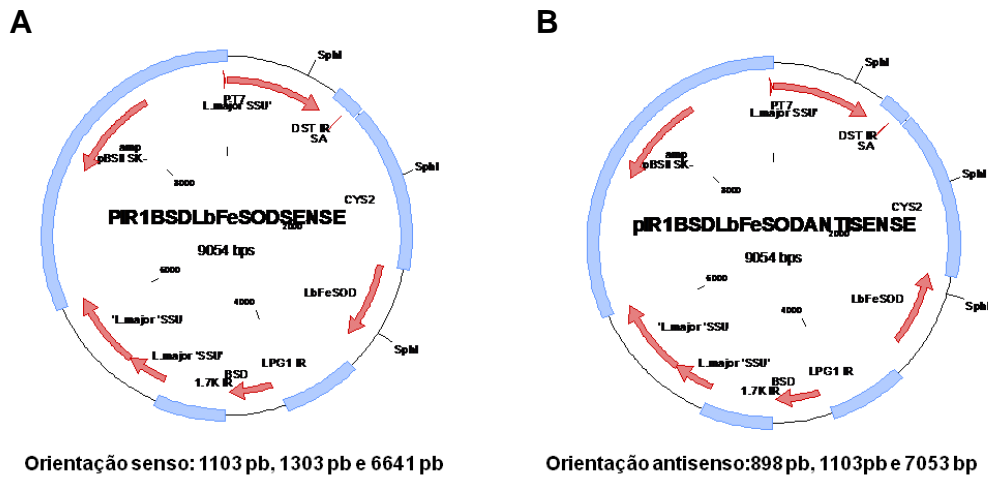


Figura 12: Clonagem in silico da região codificadora do gene *fesod-a* em vetor de expressão pIR1-BSD. A digestão da construção plasmidial com a enzima *SphI* gerou diferentes padrões de fragmentos quando o inserto está clonado na orientação senso (A) e antisenso (B).

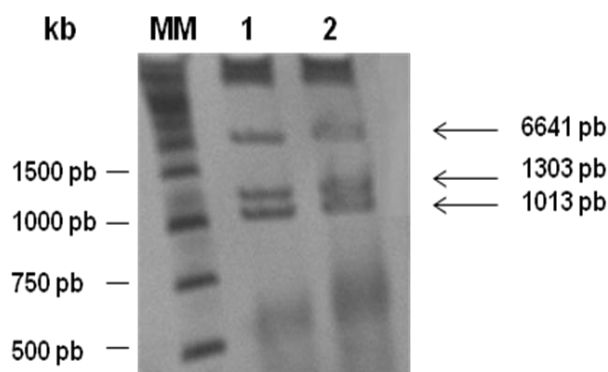
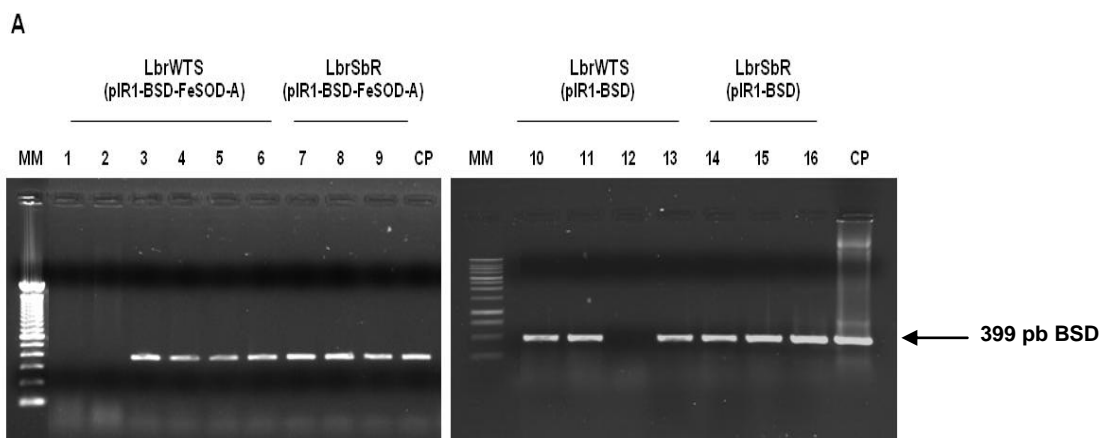


Figura 13: Construção pIR1-BSD-FeSOD-A digerida com a endonuclease *SphI* para confirmar a correta orientação do inserto. Os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. MM: Marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder (Promega). Linha 1: Colônia 1. Linha 2: Colônia 2. As duas colônias apresentam o inserto na orientação senso.

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* em fase exponencial de crescimento foram transfectadas com a construção pIR1-BSD-

LgFeSOD-A e com o vetor vazio (controle da interferência do vetor no parasito). Após a transfecção, as células foram incubadas por 24h em meio M199 sem droga. Em seguida, os parasitos foram centrifugados e plaqueados em meio semi-sólido contendo 10 µg/ml de blasticidina (BSD), droga de seleção do plasmídeo. Após um período de aproximadamente 15 dias, observamos a presença de colônias na placa indicando eficiência da transfecção. Em seguida, 12 a 16 colônias individuais de cada amostra foram incubadas em 1 mL de meio M199 líquido em placas de 24 poços. Após 3-4 dias, os parasitos (1 mL de cultura) foram transferidos para 10 mL de meio M199 contendo 10µg/ml de BSD. Os clones resistentes a BSD foram selecionados para ensaios de PCR e *Western blot*.

Para confirmar a transfecção foi realizada extração do DNA genômico dos clones resistentes à droga de seleção (BSD). Em seguida as amostras de DNA foram submetidas à PCR utilizando iniciadores específicos para o gene *bsd*. Conforme mostrado na Figura 14 , observamos a amplificação de um fragmento de 399 pb, correspondente ao gene *bsd* nas amostras de *Leishmania* transfectadas com os vetores pIR1-BSD (controle) e pIR1-BSD-FeSOD-A, confirmando a eficiência da transfecção.



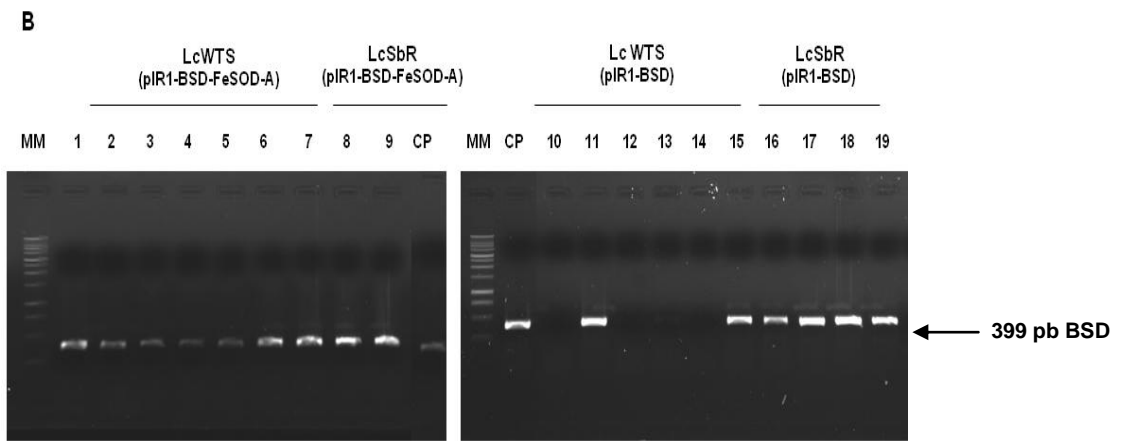


Figura 14: Seleção dos clones transfectados com vetor sem inserto (controle) e com a construção pIR1-BSD-FeSOD-A por PCR das linhagens selvagens e resistentes de *L. (V.) braziliensis* (A) e *L. (L.) infantum chagasi* (B). Gel agarose 1% corado com brometo de etídio mostra o fragmento de 399 pb, indicando a presença do gene que confere resistência à blasticidina. MM: Marcador de massa molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

Os clones de *Leishmania* positivos foram submetidos ao *Western blot* para avaliar o nível de expressão da proteína FeSOD-A nos parasitos transfectados. Nesta análise, 1×10^7 parasitos foram ressuspensos em tampão de amostra, aquecidos a 95°C por 5min e submetidos à eletroforese SDS-PAGE 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal anti-TcFeSOD. Os resultados mostraram que os parasitos selvagens e resistentes ao SbIII das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* transfectados com o gene *fesod-a* mostraram um aumento de 1,5 a 4,0 vezes no nível da proteína FeSOD-A quando comparado com seus respectivos pares não transfectados ou transfectados com o vetor vazio (Figuras 15 e 16). Análises de densitometria de bandas mostraram que os clone 4 e clone 5 de *L. (V.) braziliensis* selvagens apresentaram um aumento de 1,5 e 1,7 vezes, respectivamente, no nível de expressão da proteína FeSOD-A quando comparado ao seu respectivo par não transfectado ou transfectado com o vetor vazio (Figura 15 B). Os clones 1 e 2 de *L. (V.) braziliensis* resistentes ao SbIII mostraram um aumento de 2,5 e 2,7 vezes no nível de expressão da proteína, respectivamente (Figura 15C). Por outro lado, os clones 5 e clone 6 da linhagem selvagem de *L. (L.) infantum chagasi* apresentaram um aumento de 3,0 e 4,0 vezes, respectivamente, e os clones 1 e 3 da linhagem resistente apresentaram um aumento no nível de expressão da proteína de 4,0 e 3,0 vezes, respectivamente (Figura 16). Os clones de parasitos que apresentaram maior expressão da proteína FeSOD-A foram selecionados para teste de atividade enzimática, ensaios de susceptibilidade ao SbIII e avaliação ao estresse oxidativo gerado pelo paraquat.

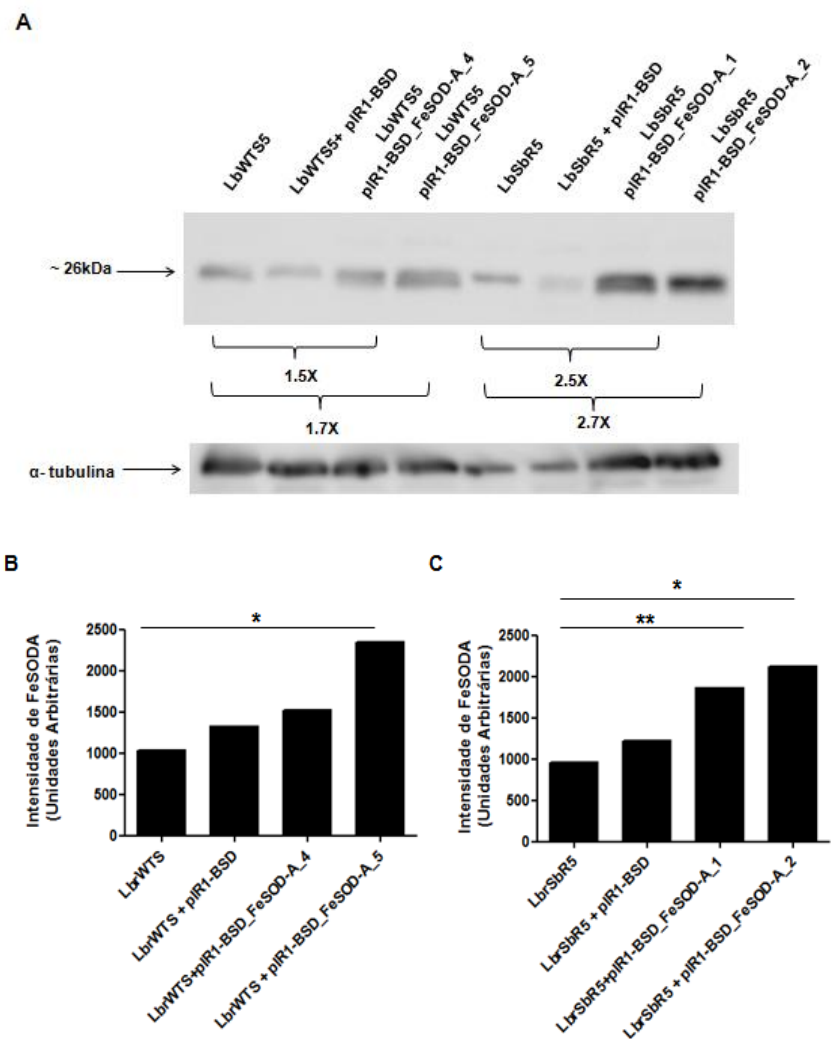


Figura 15: Análise de *Western blot* das linhagens de LbWTS e LbSbR não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e os clones superexpressores. Como controle quantitativo, foi utilizado anticorpo anti- α -tubulina de camundongo (A). Análises de densitometria de bandas mostraram que a proteína está superexpressa nos clones 4 e 5 de LbWTS e nos clones 1 e 2 de LbSbR (B). Gráfico representativo de três experimentos. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,001$.

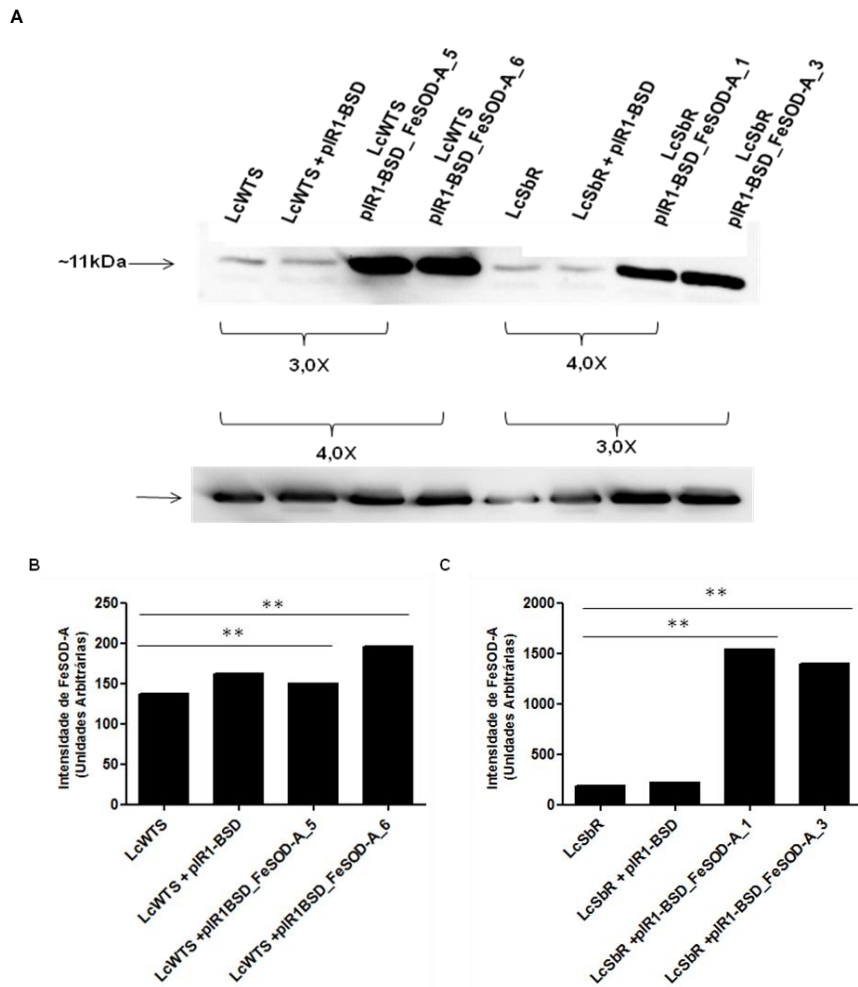


Figura 16: Análise de *Western blot* das linhagens de LcWTS e LcSbR não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e os clones superexpressores. Como controle quantitativo, foi utilizado anticorpo anti- α -tubulina de camundongo (A). Análises de densitometria de bandas mostraram que a proteína está superexpressa nos clones 5 e 6 de LcWTS e nos clones 1 e 2 de LcSbR (B). Gráfico representativo de três experimentos. ** indica $p < 0,001$.

5.1.6 Curva de crescimento dos parasitos transfectados

A interferência da transfecção no crescimento dos parasitos foi avaliada através da determinação do número de parasitos durante período de 6 dias de cultivo. Parasitos não-transfectados, transfectados com o vetor sem inserto e superexpressando a enzima FeSOD-A foram cultivados em 10 mL de meio M199 suplementado em garrafas de cultura de 25 cm³ a 27 °C e, a taxa de crescimento avaliada pela contagem diária do número de parasitos em contador de células Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™) (Figura 17). Os resultados mostraram que todos os parasitos transfectados apresentaram um perfil similar de

crescimento comparado com os controles não-transfectados ou transfectados apenas com o vetor vazio. Entretanto, observamos que os clones 1 e 2 da linhagem resistente de *L. (V.) braziliensis* transfectados com o gene *fesod-a* apresentaram maior número de parasitos que foram mantidos por mais tempo 3 a 6 dias de cultivo, comparado com os controles LbrSbR ou LbrSbR+piR1-BSD, que apresentaram diminuição do número de parasitos após o 3º dia de cultivo (Figura 17B).

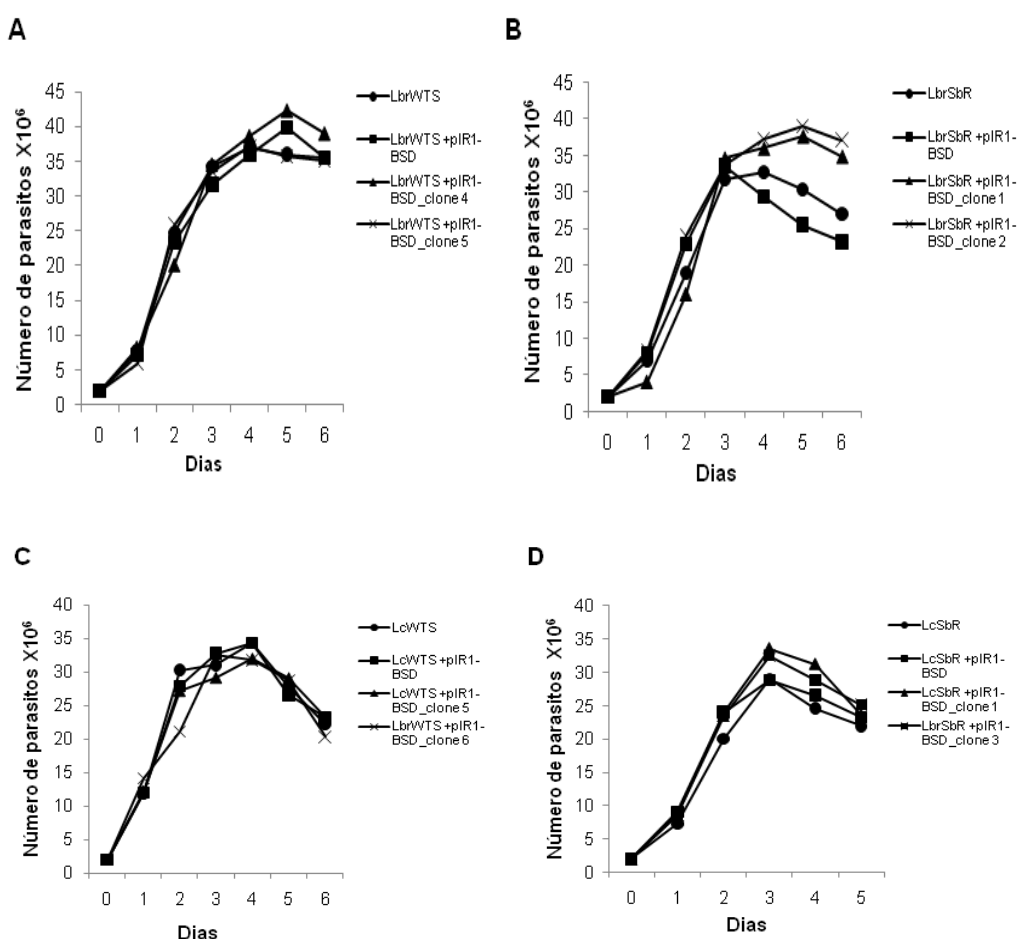


Figura 17: Curva de crescimento dos parasitos não-transfectados, transfectados com o vetor sem inserto e superexpressando a enzima FeSOD-A de *L. (V.) braziliensis* selvagens (A) e resistentes (B) e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens (C) e resistentes ao SbIII (D). Os parasitos foram semeados na densidade inicial de 2×10^6 parasitos/mL. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos $\times 10^6$ / mL.

5.1.7 Atividade enzimática da SOD em linhagens de *Leishmania* spp.

A atividade enzimática da enzima SOD foi avaliada através de um ensaio indireto que consiste em medir a capacidade desta enzima em inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar. Ensaios prévios foram realizados para determinar a concentração da enzima a ser utilizada como controle positivo do ensaio e o tempo de oxidação do pirogalol. A autooxidação do pirogalol nas concentrações de SOD

bovina avaliadas foi linear após 25 $\mu\text{g/mL}$ da enzima (Figura 18). Além disto, observamos que o aumento da absorbância (405nm) usando 200 μL de uma solução de 0,2 mM de pirogalol foi linear até o tempo de 15 min (Figura 19). Diante desses resultados, padronizamos os nossos ensaios utilizando como controle positivo a enzima SOD bovina na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (75 unidades por poço) e a absorbância medida em intervalo de 5 min.

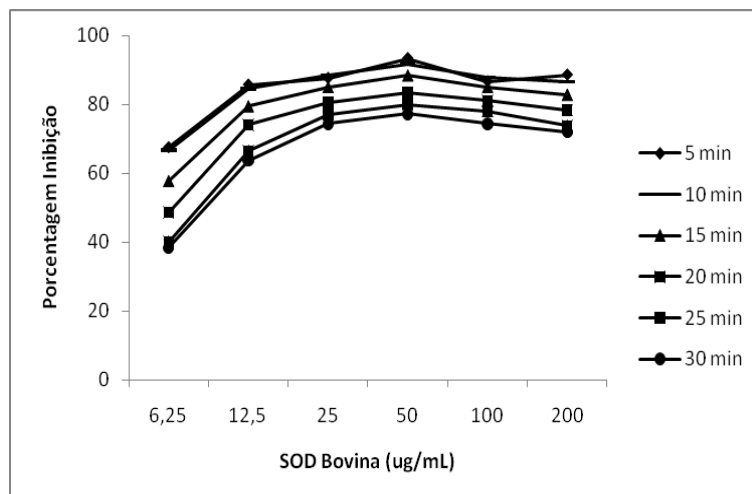


Figura 18: Inibição da autooxidação do pirogalol utilizando a enzima superóxido dismutase bovina (SOD Bovina) como padrão. 0.2 mM pirogalol foi equilibrado em tampão aerado de 50 mM de Tris-ácido cacodílico, pH 8,2 + 1 mM ácido dietileno-triaminopentaacético. A taxa de autooxidação do pirogalol ($A_{405\text{nm}}$) aumenta com o tempo.

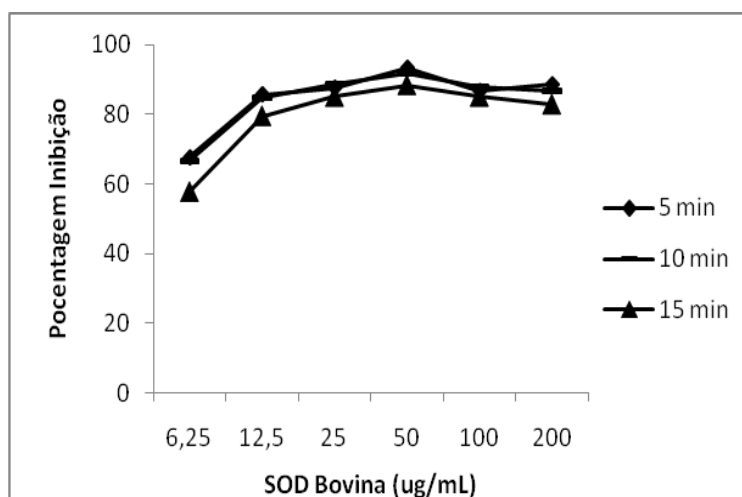


Figura 19: Inibição da autooxidação de várias concentrações de pirogalol medida em 405nm em 5, 10 e 15 min.

Em nossos ensaios observamos que o controle positivo (SOD bovina) inibiu 90% a oxidação do pirogalol. Por outro lado, o controle negativo (água), no qual o pirogalol foi totalmente oxidado, apresentou 0% de inibição da atividade enzimática

(Tabela 4). Comparando as linhagens selvagens e resistentes de uma mesma espécie, observamos que *L. (V.) braziliensis* sensível ao SbIII (LbWTS) apresentou 13 % de atividade da SOD e a resistente LbSbR apresentou uma alta atividade enzimática 70%. Esse mesmo resultado foi observado para *L. (L.) infantum chagasi*, sendo que a linhagem selvagem LcWTS apresentou 1% de atividade e a resistente LcSbR 46% de atividade de SOD. Esses resultados mostram a importância dessa enzima no metabolismo dos parasitos resistentes. Apesar do resultado de *Western blot* ter mostrado que o nível de expressão da enzima ser similar entre as linhagens, observamos uma maior atividade enzimática em ambos pares resistentes de *Leishmania*.

Com relação à superexpressão da enzima FeSOD-A, observamos que os clones 4 e 5 da linhagem selvagem de *L. (V.) braziliensis* que superexpressam a enzima FeSOD-A, apresentaram maior atividade enzimática 83 e 84%, comparado com a linhagem selvagem não-transfectada (13%) ou transfectada com o vetor (10%). É interessante ressaltar que os clones superexpressores da linhagem resistente de *L. (V.) braziliensis* não apresentaram diferenças significativas na atividade enzimática (83 a 86%) quando comparado com os respectivos pares não-transfectados e transfectados com o vetor vazio (60 a 70%). Os parasitos resistentes já apresentam uma alta atividade enzimática e mesmo com a superexpressão dessa enzima os níveis de atividade não aumentaram.

Foram observados resultados semelhantes para a espécie *L. (L.) infantum chagasi*. Clones da linhagem selvagens de LcWTS e LcWTS transfectada com vetor pIR1-BSD apresentaram 1% de atividade. Após transfecção com o gene *fesod-a* os clones 5 e 6 apresentam 13 e 29% de atividade da SOD. Já os clones da linhagem resistente LcSbR 1 e 3 superexpressores de FeSOD-A não apresentaram diferenças significativas de atividade da enzima (62 e 67%) comparado com os controles não-transfectado e transfectado com o vetor pIR1-BSD que apresentam 46 e 51% de atividade, respectivamente.

Tabela 4: Atividade superóxido dismutase (SOD) de extratos protéicos brutos de amostras de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII.

Amostras de <i>Leishmania</i>	Absorbância (405 nm)^a	Atividade SOD (%)^b
<i>L. (V.) braziliensis</i>		
LbWTS	0,031 ± 0,001	13
LbWTS +pIR1-BSD	0,032 ± 0,002	10
LbWTS +pIR1-BSD_FeSOD-A_4	0,003 ± 0,002	83**
LbWTS +pIR1-BSD_FeSOD-A_5	0,002 ± 0,002	84**
LbSbR	0,008 ± 0,001	70
LbSbR +pIR1-BSD	0,005 ± 0,001	60
LbSbR +pIR1-BSD_FeSOD-A_1	0,003 ± 0,001	83
LbSbR +pIR1-BSD_FeSOD-A_2	0,001 ± 0,002	86
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>		
LcWTS	0,040 ± 0,006	1
LcWTS +pIR1-BSD	0,041 ± 0,003	1
LcWTS +pIR1-BSD_FeSOD-A_5	0,031 ± 0,000	13
LcWTS +pIR1-BSD_FeSOD-A_6	0,024 ± 0,005	29
LcSbR	0,017 ± 0,001	46
LcSbR +pIR1-BSD	0,016 ± 0,000	51
LcSbR +pIR1-BSD_FeSOD-A_1	0,011 ± 0,001	62
LcSbR +pIR1-BSD_FeSOD-A_3	0,009 ± 0,003	67
Controles^c		
Positivo	0,004 ± 0,002	90
Negativo	0,041 ± 0,005	0

^a Valor médio da absorbância no tempo 5 minutos subtraído de 0 minutos e o desvio padrão de três experimentos em duplicata.

^b Atividade indireta da SOD (%) foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a auto-oxidação do pirrogalol.

^c Controles: positivo: Enzima SOD bovina purificada (Sigma) 75 Unidades/poço em 200uL de reação; negativo: água

** indica p <0,001 em relação ao LbrWTS.

5.1.8 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente

Análises de susceptibilidade ao SbIII foram realizadas para determinar se a superexpressão do gene FeSOD-A em linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII alteraria o fenótipo de resistência dos parasitos transfectados ao antimonial.

Os parasitos *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII transfectados com o gene *fesod-a*, bem como os não-transfectados e os transfectados com o vetor vazio foram incubados com concentrações crescentes de SbIII. O IC₅₀ foi determinado pela contagem do número de parasitos crescidos na ausência e presença do antimônio trivalente. Nos gráficos

(Figuras 20 e 21), observamos a porcentagem dos parasitos que sobreviveram ao SbIII em relação a diferentes concentrações da droga. Conforme mostrado na Figura 20A, com o aumento das concentrações de SbIII, foi observado um maior declínio na porcentagem de parasitos vivos da linhagem não-transfectada de *L. (V.) braziliensis* (LbWTS) e controle LbWTS-pIR1-BSD comparado com os clones transfectados com FeSOD-A (LbWTS+pIR1-BSD-FeSOD) clones 4 e 5 que foram mais resistentes. Análise estatística mostrou uma diferença significativa ($p < 0,001$ a $p < 0,05$) nas concentrações 0,045; 0,05; 0,075 e 0,1 mg/mL de SbIII quando comparado o não-transfectado e os clones 4 e 5 de *L. (V.) braziliensis* transfectados com FeSOD-A. O IC_{50} da população não-transfectada selvagem LbWTS para o SbIII foi 0,043 mg/mL, por outro lado o IC_{50} do clone 4 foi 0,060 mg/mL e do clone 5 foi 0,074 mg/mL de SbIII. De acordo com estes dados, podemos concluir que a superexpressão do gene FeSOD-A na linhagem *L. (V.) braziliensis* selvagem alterou o fenótipo de sensibilidade ao SbIII, aumentando 1,4 e 1,7 vezes a resistência dos clones 4 e 5, respectivamente, ao SbIII, quando comparado à linhagem não-transfectada.

Não foi possível calcular o valor de IC_{50} para a linhagem *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII não-transfectada (LbSbR). Em nosso ensaio utilizando concentração de droga de 1,5 mg/mL a média de sobrevivência dos parasitos foi de 65%. Não é viável utilizar concentrações de SbIII maiores, pois a droga precipita no meio de cultura. Assim, para as análises foi considerado para a linhagem LbSbR o valor de IC_{50} de 2,0 mg/mL, valor encontrado por Liarte & Murta (2010). O clone 1 apresentou valor de IC_{50} de 1,35 mg/mL, ou seja, uma resistência 1,5 vezes menor que apresentado pelo parasito não-transfecatado. O clone 2 apresentou valor de IC_{50} igual à LbSbR (Figura 20B).

Para *L. (L.) infantum chagasi* selvagem a superexpressão desse gene aumentou o fenótipo de resistência dos clones transfectados ao antimonial. Os valores de IC_{50} para os clones LcWTS+pIR1-BSD-FeSOD-A 5 e 6 foi 0,174 e 0,152 mg/ml de SbIII sendo em 1,6 e 1,4 vezes maior do que aquele apresentado pela linhagem não-transfecatada LcWTS (0,108 mg/mL) (Figura 21A).

Não foi possível calcular o valor de IC_{50} para a linhagem *L. (L.) infantum chagasi* resistente ao SbIII não-transfectada (LcSbR), pois utilizando concentração de droga de 2 mg/mL a média de sobrevivência dos parasitos foi de 95%. Esse valor de IC_{50} foi maior do que aquele encontrado por Liarte & Murta (2010) que foi 1,0 mg/mL. Esse resultado é devido ao aumento do índice de resistência ao SbIII dos parasitos que foram mantidos por mais tempo na presença de droga. Os parasitos

resistentes ao SbIII superexpressando o gene FeSOD-A não apresentaram diferenças significativas no fenótipo de resistência quando comparado com a linhagem não-transfectada (Figura 20B).

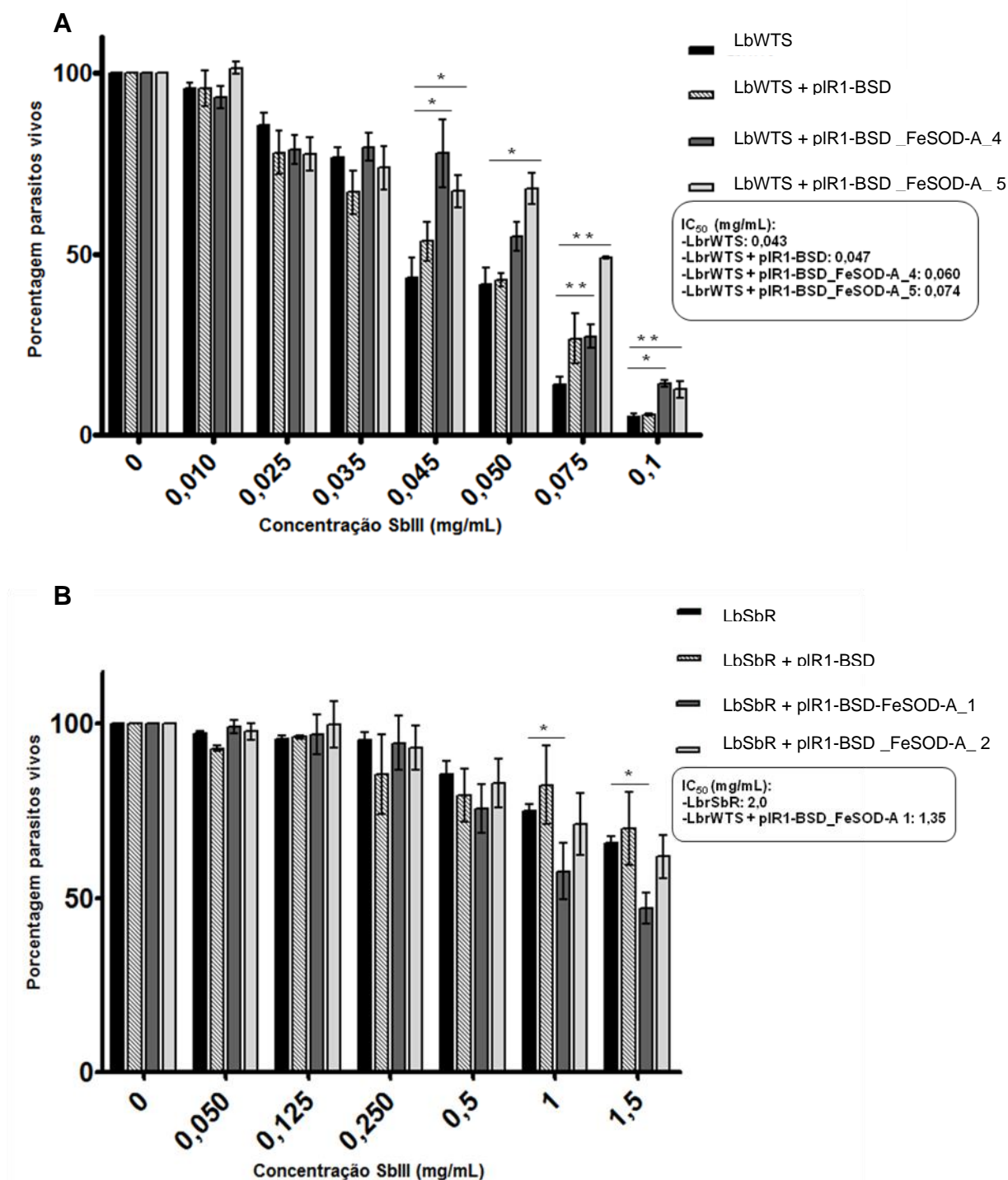
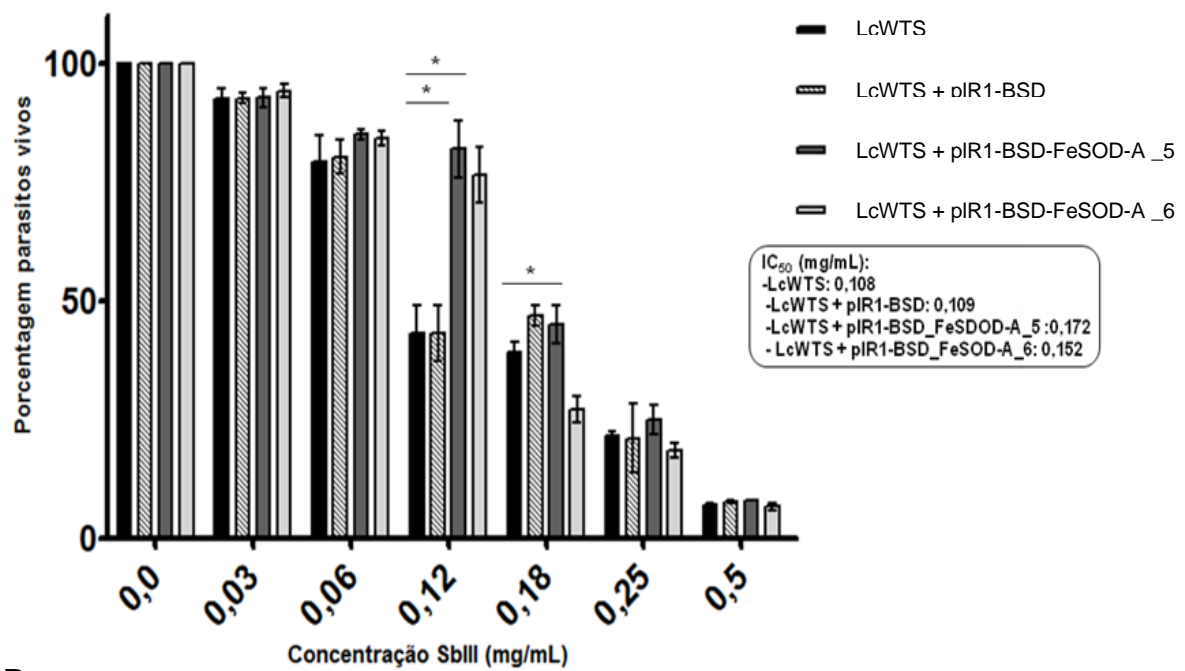


Figura 20: Teste de susceptibilidade in vitro ao SbIII em linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens (A) e *L. (V.) braziliensis* resistentes ao SbIII (B), não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e transfectadas com a construção pIR1-BSD-FeSOD-A. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,001$.

A



B

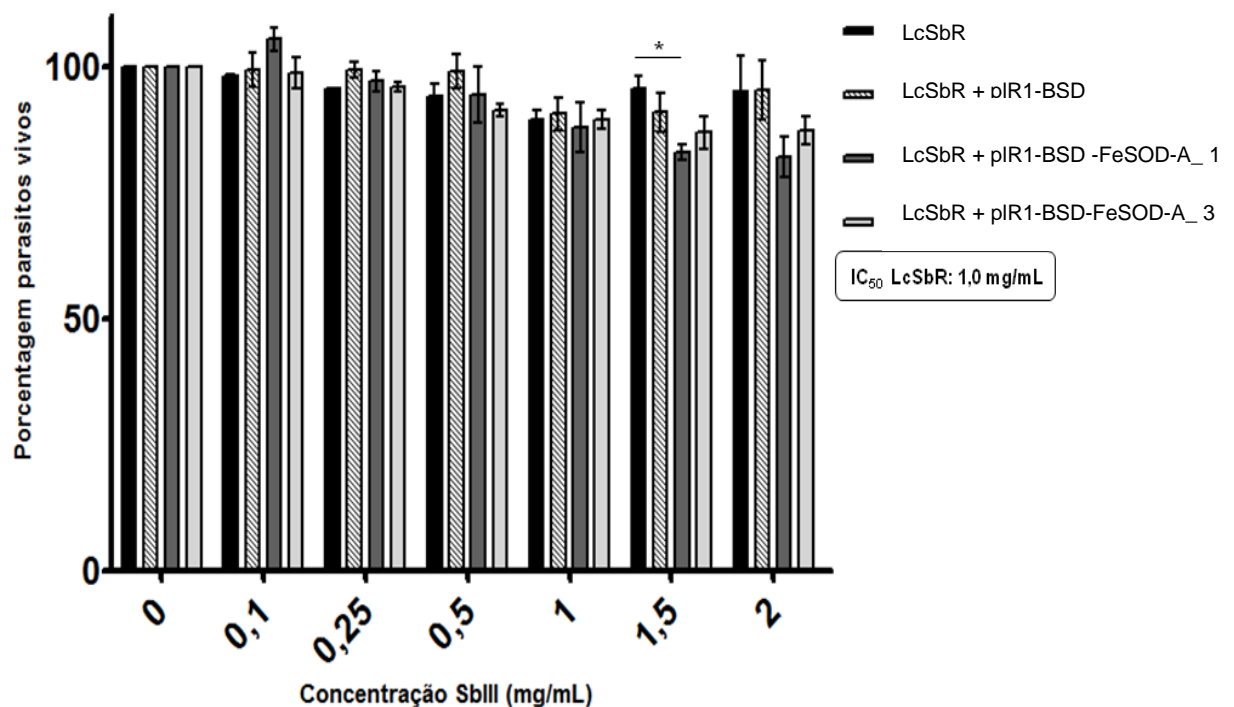


Figura 21: Teste de susceptibilidade in vitro ao SbIII em linhagens de *L. (L.) infantum chagasi* selvagens (A) e *L. (L.) infantum chagasi* resistentes ao SbIII (B) não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e transfectadas com a construção pIR1-BSD-FeSOD-A. * indica $p < 0,05$.

5.1.9 Efeito da superexpressão de FeSOD-A na susceptibilidade de linhagens de *Leishmania* spp. ao paraquat

O efeito da superexpressão da enzima FeSOD-A na proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo reagente paraquat foi avaliado. Nesse ensaio formas promastigotas dos clones não-transfectados e transfectados foram submetidos a concentrações crescentes do agente indutor de espécies reativas de oxigênio (ROs). O clone 5 da linhagem selvagem de *L. (V.) braziliensis* apresentou proteção 1,5 vezes maior quando comparado ao parasito não-transfectado e ao controle transfectado com o vetor sem o inserto. Análise estatística mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações 4 e 6 mM quando comparado ao parasito não-transfectado (LbWTS) (Figura 22A). Entretanto, o clone 2 de *L. (V.) braziliensis* resistente e os clones 5 e 3 de *L. (L.) infantum chagasi* selvagem e resistente ao SbIII, respectivamente, superexpressando a enzima FeSOD-A não apresentaram aumento na proteção contra o estresse oxidativo quando comparado com os respectivos pares não-transfectados e transfectados com o vetor vazio.

É importante salientar que analisando os parasitos não-transfectados da linhagem resistente de *L. (V.) braziliensis* (LbSbR) observamos que os mesmos apresentaram uma maior proteção contra o estresse oxidativo produzido pelos ROs, comparado com a linhagem selvagem dessa espécie (LbWTS). Em *L. (V.) braziliensis* a porcentagem de parasitos vivos da linhagem selvagem foi de 45% na concentração de 4 mM, enquanto na resistente foi 80% (Figura 22A e B). O mesmo foi observado quando analisamos os parasitos selvagens e resistentes de *L. (L.) infantum chagasi*. Na concentração 2mM, a porcentagem de parasitos vivos foi 77% para a linhagem selvagem e 100% para a resistente (Figura 22C e D).

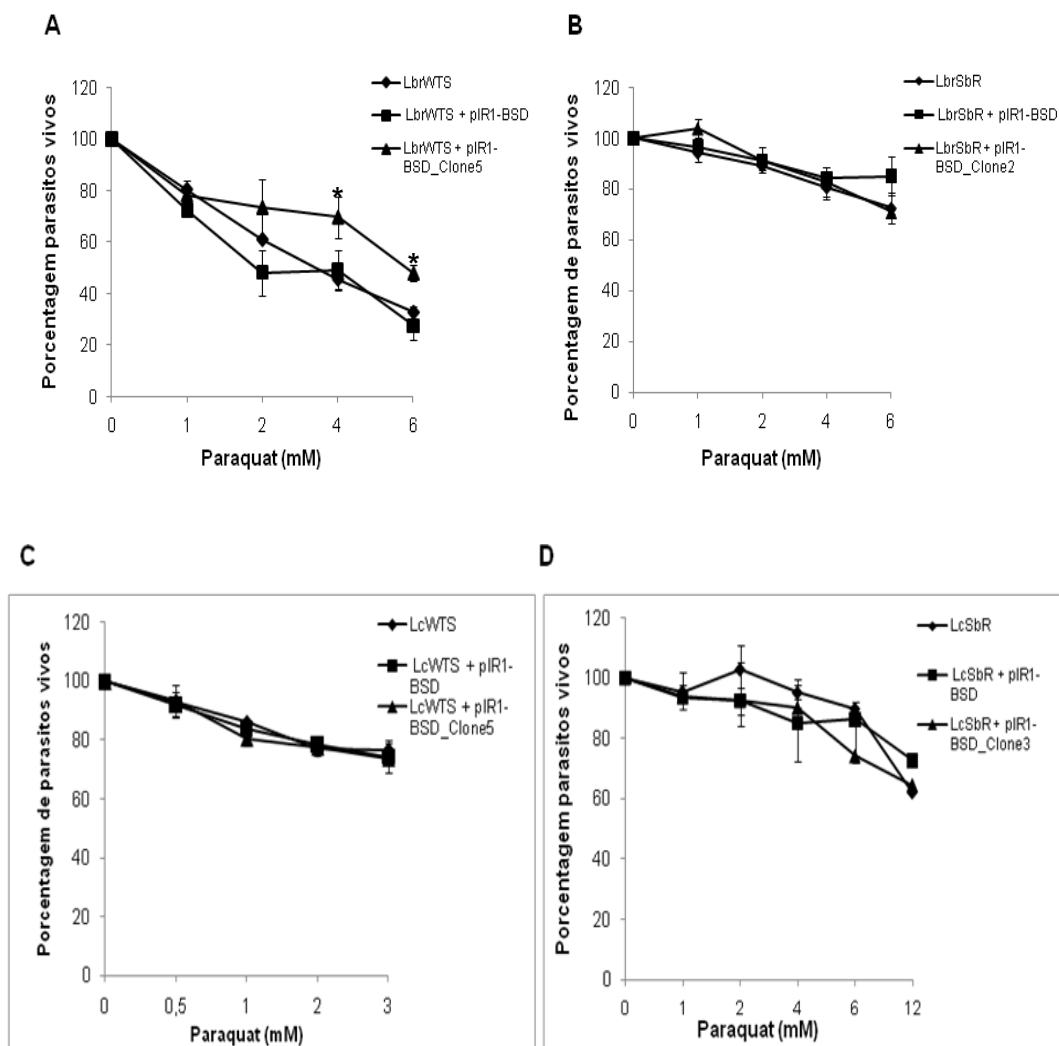


Figura 22: Efeito do paraquat em linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens (A) e resistentes (B) e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens (C) e resistentes ao SbIII (D). Parasitos não-transfectados, transfectados com o vetor sem inserto e transfectados com a construção pIR1-BSD_FeSODA foram semeados na densidade de 2×10^6 formas promastigotas/poço em placa de 24 poços e tratados com quantidades crescentes de paraquat como indicado nos gráficos. O crescimento foi monitorado por 4 e 3 dias para os parasitos selvagens e resistentes ao SbIII, respectivamente. * indica $p < 0,05$.

Resumo dos resultados encontrados nos experimentos com a enzima FeSOD-A em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Resumo dos resultados dos ensaios de RT-qPCR, *Western blot* e atividade enzimática em linhagens de *Leishmania* spp.

ENSAIOS	<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>
RT-qPCR	3,6 X LgSbR ↓	S	S	S
<i>Western blot</i>	2,0 X LgSbR ↑	3,0 LaSbR ↓	S	S
Atividade Enzimática	ND	ND	LbSbR ↑	LcSbR ↑
Tolerância ao Paraquat	ND	ND	LbSbR ↑	LcSbR ↑

S – perfil semelhante: Não apresentou diferença no nível de expressão quando os pares das linhagens selvagens e resistentes de cada espécie foram comparados.

ND- Não Determinado

Tabela 6: Resumo dos resultados de transfecção da enzima FeSOD-A, atividade da enzima e ensaios de susceptibilidade ao SbIII das linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII.

Linhagens de <i>Leishmania</i> spp.	<i>Western blot</i> (superexpressão FeSOD-A)	IC ₅₀ (mg/mL) SbIII	Susceptibilidade ao SbIII*	Atividade SOD (%)
LbWTS		0,043		13
LbWTS +PIR1-BSD		0,047		10
LbWTS +PIR1-BSD_FeSOD-A_4	1,5X	0,060	1,4X mais resistente	83**
LbWTS +PIR1-BSD_FeSOD-A_5	1,7X	0,074	1,7X mais resistente	84**
LbSbr		2,0		70
LbSbr +PIR1-BSD		2,0		60
LbSbr +PIR1-BSD_FeSOD-A_1	2,5X	1,35	1,5X mais sensível	83
LbSbr +PIR1-BSD_FeSOD-A_2	2,7X	>1,5	Sem alteração do fenótipo	86
LcWTS		0,108		1
LcWTS +PIR1-BSD		0,109		1
LcWTS +PIR1-BSD_FeSOD-A_5	3,0X	0,172	1,6X mais resistente	13
LWTS +PIR1-BSD_FeSOD-A_6	4,0X	0,152	1,4X mais resistente	29
LcSbr		>2,0		46
LcSbr +PIR1-BSD		>2,0		51
LcSbr +PIR1-BSD_FeSOD-A_1	4,0X	>2,0	Sem alteração do fenótipo	62
LcSbr +PIR1-BSD_FeSOD-A_3	3,0X	>2,0	Sem alteração do fenótipo	67

* Susceptibilidade ao SbIII - comparação entre clones transfectados e não-transfectados.

5.2 Proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11

5.2.1 Análise da região codificadora do gene *kmp-11* de *L. (V.) braziliensis*

A região codificadora (CDS) do gene *kmp-11* foi amplificada com os iniciadores descritos no item 4.5 e como molde para reação de PCR foi utilizado o DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* selvagem. O fragmento amplificado de 279 pb foi clonado no vetor pGEM[®]- T Easy e submetido à reação de sequenciamento. O gene *kmp-11* possui três cópias no genoma *L. (V.) braziliensis* e está localizado no cromossomo 34. O alinhamento dessas sequências de nucleotídeos depositadas no NCBI e da CDS do gene *kmp-11* clonada em nosso laboratório mostrou que as sequências são bem conservadas (Anexo VI). Análises de busca por identidade de sequência foram feitas utilizando o programa *Blast*. A CDS apresentou 97% de identidade quando alinhada com sequência de nucleotídeos de *L. (V.) braziliensis* (número de acesso no GenBank XM_001568274.1). A sequência de aminoácido do KMP-11 de *L. (V.) braziliensis* apresentou 97% de identidade quando alinhada à sequência de *L. (V.) braziliensis* (número de acesso XP_001568323.1), com substituição de três resíduos de aminoácidos nas posições 9, 21 e 75 (Anexo VII).

5.2.2 Organização do gene *kmp-11* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII

A organização do gene *kmp-11* nas linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII foi analisada pela técnica de *Southern blot*. O DNA das amostras de *Leishmania* spp. foi digerido com *EcoRI* e *Sall*, e os fragmentos separados em gel de agarose 1% foram transferidos para membrana de náilon e, então hibridizados com a sonda de 279 pb específica do gene *kmp-11* marcada com [³²P].

No *Southern blot* utilizando *EcoRI*, cuja região codificadora do gene *kmp-11* não possui sítio de restrição para a enzima, a sonda reconheceu uma banda única maior que 12 Kb em todas as amostras analisadas. Por outro lado, *Southern blot* utilizando a enzima *Sall*, mostrou semelhante perfil de hibridização entre as diferentes espécies analisadas, com exceção da linhagem sensível de *L. (V.) guyanensis* que apresentou um perfil de fragmentos diferentes (Figura 23).

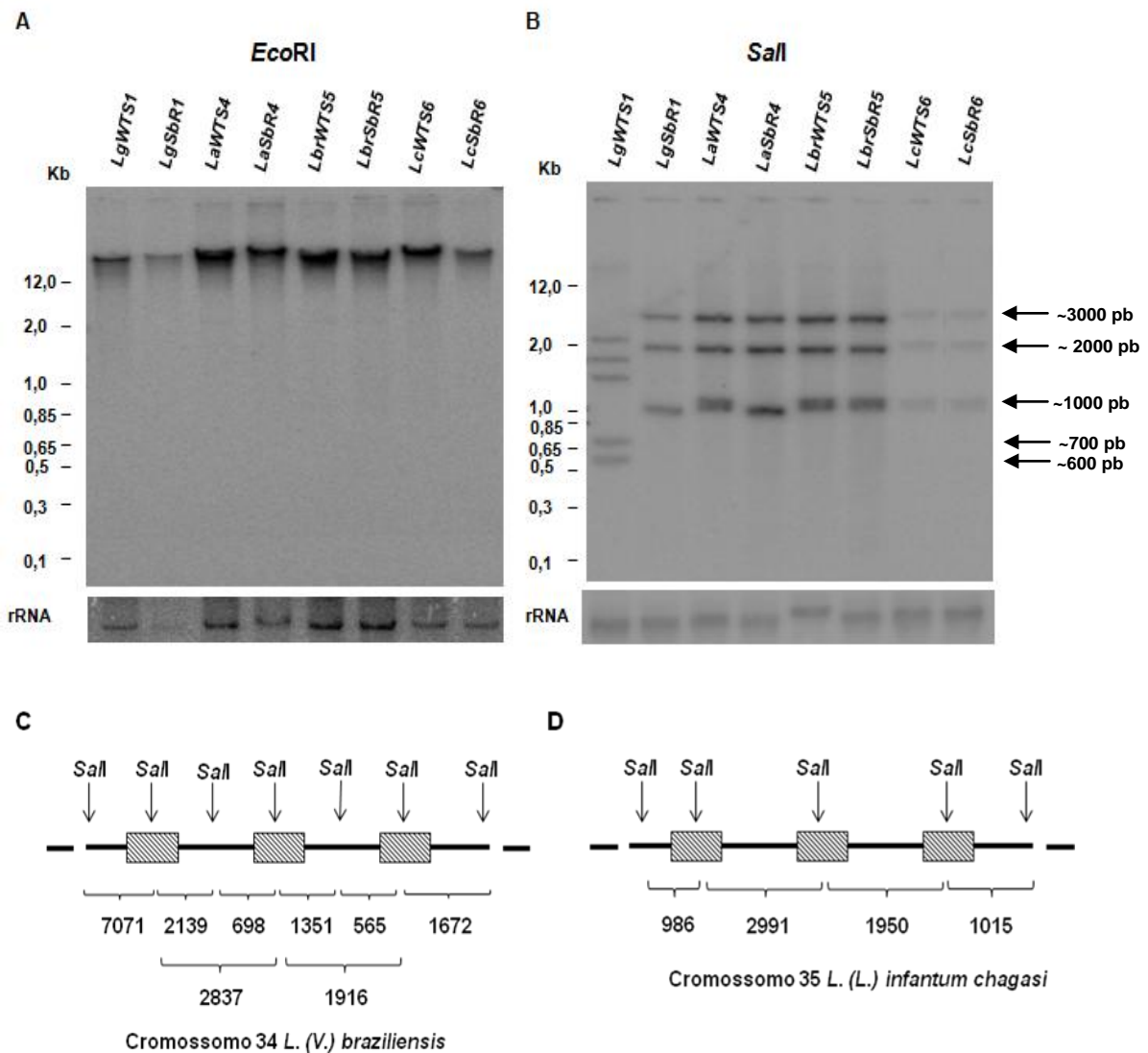


Figura 23: Análise de Southern blot do gene *kmp-11* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII. Amostras de DNA genômico foram digeridas com *EcoRI* (A) ou *SalI* (B), e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e hibridizado com sonda específica KMP-11 marcado [³²P]. Como controle quantitativo, as membranas foram incubadas com a sonda do gene RNA ribossomal (24S alfa) de *Leishmania*. Esquema representativo da digestão *in silico* do DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* (C) e *L. (L.) infantum chagasi* (D) com *SalI*. Abreviações indicam: *L. (V.) guyanensis* selvagem (LgWTS1) e resistente (LgSbR1); *L. (L.) amazonensis* selvagem (LaWTS4) e resistente (LaSbR4); *L. (V.) braziliensis* selvagem (LbWTS5) e resistente (LbSbR5); *L. (L.) infantum chagasi* selvagem (LcWTS6) e resistente (LcSbR6).

No *Southern blot* utilizando a enzima *SalI*, a sonda específica do gene *kmp-11* reconheceu fragmentos de aproximadamente 3000, 2000 e 1000/1100 pb para todas as amostras analisadas, com exceção de LgWTS. Além disto, observamos uma pequena diferença no tamanho do fragmento menor, uma vez que as amostras LgSbR e LaSbR apresentaram fragmento de 1000pb e as outras amostras LaWTS, LbrWTS, LbrSbR, LcWTS e LcSbR mostraram fragmento de 1100 pb. Por outro lado, a linhagem sensível de *L. (V.) guyanensis* apresentou fragmentos de 560 pb, 700 pb, 1350 pb, 1670 pb e 2100 pb. Como controle quantitativo, a mesma membrana foi

hibridizada com a sonda correspondente à subunidade 24S alfa do gene do RNA ribossomal de *Leishmania* (Figura 23B).

A digestão *in silico* da sequência de nucleotídeos do cromossomo 34 de *L. (V.) braziliensis* (número de acesso NC_009326.1) com *SaI* gerou fragmentos principais de aproximadamente 565 pb, 698 pb, 1351 pb, 1672 pb, 2139 pb e 7071 pb e fragmentos alternativos de aproximadamente 1916 pb e 2837 pb, utilizando diferentes combinações de sítios de clivagem (Figura 21C). Por outro lado, a digestão *in silico* do cromossomo 35 de *L. (L.) infantum chagasi* (número de acesso NC_009419.1) com essa enzima apresentou os fragmentos de 986 pb, 1015 pb, 1950 pb e 2991 pb. Os dados da análise *in silico* correspondem aos resultados obtidos no *Southern blot* (Figura 23D).

5.2.3 Nível de mRNA em *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII

O nível de mRNA nas linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao SbIII foi analisado por *Northern blot* e PCR quantitativo em tempo real. *Northern blot* contendo as diferentes amostras de *Leishmania* e hibridizado com sonda específica do gene *kmp-11* revelou a presença de dois transcritos de aproximadamente 1,0 Kb e 3,0 Kb em todas as linhagens de *Leishmania* spp. analisadas, com exceção da linhagem sensível de *L. (V.) guyanensis* que apresentou apenas um transcrito de 1,0 Kb. Como controle quantitativo, a mesma membrana foi hibridizada com a sonda correspondente à subunidade 24S alfa do gene do RNA ribossomal de *Leishmania* (Figura 24).

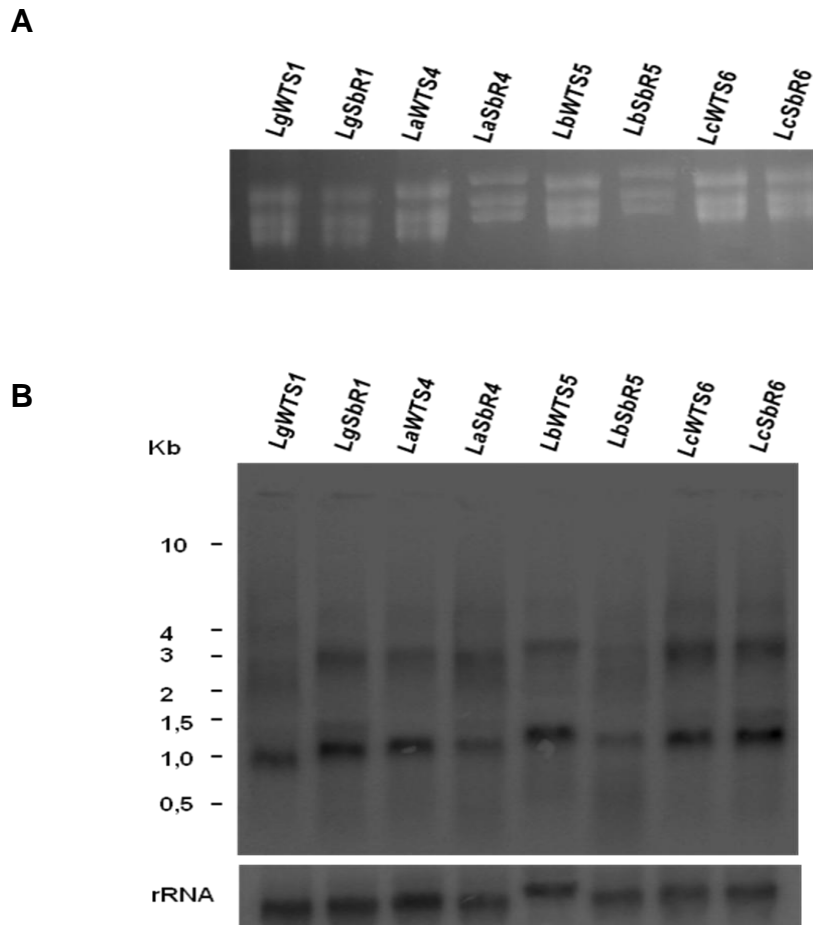


Figura 24: Análise de Northern blot da expressão do gene *kmp-11* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII. (A) A integridade do RNA total foi analisado em gel de agarose 1,2 %. (B) RNA total (10 µg) foi separado por eletroforese e a membrana hibridizada com sonda específica KMP-11 marcado com [³²P]. Como controle quantitativo, a membrana foi incubada com a sonda do gene RNA ribossomal (subunidade 24 S alfa) de *Leishmania*. Abreviações indicam: *L. (V.) guyanensis* selvagem (LgWTS1) e resistente (LgSbR1); *L. (L.) amazonensis* selvagem (LaWTS4) e resistente (LaSbR4); *L. (V.) braziliensis* selvagem (LbWTS5) e resistente (LbSbR5); *L. (L.) infantum chagasi* selvagem (LcWTS6) e resistente (LcSbR6).

O nível de mRNA nas linhagens de *Leishmania* spp. foi quantificado por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Conforme descrito no item 5.1.3, a quantidade de RNA total nas diferentes amostras foi normalizada utilizando o gene constitutivo da subunidade menor do RNA ribossomal (18S SSU rRNA) do parasito. Para os experimentos foram utilizados duas réplicas biológicas de cDNA e cada ensaio foi realizado em triplicada.

As curvas padrão mostraram boa linearidade para a faixa de concentração dos plasmídeos utilizados. Os coeficiente de regressão linear da reta para as curvas padrão dos genes SSU rRNA e *kmp-11* foram 0,999 e 0,995, e os valores de *slope* -3,12 e -3,14, respectivamente (Figura 25A e B).

As curvas de dissociação para os produtos amplificados com os iniciadores específicos dos genes de SSU rRNA e *kmp-11* mostram apenas um pico de dissociação, indicando que um único produto gênico foi amplificado pela reação de PCR (Figura 25C e D).

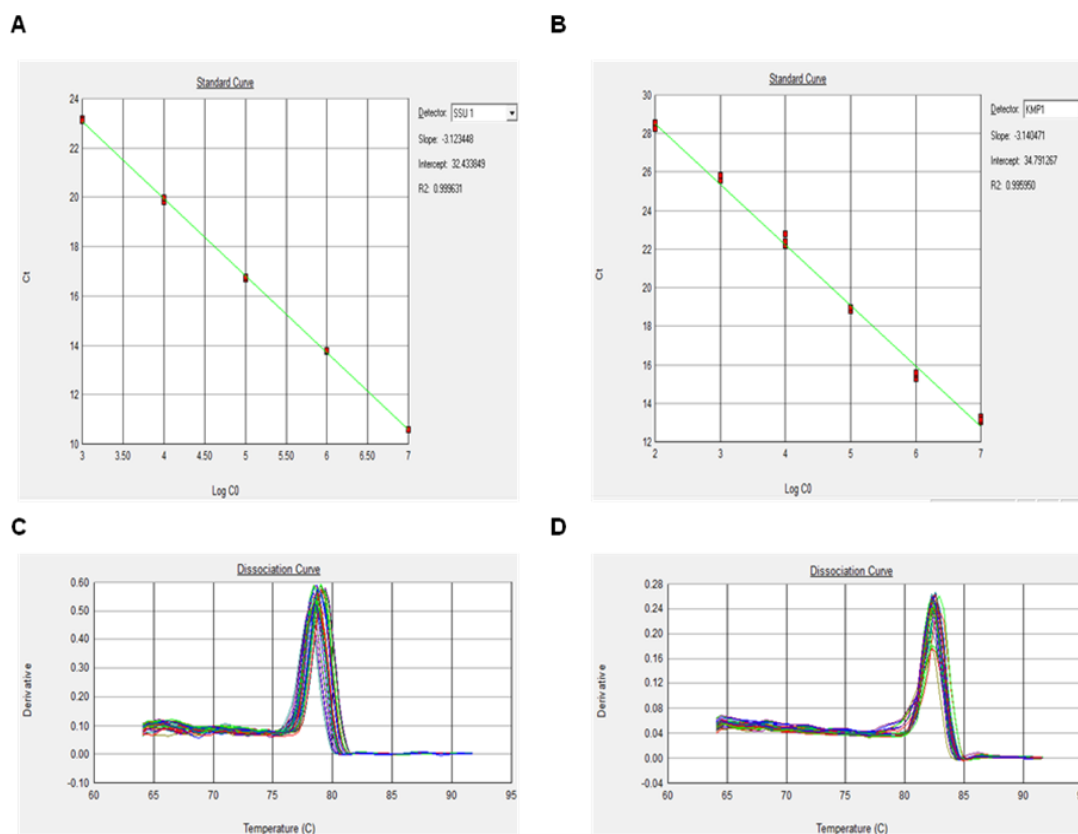


Figura 25: Quantificação do nível de mRNA do gene *kmp-11* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII por RT-qPCR. Curvas padrão dos plasmídeos recombinantes, em diluição seriada, dos genes SSU rRNA (A) e *kmp-11* (B). (C) e (D) curvas de dissociação do produto amplificado dos genes SSU rRNA e *kmp-11*, respectivamente.

Os resultados de RT-qPCR mostraram uma diminuição de 2,9 vezes no nível de mRNA do gene *kmp-11* na linhagem resistente de *L. (V.) braziliensis* e um aumento de 1,5 vezes na linhagem resistente de *L. (L.) infantum chagasi*, quando comparado com seus respectivos pares selvagens (Figura 26). Por outro lado, não foi observado alteração na expressão do mRNA entre os pares selvagens e resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*.

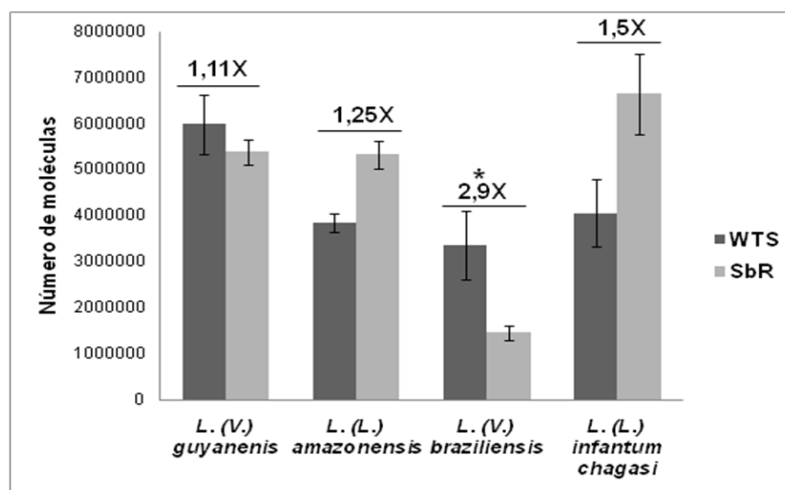


Figura 26: Quantificação da expressão do gene *kmp-11* em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII por RT-qPCR. Os dados foram obtidos de três ou mais experimentos provenientes de duas réplicas biológicas. * indica $p < 0,05$.

5.2.4 Clonagem e expressão da proteína recombinante KMP-11

Para os estudos dos níveis de expressão da proteína KMP-11 nas linhagens selvagens e resistentes de *Leishmania*, a região codificadora do gene *kmp-11* foi clonada no vetor de expressão pQE-31 previamente digerido com enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII*. Células *E. coli* cepa TOP 10F' foram transformadas com o plasmídeo recombinante e a clonagem confirmada por PCR.

Os clones transformados com o plasmídeo recombinante foram selecionados utilizando PCR e induzidos com 1 mM de IPTG por 6 h e 24 h para expressão da proteína recombinante KMP-11. Posteriormente, o clone que apresentou maior expressão da proteína recombinante foi selecionado e a expressão da proteína avaliada em diferentes concentrações do agente indutor IPTG (0,5; 1,0 e 1,5mM) com diferentes tempos de indução. Os extratos protéicos foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 15% e observamos um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 12 kDa. Esse polipeptídeo corresponde à proteína recombinante KMP-11 ligada a um peptídeo de 6 histidinas na sua porção amino-terminal (Figura 27). Podemos observar na canaleta 1 que a proteína recombinante não foi expressa na ausência de IPTG.

A expressão da proteína recombinante KMP-11 não apresentou alteração quanto às concentrações de IPTG utilizadas e aos tempos de indução avaliados. Para as demais etapas de produção da proteína recombinante, foram utilizados concentração de 1mM de IPTG e tempo de indução de 6 h.

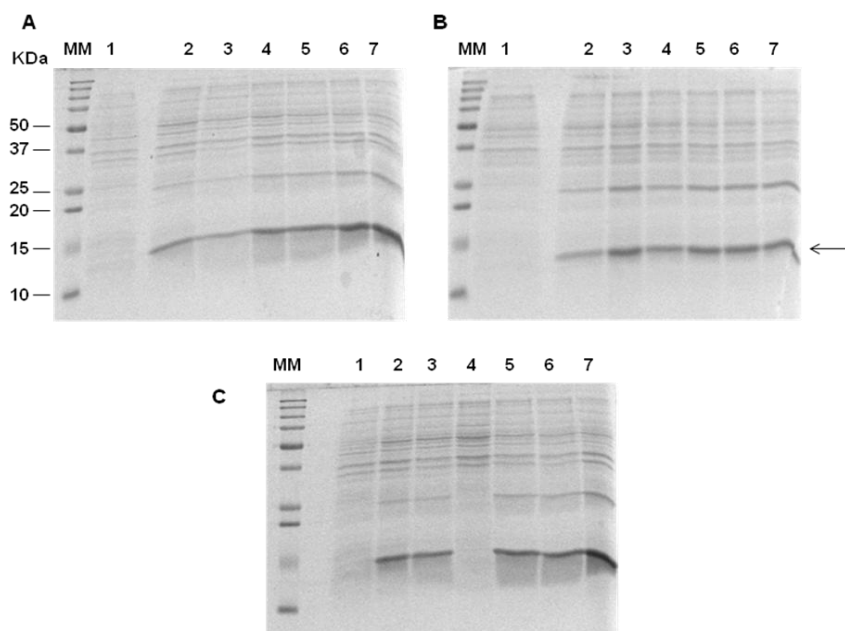


Figura 27: Indução da expressão da proteína recombinante KMP-11 em células M15 [pREP4]. Foram avaliadas três concentrações de IPTG 0,5 mM (A) ; 1,0 mM (B) e 1,5 mM (C) até 6 h de indução (2 a 7). Como controle da expressão da proteína recombinante, 1 mL do meio de cultura foi coletado imediatamente antes da indução com IPTG (1). SDS-PAGE a 15% corado com Coomassie blue R-250. MM: Marcador de massa molecular *Precision Plus Protein Standards*.

5.2.5 Caracterização da proteína recombinante KMP-11

5.2.5.1 Teste de solubilidade e purificação da proteína recombinante

Após determinar as melhores condições para expressão da proteína recombinante, foi realizado um ensaio para verificar a solubilidade da proteína KMP-11. Uma cultura foi induzida com IPTG 1,0 mM por um período de 6 h e, em seguida centrifugada e, o sedimento ressuspendido em tampão de lise. A extração protéica foi realizada conforme descrito no item 4.16.3. As proteínas do sobrenadante (fração solúvel) e do sedimento (fração insolúvel) foram separadas em gel SDS-PAGE a 15%. O perfil eletroforético apresentou uma banda forte de aproximadamente 12 kDa no sobrenadante, mostrando que a proteína é solúvel nas condições utilizadas na expressão.

A proteína recombinante KMP-11 está associada a uma cauda de seis histidinas. A purificação foi realizada utilizando resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni^{2+} -NTA). A proteína foi eluída em cinco frações com tampão de eluição contendo 250 mM de imidazol. Na concentração utilizada, o imidazol compete com a cauda de histidinas associado à proteína recombinante pelo sítio de ligação na resina Ni^{2+} -NTA, assim a proteína recombinante se desliga da resina e é eluída. As frações coletadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE a 15%. Como

podemos observar na Figura 28, a proteína recombinante foi eluída da resina com alta eficiência nas frações 2 a 5 (canaletas 6 a 9).

Após a purificação, a proteína recombinante foi quantificada pelo método de Bradford e apresentou concentração de 14,72 µg/µL.

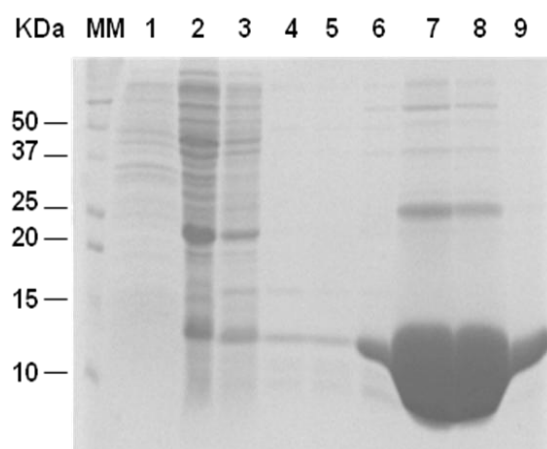


Figura 28: Purificação da proteína recombinante KMP-11 em resina Ni²⁺-NTA. SDS- PAGE 15% corado com Coomassie blue R-250. Canaleta 1: alíquota coletada imediatamente antes da indução com IPTG (controle da expressão). Canaleta 2: alíquota coletada após o empacotamento da coluna com a resina associada à cauda 6 histidinas; Canaletas 3 e 4: alíquotas coletadas após a lavagem da coluna com tampão de lavagem; Canaletas 5 a 9 : eluato das frações 1 a 5 após adição do tampão de eluição. MM: Marcador de massa molecular *Precision Plus Protein Standards*.

A proteína recombinante KMP-11 foi inoculada em coelhos para a produção de anticorpos policlonais contra esta proteína. Os anticorpos policlonais anti-KMP-11 foram utilizados em ensaios de *Western blot* para determinar o nível de expressão dessa proteína nas linhagens selvagens e resistentes de *Leishmania* spp.

Ensaio de *Western blot* foram realizados utilizando proteínas totais das linhagens selvagem e resistente de *L. (V.) braziliensis*. As membranas foram incubadas com o anticorpo diluído 1:1000 e 1:5000. Como podemos observar na Figura 29, o anticorpo anti-KMP-11 reconheceu com alta especificidade um polipeptídeo de aproximadamente 11 kDa, tamanho estimado da proteína KMP-11.

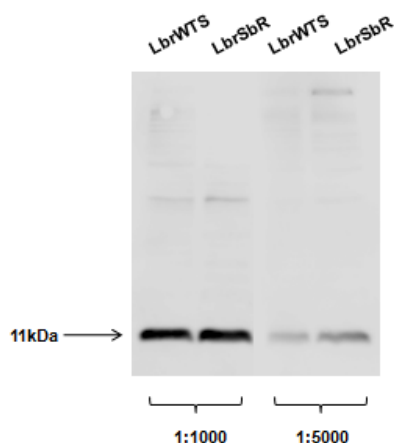


Figura 29: Western blot usando o anticorpo policlonal de coelho contra a proteína recombinante KMP-11. A especificidade do anticorpo foi avaliada nas amostras de LbWTS e LbSbR em duas diluições 1:1000 e 1:5000.

5.2.6 Expressão da proteína KMP-11 em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII

A expressão da proteína KMP-11 em linhagens de *Leishmania* spp. foi avaliada por *Western blot* utilizando o anticorpo policlonal produzido contra a proteína recombinante KMP-11 de *L. (V.) braziliensis* (anti-KMP-11). *Western blot* das proteínas totais de *Leishmania* (40 µg) incubado com o anticorpo anti-KMP-11, mostrou que esse anticorpo reconheceu um polipeptídeo de 11 kDa em todas as linhagens de *Leishmania* spp. analisadas (Figura 30A). Como controle quantitativo, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti- α -tubulina de camundongo.

Análises de densitometria das bandas de KMP-11 comparado com o normalizador α -tubulina mostraram que a proteína KMP-11 está 2,0 menos expressa na linhagem resistente de *L. (V.) braziliensis* e 1,5 vezes mais expressa na linhagem resistente de *L. (L.) infantum chagasi* quando comparado aos respectivos pares. Não foram observadas diferenças no nível de expressão da proteína entre os pares selvagens e resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Figura 30B).

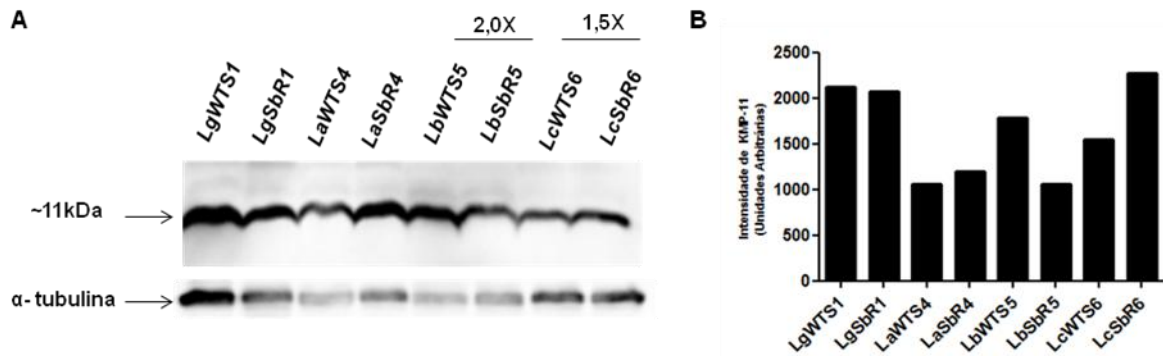


Figura 30: Expressão da proteína KMP-11 em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII. (A) *Western blot* utilizando anticorpo policlonal anti-KMP-11. Como controle quantitativo, foi utilizado o anticorpo anti- α -tubulina de camundongo. (B) Análise de densitometria das bandas de KMP-11 em linhagens de *Leishmania* selvagens (WTS) e resistentes (SbR) ao SbIII. Gráfico representativo de três experimentos.

5.2.7 Transfecção da construção pIR1-BSD-KMP-11 em linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII

A região codificadora do gene *kmp-11* de LbWTS foi clonada em vetor pGEM[®]-T Easy e o plasmídeo sequenciado para confirmar a correta sequência do gene. Posteriormente, o plasmídeo foi digerido com a endonuclease de restrição *Bgl*I e, o fragmento liberado foi subclonado no vetor de expressão pIR1-BSD. Com o objetivo de confirmar a correta orientação do inserto no vetor, foi realizada análise *in silico* do fragmento clonado no vetor pIR1-BSD usando o programa Clone Manager (Figura 31). Após a análise, foi selecionado a enzima de restrição *Sma*I. O inserto clonado na orientação correta “senso” quando digerido com a enzima *Sma*I apresentou um padrão digestão com fragmentos de 1635 pb e 7005 pb e na orientação “antisenso” fragmentos de 1371 pb e 7269 pb (Figura 29A e B). A Figura 32 mostra um gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com dois clones que apresentaram o inserto na direção senso. O clone 1 contendo a construção na orientação correta “senso” foi selecionado. Posteriormente, o plasmídeo recombinante e o vetor pIR1-BSD foram digeridos com a enzima *Sma*I e as construções lineares transfectadas por eletroporação nas linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII.

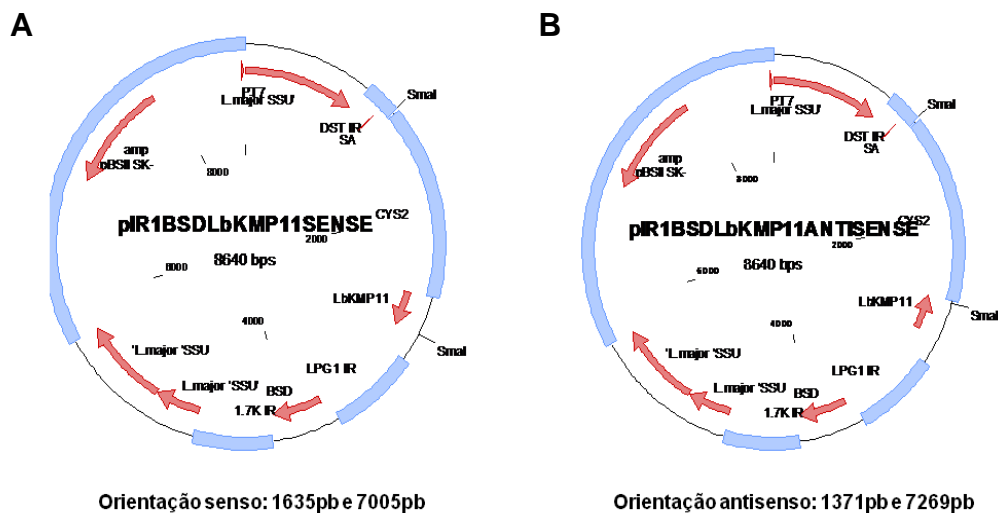


Figura 31: Clonagem in silico da região codificadora do gene *kmp-11* em vetor de expressão pIR1-BSD. A digestão da construção plasmidial com a enzima *SmaI* gerou diferentes padrões de fragmentos quando o inserto está clonado na orientação senso (A) e antissenso (B).

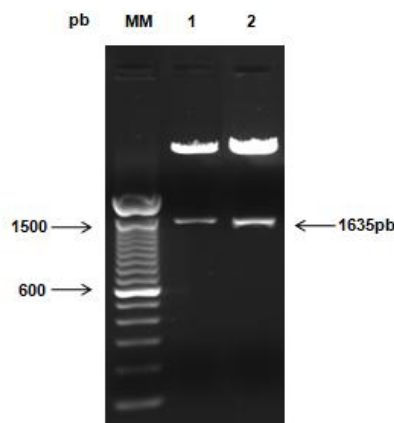


Figura 32: Construção pIR1-BSD-KMP-11 digerido com a endonuclease *SmaI* para confirmar a correta orientação do inserto. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. MM: Marcador de massa molecular *1kb DNA Ladder* (Promega). Linha 1: Clone 1. Linha 2: Clone 2. Os dois clones apresentavam o inserto na orientação senso.

Conforme descrito para o gene da FeSOD-A, formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em fase exponencial de crescimento foram transfectadas com a construção pIR1-BSD-LbKMP-11. Os clones resistentes à blasticidina foram selecionados para ensaios de PCR e *Western blot*.

Para confirmar a transfecção foi realizada extração do DNA genômico dos clones resistentes e, em seguida, as amostras de DNA foram submetidas à PCR. Conforme mostrado na Figura 33, observamos a amplificação de um fragmento de 399 pb, correspondente ao gene *bsd* nas amostras de *Leishmania* transfectadas, confirmando a eficiência da transfecção.

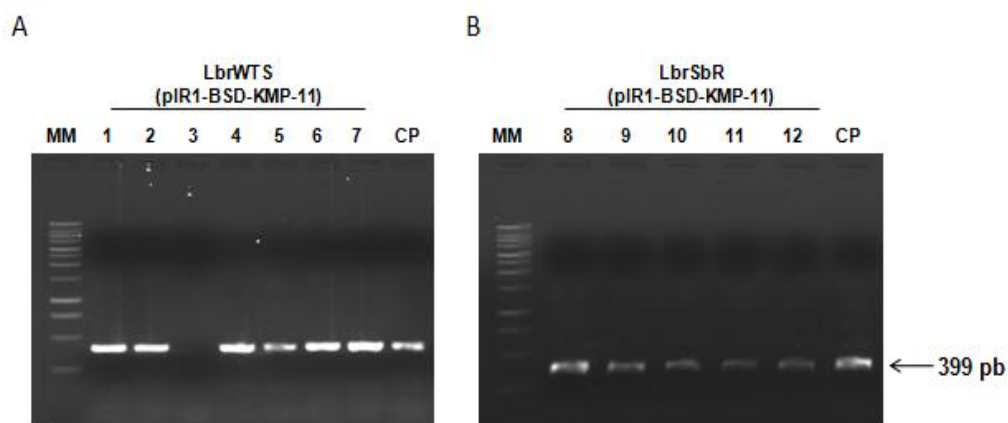


Figura 33: Seleção dos clones transfectados com vetor sem inserto (controle) e com a construção pIR1-BSD-FeSOD-A por PCR das linhagens selvagem (A) e resistente (B) de *L. (V.) braziliensis* transfectadas com a construção pIR1-BSD-KMP-11. Gel agarose 1% corado com brometo de etídio mostra o fragmento de 399 pb, indicando a presença do gene que confere resistência à blastomicina. MM: Marcador de massa molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

Os clones de *Leishmania* positivos foram submetidos ao *Western blot* para avaliar o nível de expressão da proteína KMP-11 nos parasitos transfectados. Nesta análise, 1×10^7 parasitos foram ressuspensos em tampão de amostra, aquecidos a 95°C por 5min e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 15%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal anti-KMP-11.

Análise de *Western blot* mostra que os clones 6 e 7 (LbrWTS +pIR1-BSD_KMP-11) transfectados com a proteína KMP-11 da linhagem selvagem de *L. (V.) braziliensis* não apresentaram diferenças no nível de expressão de KMP-11 quando comparado com a linhagem não-transfectada. No entanto, os clones 3 e 4 (LbrSbR +pIR1-BSD_KMP-11) da linhagem resistente ao SbIII de *L. (V.) braziliensis* apresentam um aumento de 1,5 e 2,0 vezes na expressão da proteína quando comparado ao seu respectivo par não-transfectado (Figura 34).

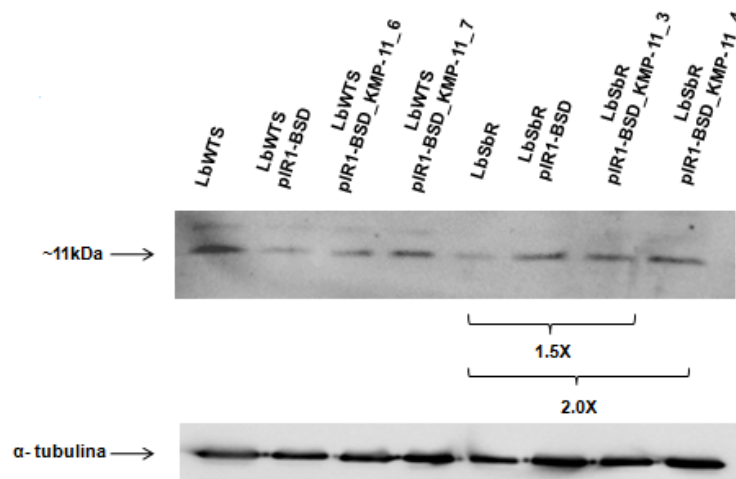


Figura 34: Análise de *Western blot* das linhagens de LbWTS e LbSbR não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio (pIR1-BSD) e os clones superexpressores. Como controle quantitativo, foi utilizado anticorpo anti- α -tubulina de camundongo. Gráfico representativo de três experimentos.

5.2.8 Curva de crescimento dos parasitos transfectados

A interferência da transfecção do gene KMP-11 no crescimento dos parasitos foi avaliada através da determinação do número de parasitos durante período de 5 dias de cultivo. Parasitos não-transfectados, transfectados com o vetor sem inserto e com a construção pIR1-BSD_KMP-11 foram cultivados em 10 mL de meio M199 suplementado em garrafas de cultura de 25 cm³ a 26 °C e, a taxa de crescimento avaliada pela contagem diária do número de parasitos em contador de células Z1 Coulter® Particle Coulter (Beckman Coulter™) (Figura 35). As curvas de crescimento dos parasitos transfectados com KMP-11 foram muito semelhantes àsquelas dos parasitos não-transfectados ou transfectados com vetor sem inserto. Entretanto, pequena redução no número de parasitos foi observado nas linhagens controle (LbWTS+pIR1-BSD) (Figura 35A) e LbSbR+pIR1-BSD e LbSbR+pIR1-BSD_KMP-11_4 (Figura 35B).

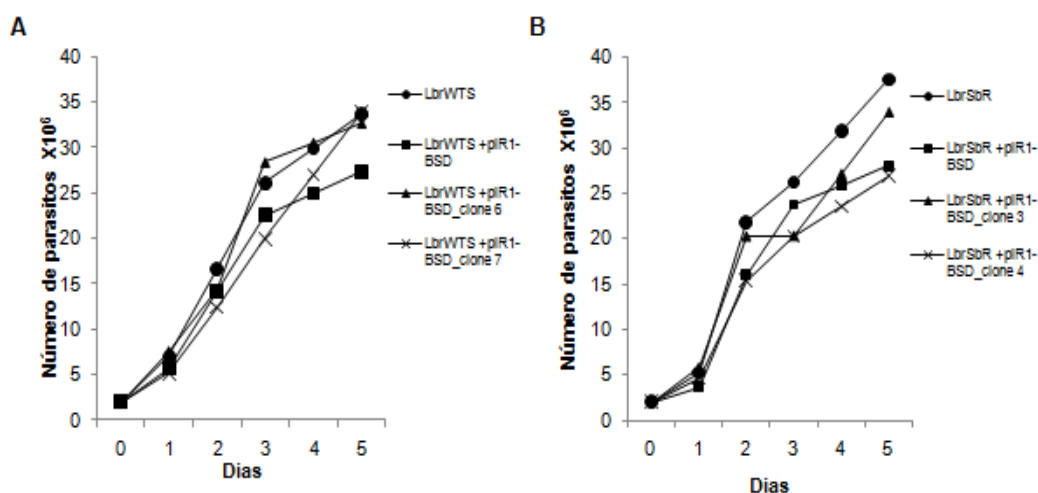


Figura 35: Curva de crescimento dos parasitos não-transfectados, transfectados com o vetor sem inserto e com a construção pIR1-BSD_KMP-11 em *L. (V.) braziliensis* selvagens (A) e resistentes ao SbIII (B). Os parasitos foram semeados na densidade inicial de 2×10^6 parasitos/mL. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos $\times 10^6$ / mL.

5.2.9 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente

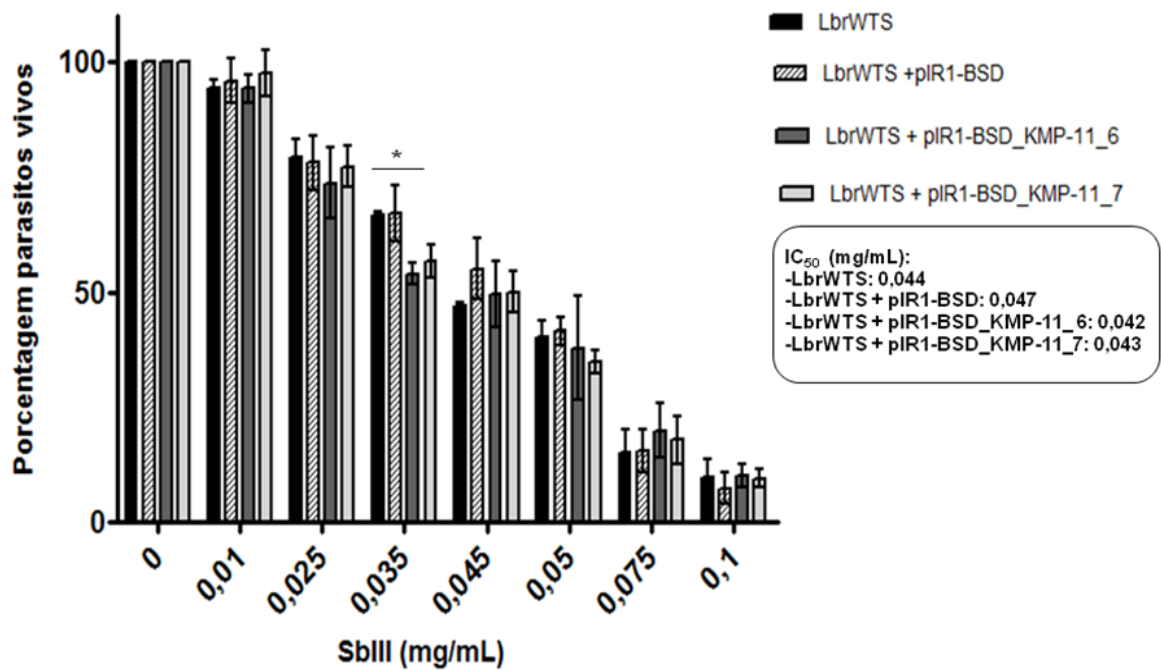
Análises de susceptibilidade ao SbIII foram realizadas para determinar se parasitos transfectados com o gene KMP-11 apresentariam alteração no fenótipo de resistência ao SbIII.

Os parasitos *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII não-transfectados, transfectados com vetor sem inserto ou com o gene *kmp-11* foram incubados com concentrações crescentes de SbIII. O IC_{50} foi determinado pela contagem do número de parasitos crescidos na ausência e presença do antimônio trivalente. Conforme mostrado na Figura 36A, com o aumento das concentrações de SbIII, não foram observadas alterações na porcentagem de parasitos vivos nos clones transfectados com KMP-11 (LbWTS-pIR1-BSD_KMP-11_ clones 6 e 7) quando comparados com a linhagem selvagem não-transfectada de *L. (V.) braziliensis* (LbWTS). Análise estatística mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) apenas na concentração de 0,035 mg/ml de SbIII quando comparado o não-transfectado e o clone 6. O IC_{50} da linhagem selvagem não-transfectada LbWTS para o SbIII foi 0,044 mg/mL, do clone 6 0,042 mg/mL e do clone 7 0,043 mg/mL. De acordo com estes dados, os parasitos selvagens transfectados com o gene KMP-11 não apresentaram diferenças no fenótipo de resistência quando comparado com a linhagem não-transfectada.

Como podemos observar na Figura 36B com o aumento das concentrações de SbIII, foi observado uma maior redução na porcentagem de parasitos vivos nos

clones 3 e 4 transfectados com KMP-11 comparado com a linhagem resistente não-transfectada (LbSbR). Análise estatística mostrou uma diferença significativa ($p < 0,001$ a $p < 0,05$) nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 mg/ml de SbIII quando comparado o selvagem e os clones 3 e 4. Conforme já mencionado, não foi possível calcular o valor de IC_{50} para a linhagem *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII selvagem. Assim, para as análises foi considerado o valor de IC_{50} de 2,0 mg/mL, valor encontrado por Liarte & Murta, 2010. O clone 3 apresentou valor de IC_{50} de 0,77 mg/mL e o clone 4 1,12 mg/mL, ou seja, resistências 2,6 e 1,8 vezes menores que a apresentada pelo parasito não-transfectado. Assim, podemos concluir que a superexpressão do gene KMP-11 em parasitos resistentes ao SbIII altera o fenótipo de resistência tornando os parasitos mais sensíveis ao antimônio.

A



B

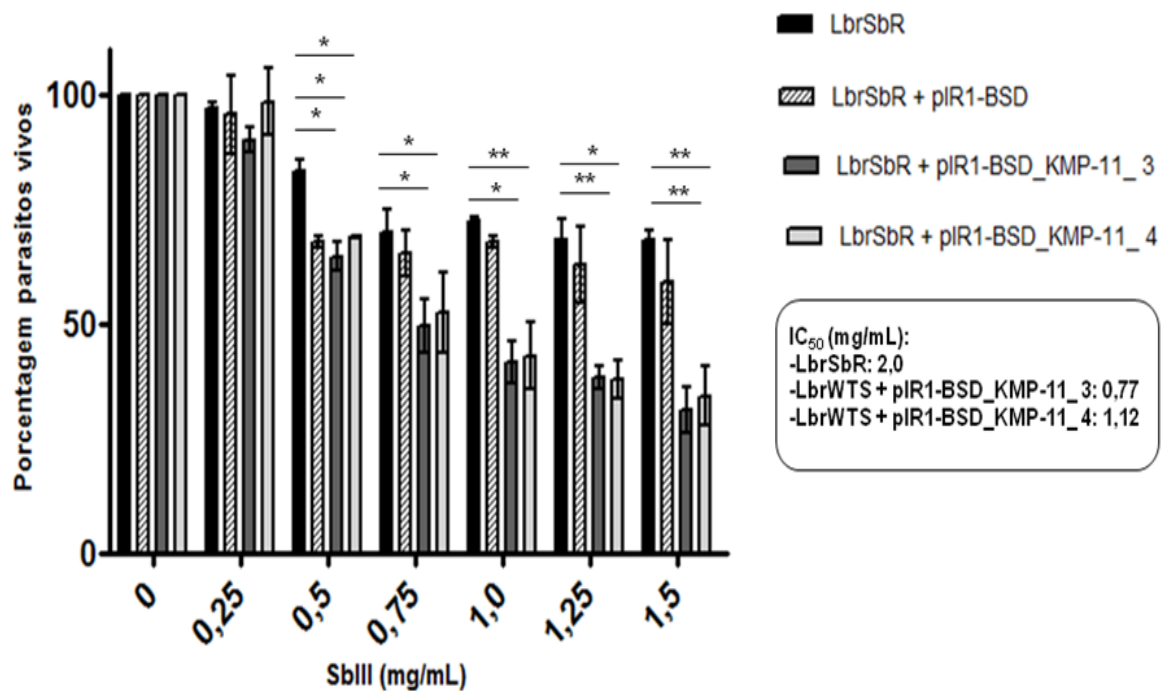


Figura 36: Teste de susceptibilidade *in vitro* ao SbIII em linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens (A) e resistentes (B), não-transfectadas, transfectadas com o vetor vazio e transfectadas com a construção pIR1-BSD-KMP-11. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,001$.

5.2.10 Infecção de células THP-1 com linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* não-transfectadas e transfectadas com o gene *kmp-11*

A fim de avaliar se a expressão da proteína KMP-11 exógena altera a infectividade dos parasitos no hospedeiro definitivo realizamos ensaios de infecção. Resumidamente, macrófagos obtidos por meio da diferenciação de células THP-1 com PMA (50 ng/mL), foram semeados na densidade de 2×10^5 células/poço em placa de 24 poços contendo lamínula e, incubados por 72 h a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, os macrófagos foram incubados com as formas promastigotas (2×10^6 parasitos/mL) das linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* não-transfectadas, transfectadas com o vetor sem inserto e transfectadas com o gene *kmp-11* em fase estacionária de crescimento. Inicialmente avaliamos a melhor proporção do número de parasitos por macrófagos. Como podemos observar na Tabela 7, MΦI 20:1 apresentou menor taxa de infecção. Esse resultado aparentemente contraditório ocorreu devido à dificuldade em contar as lâminas infectadas com os parasitos. Observamos que durante a infecção, devido ao grande número de parasitos, não foi possível retirar todos os parasitos livres com a substituição do meio de cultura. Esses parasitos permaneceram na superfície dos macrófagos inviabilizando a contagem. As multiplicidades de infecção 5:1 e 10:1 apresentaram resultados semelhantes e optamos pela MΦI 10:1 para os demais experimentos.

Tabela 7: Avaliação do número de macrófagos infectados.

MΦI	LbWTS (%)	LbWTS + pIR1-BSD(%)	LbWTS + pIR1-BSD_KMP-11_6 (%)	LbWTS + pIR1-BSD_KMP-11_7(%)
5:1	81	83	78	82
10:1	80	83	78	77
20:1	78	77	74	79

Posteriormente, avaliamos o curso da infecção após diferentes tempos de incubação. Para a montagem dos experimentos, foi utilizado a proporção de infecção 10:1 e foram avaliados três tempos de interação parasito-macrófago, 2,5 h, 5 h e 24 h. Como mostra a Tabela 8, não observamos diferenças na taxa de infecção entre os tempos avaliados para uma mesma linhagem e entre as quatro linhagens avaliadas, não-transfectada (LbWTS), transfectada com o vetor vazio (LbWTS + pIR1-BSD) e transfectadas com o gene *kmp-11* (LbWTS + pIR1-BSD-KMP-11 clones 6 e 7).

Tabela 8: Curso da infecção avaliado em três tempos 2,5 h, 5h e 24 h após a interação parasito-macrófago.

Tempo (h)	LbWTS (%)	LbWTS + pIR1-BSD(%)	LbWTS + pIR1-BSD_KMP-11_6 (%)	LbWTS + pIR1-BSD_KMP-11_7(%)
2,5	83	77	82	75
5,0	80	82	81	81
24	83	84	86	84

Para determinar se a proteína KMP-11 está envolvida nos mecanismos de resistência a drogas, macrófagos infectados com uma suspensão de parasitos (10:1) não-transfectados, transfectados com o vetor vazio e com a construção pIR1-BSD_KMP-11 foram tratados com duas drogas utilizadas no tratamento de leishmanioses, antimonial e anfotericina B. Após 72 h de tratamento, as lâminas foram coradas, fixadas e o número de macrófagos infectados contados.

O antimonial trivalente é muito tóxico para os macrófagos o que dificultou estabelecer uma concentração que não afetasse a integridade dos macrófagos e que fosse capaz de inibir o crescimento dos parasitos. Como podemos observar na Tabela 9 as concentrações 50 µg/mL e 25 µg/mL foram muito tóxicas para os macrófagos. Por outro lado, quando utilizamos concentrações menores, 3,125 µg/mL e 1,5625 µg/mL, observamos que essas concentrações não inibem a infecção dos macrófagos pelos parasitos nas quatro linhagens analisadas.

Nas concentrações de 12,5 µg/mL, 10,0 µg/mL, 6,250 µg/mL e 5,0 µg/mL, em todas as linhagens analisadas, observamos que os resultados encontrados foram contraditórios e inconclusivos. Por exemplo, a concentração de 12,5 µg/mL inibiu 97% e 93% a infecção dos macrófagos pelas linhagens não-transfectada e transfectada com o vetor vazio. Por outro lado, essa mesma concentração foi nociva para os macrófagos infectados com as linhagens transfectadas com o gene *kmp-11* impossibilitando a contagem. Outros experimentos são necessários para investigar as diferenças encontradas nas porcentagens de inibição, visto que para cada condição analisada foi realizado apenas um experimento em duplicata.

Tabela 9: Porcentagem de inibição da infecção dos macrófagos pelos clone 6 e 7 de *L. (V.) braziliensis* selvagem após o tratamento com diferentes concentrações de SbIII.

Concentração de SbIII (µg/mL)	LbWTS (%)	LbWTS + pIR1-BSD(%)	LbWTS + pIR1-BSD_KMP-11_6 (%)	LbWTS + pIR1-BSD_KMP-11_7(%)
Contr. Infecção	82	78	84	76
50	-	-	-	-
25	-	-	-	-
12,5	97	93	-	-
10,0	0	0	1	2
6,250	42	22	5	30
5,0	0	0	6	1
3,125	0	0	0	0
1,5625	0	0	0	0

O símbolo (-) mostra as concentrações de SbIII tóxicas para a integridade dos macrófagos. . (Os valores representam média de 1 experimento em triplicata)

Os macrófagos infectados com as quatro linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* foram tratadas com diferentes concentrações de anfotericina B. Como podemos observar na Tabela 10 , utilizando as concentrações de 1 µM, 0,5 µM e 0,250 µM de anfotericina B obtivemos uma maior porcentagem de inibição de macrófagos infectados para todas as quatro linhagens analisadas. Análise comparativa dos dados mostra que não houve diferença na porcentagem de inibição dos macrófagos infectados entre as linhagens de *Leishmania* analisadas após o tratamento com anfotericina B. De acordo com os dados apresentados, a expressão da proteína KMP-11 não altera a susceptibilidade dos parasitos ao tratamento com anfotericina B.

Tabela 10: Porcentagem de inibição da infecção dos macrófagos pelos clone 6 e 7 de *L. (V.) braziliensis* selvagem após o tratamento com diferentes concentrações de Anfotericina B.

Concentração de Anfo (µM)	LbrWTS (%)	LbrWTS + pIR1-BSD(%)	LbrWTS + pIR1-BSD_KMP-11_6 (%)	LbrWTS + pIR1-BSD_KMP-11_7(%)
Contr. Infecção	75	70	77	76
1	99	97	98	99
0,5	100	99	93	98
0,250	78	90	91	91
0,160	31	72	65	67
0,125	9	25	28	27
0,110	13	19	18	35
0,0625	0	1	7	10

(Os valores representam média de 2 experimentos em triplicata)

5.2.11 Infectividade de linhagens de selvagens de *L. (V.) braziliensis* não-transfectadas e transfectadas com o gene *kmp-11* em camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ

A capacidade das linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* não-transfectada e transfectada com a proteína KMP-11 em induzir lesão em modelo animal foi avaliada. Formas promastigotas metacíclicas (1×10^7 parasitos) foram inoculadas na pata direita de camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ e o crescimento da lesão acompanhado por 52 dias. Como pode ser observado nas Figuras 37 e 38, após 24 dias de infecção a lesão ocasionada pelos parasitos se tornou mais evidente e progrediu rapidamente. Os parasitos das linhagens não-transfectadas (LbrWTS) e o clone 7 de *L. (V.) braziliensis* induziram uma maior lesão nos camundongos quando comparado ao clone 6 (Figura 38). Essa diferença pode estar relacionada aos parasitos do clone 6 serem menos infectivos comparados com os da linhagem LbrWTS e clone 7. É interessante observar a presença de variabilidade entre os clones de uma mesma linhagem de *Leishmania*. Esses dados serão posteriormente melhor investigados.

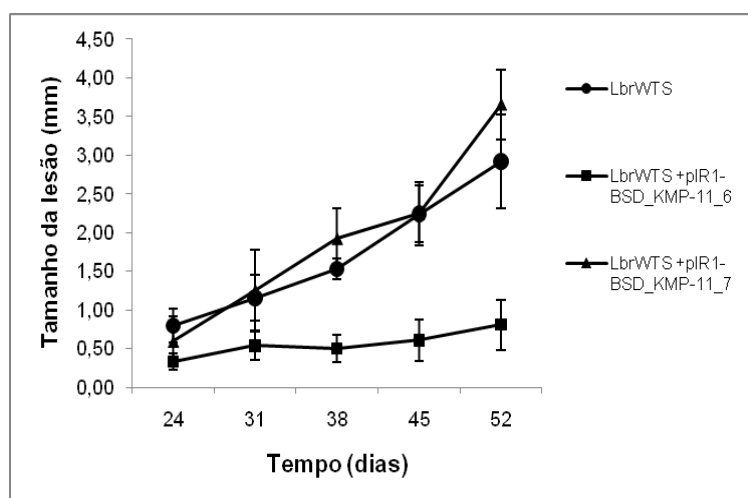


Figura 37: Patologia induzida em camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ por linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis*. Formas promastigotas metacíclicas (1×10^7 parasitos) foram inoculadas na pata direita dos camundongos e o aumento da espessura da pata foi medida com auxílio do paquímetro. A pata esquerda foi utilizada como controle da infecção. No gráfico estão mostrados a média e o desvio padrão dos oito camundongos provenientes de 2 experimentos independentes.

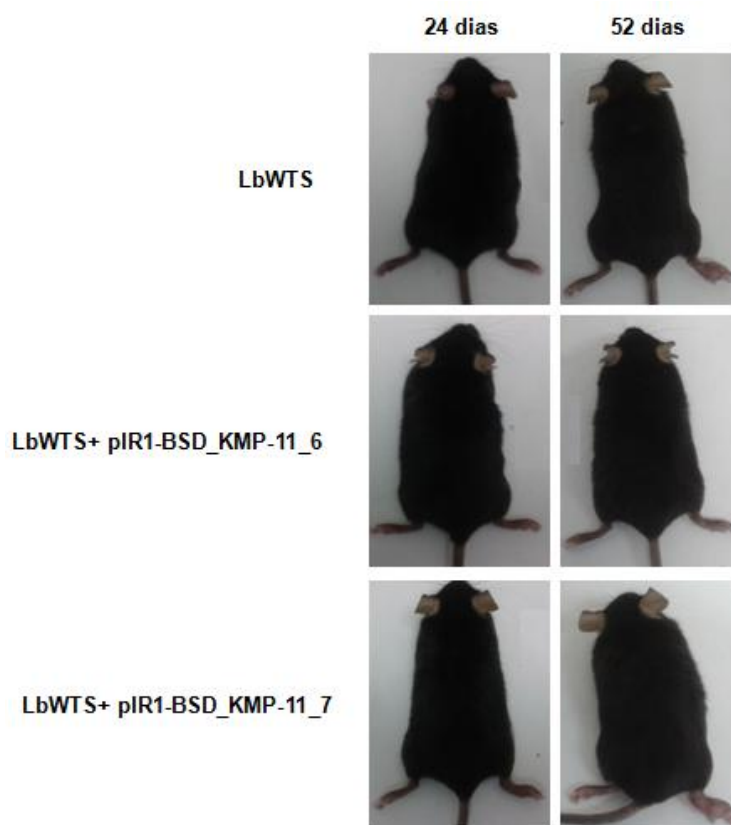


Figura 38: Infectividade das linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* não-transfectadas (LbWTS) e transfectadas com o gene *kmp-11* (LbWTS +pIR1-BSD_KMP-11 clones 6 e 7) em camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ . Foram realizados dois experimentos independentes com quatro animais em cada grupo. O tamanho da lesão foi medida com auxílio de um paquímetro.

Resumo dos resultados encontrados nos experimentos com a proteína KMP-11 em linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII estão descritos nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Resumo dos resultados dos ensaios de RT-qPCR e *Western blot* em linhagens de *Leishmania* spp.

ENSAIOS	<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.)braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>
RT-qPCR	S	S	2,9X LbSbR↓	1,5X LcSbR ↑
<i>Western blot</i>	S	S	2,0X LbSbR↓	1,5X LcSbR ↑

S – perfil semelhante: Não apresentou diferença no nível de expressão quando os pares das linhagens selvagens e resistentes de cada espécie foram comparados.

Tabela 12: Resumo dos resultados de transfecção da proteína KMP-11 e ensaios de susceptibilidade ao SbIII das linhagens de *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII.

Linhagens de <i>Leishmania</i> spp.	Western blot (superexpressão KMP-11)	IC ₅₀ (mg/mL)	Susceptibilidade ao SbIII*
LbWTS		0,044	
LbWTS +PIR1-BSD		0,047	
LbWTS +PIR1-BSD_KMP-11_6	S	0,042	Sem alteração do fenótipo
LbWTS +PIR1-BSD_KMP-11_7	S	0,043	Sem alteração do fenótipo
LbSbr		2,0	
LbSbR +PIR1-BSD		2,0	
LbSbR +PIR1-BSD_KMP-11_3	1,5X	0,77	2,6X mais sensível
LbSbR +PIR1-BSD_KMP-11_4	2,0X	1,12	1,8X mais sensível

S – perfil semelhante: Não apresentou diferença no nível de expressão quando os pares das linhagens selvagens e resistentes ao SbIII de cada espécie foram comparados.

* Susceptibilidade ao SbIII - comparação entre clones transfectados e não-transfectados.

6. DISCUSSÃO

A quimioterapia é a medida mais importante para o controle das leishmanioses, visto que não existe ainda uma vacina eficiente para uso em humanos (Palatnik de Sousa, 2008). Além disto, o controle vetorial é difícil devido às características ambientais muito diversas e a existência de um grande número de reservatórios domésticos e silvestres dificultam também o controle. Os derivados de antimônio, estibogluconato de sódio (Pentostam) e o antimoniato de metilglucamina (Glucantime) tem sido amplamente utilizados no tratamento das leishmanioses por mais de 60 anos. Entretanto, a quimioterapia das leishmanioses apresenta problemas como: a alta toxicidade dos fármacos usados no tratamento clínico, alto custo e a ocorrência de cepas de *Leishmania* resistentes ao tratamento com antimonial. As leishmanioses representam um problema de saúde pública em vários países do mundo e a descoberta de novas drogas e/ou alvos para quimioterapia é uma necessidade urgente.

As *Leishmanias* possuem um ciclo de vida digenético, alternando entre as formas promastigotas e amastigotas. Durante a fagocitose, os macrófagos produzem níveis altamente tóxicos de espécies reativas de oxigênio (ROs) incluindo ânion superóxido (O_2^-). A metaloenzima superóxido dismutase (SOD) possui um importante papel na detoxificação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Fridovich, 1978). Duas classes de FeSODs foram identificadas em *Leishmania*: FeSOD-A e FeSOD-B1 e B2. Em *L. (L.) infantum chagasi*, o aumento da expressão de FeSOD-B2 na forma promastigota mostra que essa enzima é mais importante para o sobrevivência do parasito no intestino do flebotomíneo. Por outro lado, a isoforma FeSOD-B1 é mais importante para a sobrevivência do parasito no macrófago. Ambas isoformas FeSOD-B1 e B2 estão presentes no glicossomo (Plewes *et al.*, 2003). Por outro lado, FeSOD-A está localizada na mitocôndria, local onde ocorre numerosas reações químicas envolvidas na respiração celular com produção de subprodutos como ânions superóxidos (Getachew & Gedamu, 2007).

Estudos sobre a resistência ao estresse oxidativo correlacionada com a capacidade de multiplicação dos parasitos em macrófagos mostram que a geração de ROs é um dos principais mecanismos microbicidas na defesa contra *Leishmania* (Huynh & Andrews, 2008). Ghosh *et al.* (2003) utilizando *L. (L.) donovani* deficientes de SOD, demonstraram a importância dessa enzima na defesa contra ROs e na sobrevivência desses parasitos em macrófagos peritoniais. Visto a importância dos

mecanismos de defesa antioxidante na sobrevivência do parasito no interior do macrófago, neste estudo caracterizamos a enzima FeSOD-A em quatro espécies de *Leishmania*: *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII, previamente obtidas *in vitro* (Liarte & Murta, 2010).

Em tripanosomatídeos, a maioria dos genes apresentam uma organização repetida em *tandem*, embora existam também genes presentes em uma única cópia. Paramchuk *et al.* (1997) observaram que em *L. (L.) infantum chagasi* o gene LcFeSOD-A pode estar presente em uma simples cópia no genoma, enquanto que o LcFeSOD-B pode estar organizado em múltiplas cópias no genoma do parasito. Análise do genoma dos parasitos *L. (V.) braziliensis* (número de acesso no GenBank NC_009300.2) e *L. (L.) infantum chagasi* (número de acesso no GenBank 009392.1) mostrou que gene FeSOD-A está presente como cópia única no cromossomo 8 de ambos os parasitos. Nossas análises de *Southern blot* confirmaram este resultado. Além disto, os resultados mostraram possível presença de polimorfismos na região codificante do gene *fesod-a* entre os pares selvagens e resistentes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* ou que cópias destes gene possam estar deletadas nas amostras resistentes. A presença de polimorfismos será melhor investigada através de sequenciamento do gene destas amostras de *Leishmania* e o número de cópias do gene FeSOD será determinado por PCR quantitativo em tempo real.

Análises da expressão do gene FeSOD-A por *Northern blot* nas linhagens de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII, mostraram que a sonda específica do gene *fesod-a* reconheceu um transcrito de aproximadamente 2,1 Kb em todas as linhagens de *Leishmania* analisadas, com exceção da *L. (V.) guyanensis* selvagem que apresentou dois transcritos de aproximadamente 2,37 e 1,75 Kb. Paramchuk *et al.* (1997) observaram a presença de um transcrito de 1,7 Kb em linhagens selvagens de *L. (L.) infantum chagasi*. A presença de transcritos maiores que o tamanho esperado pode ser atribuído tanto a precursores de mRNA ou a produtos secundários do processamento do RNA (Graham, 1995). Diante disto, a presença de dois transcritos na linhagem selvagem de *L. (V.) guyanensis* pode ser atribuído aos mecanismos de regulação da transcrição tanto na região 3'UTR quanto na região 5'UTR do gene FeSOD-A. Semelhante ao resultado observado em LgWTS, em *T. cruzi* o gene FeSOD-A também possui dois transcritos um de 1,2 Kb e outro de 1,7 Kb (Nogueira *et al.*, 2006). Em nosso estudo, a expressão do mRNA também foi

investigada através do RT-qPCR. Os resultados mostraram uma diminuição de 3,6 no nível de mRNA do gene *fesod-a* na linhagem resistente de *L. (V.) guyanensis* quando comparado com seu respectivo par selvagem. Por outro lado, não foi observado alteração na expressão do mRNA entre os pares de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII.

Ensaio de *Western blot* utilizando o anticorpo policlonal anti-TcFESOD (Nogueira *et al.*, 2006) em linhagens de *Leishmania* selvagens e resistentes ao SbIII, mostrou que o anticorpo reconheceu um polipeptídeo de aproximadamente 26 kDa em todas as linhagens analisadas. Análise de densitometria das bandas não mostrou diferença no nível de expressão da proteína entre os pares de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII. Por outro lado, a enzima FeSOD-A está 2,0 vezes mais expressa na linhagem de *L. (V.) guyanensis* resistente ao SbIII. Nogueira *et al.* (2008) mostraram que em *T. cruzi* as enzimas ferro superóxido dismutase e triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial estão mais expressas em populações do parasito com resistência induzida *in vitro* ao benzonidazol. Os ensaios de *Western blot* mostraram também que a enzima FeSOD-A está 3,0 vezes menos expressa na linhagem resistente de *L. (L.) amazonensis*. Ensaio de atividade enzimática da SOD deverão ser realizados para confirmar esses resultados em relação às linhagens *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. É interessante ressaltar ainda que observamos discrepâncias entre o nível de mRNA do gene *fesod-a* e da proteína FeSOD-A em linhagens selvagens e resistentes de *L. (V.) guyanensis*. O nível de mRNA foi menor na linhagem resistente e a expressão da proteína foi maior nessa mesma linhagem. Estudos anteriores mostram que o nível de mRNA e da proteína nem sempre são correlacionados devido aos mecanismos de controle da regulação gênica (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Em tripanosomatídeos, a regulação da expressão gênica ocorre principalmente a nível da estabilidade do transcrito e do controle pós-traducional como estabilidade da proteína e modificações pós-traducionais (Toledo *et al.*, 2010).

Enzimas antioxidantes estão entre os principais mecanismos de defesa das *Leishmania* contra ROs produzidos durante a respiração mitocondrial que podem provocar danos a proteínas, lipídeos e ao DNA, levando à morte celular. Uma das enzimas mais importantes é a FeSOD-A que está localizada na mitocôndria e é responsável pela detoxificação do ânion superóxido com produção de peróxido de oxigênio e oxigênio molecular (Sánchez-Moreno *et al.*, 2012). Para melhor investigar o papel da enzima FeSOD-A na proteção dos parasitos contra o estresse oxidativo e

verificar se a enzima pode estar relacionada com a resistência ao SbIII, parasitos das linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII foram transfectadas com a construção pIR1-BSD_FeSOD-A. A transfecção utilizando o vetor pIR1-BSD permite que o gene transfectado seja integrado no gene do RNA ribossomal de *Leishmania* por recombinação homóloga. Além de proporcionar uma transfecção estável, este plasmídeo favorece a alta expressão do gene, uma vez que o RNA ribossomal é um gene de múltiplas cópias (Beverley & Clayton, 1993; Goyard & Beverley 2000). Entretanto, como a regulação de genes em tripanosomatídeos é predominantemente pós-transcricional, dependendo do gene a ser expresso existe uma regulação específica.

A superexpressão da enzima FeSOD-A nos parasitos transfectados foi avaliada por *Western blot*. Os resultados mostraram que os parasitos selvagens e resistentes das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* transfectados com o gene *fesod-a* mostraram um aumento de 1,5 a 4,0 vezes no nível de expressão da proteína quando comparado com seus respectivos pares não-transfectados ou transfectados com o vetor vazio. Avaliamos também a atividade enzimática de SOD por um método indireto que mede a capacidade da enzima inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar. Nesse ensaio observamos que as linhagens resistentes ao SbIII de ambas as espécies de *Leishmania*, LbSbR e LcSbR, apresentaram maior atividade da enzima SOD quando comparado com os respectivos pares selvagens. Esses resultados mostram a importância dessa enzima no metabolismo dos parasitos resistentes. É importante ressaltar que o nível de mRNA do gene *fesod-a* e da proteína são similares entre os pares sensíveis e resistentes dessas espécies. Entretanto, a atividade enzimática da FeSOD-A é maior nos parasitos resistentes.

Os clones superexpressores das linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* apresentaram maior atividade enzimática quando comparado com as linhagens não-transfectadas ou transfectadas com o vetor vazio. Por outro lado, os clones superexpressores das linhagens resistentes de ambas as espécies não apresentaram diferenças quanto à atividade de SOD comparado com as respectivas linhagens não-transfectadas ou transfectadas com o vetor vazio, uma vez que os parasitos resistentes ao SbIII já apresentavam alta atividade enzimática. É interessante ressaltar que os parasitos apresentam um controle metabólico muito eficiente, evitando que aconteça um desequilíbrio que seja prejudicial ao metabolismo geral. Paramchuk *et al.* (1997) também avaliaram a atividade de

FeSOD-A em linhagens de *L. (L.) infantum chagasi* transfectadas com o gene FeSOD-A e encontraram maior atividade enzimática nos parasitos superexpressores.

Os parasitos superexpressores da enzima FeSOD-A também foram avaliados quanto a susceptibilidade ao SbIII. Os resultados mostraram que parasitos selvagens de ambas as espécies de *Leishmania*, LbWTS e LcWTS, superexpressando a enzima apresentaram maior resistência ao SbIII quando comparado os respectivos pares não-transfectados ou transfectados com o vetor vazio, mostrando a importância dessa enzima nos mecanismos de resistência à droga. Por outro lado, os parasitos resistentes de *L. (L.) infantum chagasi* superexpressando a enzima não apresentaram alteração no fenótipo quando comparado com os parasitos não-transfectados.

Um resultado interessante foi observado para o clone 1 de *L. (V.) braziliensis* resistente (LbSbR+pRI-BSD-FeSOD-A_1). A superexpressão de FeSOD-A alterou o fenótipo de resistência desses parasitos tornando-os mais suscetíveis ao antimônio trivalente. A transfecção pode ter provocado um desequilíbrio nos produtos das vias envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo. Resultado semelhante foi encontrado para parasitos resistentes de *L. (V.) braziliensis* superexpressando a enzima triparedoxina peroxidase, uma vez que estes parasitos também se tornaram mais suscetíveis ao SbIII comparado à linhagem não-transfectada (Andrade *et al.*, 2013 em preparação). Temperton *et al.* (1998) também observaram que formas epimastigotas do *T. cruzi* superexpressando a enzima FeSOD-B foram duas vezes mais sensíveis ao benzonidazol quando comparado aos parasitos não-transfectados. Essa sensibilidade a droga pode ser devido a um desequilíbrio causado no sistema de defesa antioxidante do parasito, que resulta no aumento da taxa de produção do H_2O_2 , levando o parasito à morte. Apesar da FeSOD-A apresentar níveis aumentados nos parasitos transfectados, outras enzimas envolvidas no metabolismo do H_2O_2 , como a tripanotiona redutase, triparedoxina peroxidase e ascorbato peroxidase não estão superexpressas. Dessa forma, o processo de detoxificação nas células transformadas fica deficiente, sendo que o parasito se torna mais sensível. Outro estudo demonstrou que a superexpressão da isoforma mitocondrial (SOD-A) em epimastigotas de *T. cruzi* gerou parasitos mais resistentes à morte celular programada que altera a função da mitocôndria com concomitante aumento da produção de ânion superóxido (Piacenza *et al.*, 2007). Em *T. brucei*, a diminuição da expressão de SODB1 e SODB2 por dsRNAi resultou na

interrupção do crescimento e morte celular, enquanto a diminuição da expressão da isoforma mitocondrial não afetou a proliferação celular (Wilkinson *et al.*, 2006).

Getachew *et al.* (2012) investigaram o papel da FESOD-A mitocondrial de *L. (L.) donovani* (LdFESOD-A) na proteção dos parasitos ao estresse oxidativo e no controle de eventos relacionados à morte celular programada. Os autores mostraram que a superexpressão de LdFeSOD-A protege os parasitos da citotoxicidade induzida pela miltefosina e reduz a produção de superóxido. A incubação prolongada dos parasitos com essa droga induz um aumento das enzimas citocromo c e LdFeSOD-A no citosol, mostrando que a FESOD-A está envolvida nos mecanismos de proteção da mitocôndria ao estresse oxidativo pela inibição da morte celular programada.

Estudos de tolerância ao estresse oxidativo induzido por diversos compostos foram realizados em *Leishmania* transfectada com o gene *fesod-a*. Em nosso estudo, linhagens selvagens e resistentes ao SbIII de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* não transfectadas e superexpressando a enzima FeSOD-A foram avaliadas quanto à tolerância ao paraquat. É interessante ressaltar que o clone da linhagem selvagem de *L. (V.) braziliensis* superexpressor de FeSOD-A apresentou proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo paraquat. Por outro lado, o clone 2 de *L. (V.) braziliensis* resistente e o clone 5 e 3 de *L. (L.) infantum chagasi* sensível e resistente ao SbIII, respectivamente, superexpressando a enzima FeSOD-A não apresentaram aumento na proteção contra o estresse oxidativo quando comparado com os respectivos pares não-transfectados e transfectados com o vetor vazio. Paramchuk *et al.* (1997) avaliaram o efeito da superexpressão das isoformas FeSOD-A e FeSOD-B em *L. (L.) infantum chagasi* submetidas a diferentes concentrações do paraquat. Esse composto herbicida age como um gerador intracelular de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e secundariamente radicais hidroxila. Semelhante aos nossos dados obtidos com *L. (V.) braziliensis*, os autores observaram que os parasitos transfectados com ambas isoformas da SOD foram mais resistentes ao paraquat quando comparado com os parasitos não-transfectados. Ghosh *et al.* (2003) também demonstraram a importância da SOD na proteção do parasito contra ROs, com ensaios de inibição da expressão dessa enzima. Os autores observaram que a transfecção de *L. (L.) tropica* com o gene SOD em orientação antisenso no vetor de expressão promoveu a redução dos níveis de mRNA da SOD, na expressão e na atividade funcional da proteína, aumentando a sensibilidade a menadiona (gerador de O_2^-) e ao H_2O_2 em culturas axênicas.

Uma possível explicação para não ter sido encontrado diferença na proteção contra o estresse oxidativo nos clones de *L. (L.) infantum chagasi* selvagens superexpressando FeSOD-A, deve ser o fato de que outras enzimas envolvidas no metabolismo do H₂O₂ não apresentarem um aumento na expressão, tornando deficiente o sistema de defesa oxidativo do parasito. Uma outra explicação pode ser atribuída ao fato de que o H₂O₂ inativa a FeSOD através da oxidação dos seus resíduos de triptofano, o que resulta na provável modificação do sítio ativo da enzima (Paramchuk *et al.*, 1997).

Estudos realizados com a enzima FeSOD-A de *Leishmania* confirmam o importante papel dessa enzima na relação hospedeiro-parasito. Além disso, a enzima não está presente em humanos, podendo ser considerada um alvo racional para o tratamento das leishmanioses. Estudos recentes mostram que formulações da enzima superóxido dismutase SOD-B1 recombinante em nanopartículas de quitosan estáveis e biodegradáveis podem aumentar a imunogenicidade junto a imunidade mediata por células T (Danesh-Bahreini *et al.*, 2011). Os autores sugerem que essa nanovacina de dose única seja efetiva na resposta imune contra as leishmanioses.

Muitos estudos tem sido realizados para a descoberta de antígenos específicos de *Leishmania* que possam aumentar a especificidade no sorodiagnóstico. Um antígeno candidato é a proteína ferro superóxido dismutase excretada (FeSODe). Ela é altamente imunogênica e específica, sendo assim um marcador molecular útil para o diagnóstico da infecção. Esse antígeno mostrou bons resultados para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina (Marín *et al.*, 2007). Posteriormente, López-Céspedes *et al.* (2012) desenvolveram um ELISA utilizando como antígeno FeSODe excretada de cães da península Yucatán infectados com *L. (V.) braziliensis*, *L. mexicana* e *L. (L.) infantum chagasi*. Os resultados mostraram que esse antígeno é uma boa ferramenta de diagnóstico, uma vez que apresenta baixo custo, alta reprodutibilidade e especificidade.

A proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 é encontrada em todos os protozoários kinetoplastídeos (Stebeck *et al.*, 1995). Ela é altamente conservada (>95% homologia) em todas as espécies de *Leishmania* e possui um papel importante na biologia do parasito (Ramírez *et al.*, 1998). É interessante ressaltar que esta proteína apresenta homologia significativa com a apo-lipoproteína B, bem como com a proteína associada ao citoesqueleto (CIPI) de *Arabidopsis thaliana* (Thomas *et al.*, 2000). Ela pode estar associada com a estabilidade de moléculas

como lipofosfoglicanos no interior da membrana do parasito (Jardim *et al.*, 1995), bem como na mobilidade do parasito e na sua ligação à célula hospedeira (Thomas *et al.*, 2000).

Diferentes estudos mostraram a expressão da proteína KMP-11 nos diferentes estágios do ciclo de vida de *Leishmania*. Jardim *et al.* (1995) descreveram a presença da proteína em ambos os estágios de *L. (L.) donovani*. Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Matos *et al.* (2010) que mostram que a proteína KMP-11 é encontrada nas formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em ambos estágios a proteína KMP-11 está associada a estruturas de membranas como na superfície celular, bolsa flagelar e vesículas intracelulares. A expressão da proteína na superfície celular é maior no estágio amastigota comparado ao promastigota e aumenta durante a metaciclogênese. O aumento da expressão de KMP-11 em formas promastigotas metacíclicos, e em amastigotas, mostra o papel dessa molécula na relação parasito-hospedeiro mamífero. Por outro lado, Berberich *et al.* (1998) mostraram que o mRNA do gene KMP-11 de *L. (L.) infantum chagasi* é menos expresso durante o crescimento do parasito da fase exponencial para a estacionária, e também durante a diferenciação de promastigota para amastigota. Entretanto, a concentração da proteína KMP-11 é maior em promastigota. Essas diferenças na expressão de KMP-11 entre *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) donovani* pode ser atribuída ao padrão celular de distribuição da proteína em ambos os parasitos. Enquanto em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* a proteína se encontra principalmente restrita ao flagelo e à bolsa flagelar, em *L. (L.) donovani* o sinal de reatividade de KMP-11 aparece em toda extensão da membrana plasmática junto com o marcador de superfície celular LPG (lipofosfoglicanos). Esse perfil de distribuição foi também observado em *T. brucei* e *T. congolense* (Jardim *et al.*, 1995; Stebeck *et al.*, 1996; Stebeck *et al.*, 1995).

A organização do gene KMP-11 em tripanosomatídeos apresenta duas estruturas principais. Em *T. brucei* e *T. cruzi*, o locus do gene é formado por quatro cópias em *tandem*. Por outro lado, em *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. panamensis*, o locus contém três cópias do gene com regiões intergênicas de tamanhos diferentes (Berberich *et al.*, 1997; Jardim *et al.*, 1995). Em nosso estudo, análise do genoma de *Leishmania* mostrou que o gene *kmp-11* está localizado no cromossomo 34 de *L. (V.) braziliensis* (número de acesso NC_009326.1) e no cromossomo 35 de *L. (L.) infantum chagasi* (número de acesso NC_009419.1). Análise de *Southern blot* mostrou o mesmo perfil de hibridização entre as diferentes

espécies e entre linhagens selvagens e resistentes de uma mesma espécie de *Leishmania*, com exceção da linhagem selvagem de *L. (V.) guyanensis* que apresentou um perfil de fragmentos diferentes. Esse resultado será posteriormente investigado, através de sequenciamento das regiões intergênicas do KMP-11 de linhagens selvagens e resistentes de *L. (V.) guyanensis*. Com relação às outras espécies, nossos resultados corroboram com o perfil de hibridização encontrado por Berberich *et al.* (1997) em análise de *Southern blot* utilizando DNA de formas promastigotas do parasito *L. (L.) infantum chagasi*. A organização genômica do gene *kmp-11* também foi similar ao encontrado para o parasito *L. (L.) donovani*, embora existam diferenças no tamanho das regiões intergênicas entre as espécies (Berberich *et al.*, 1997; Jardim *et al.*, 1995).

O padrão de expressão de mRNA do gene KMP-11 em formas promastigotas do parasito foram analisadas por *Northern blot*. Neste ensaio diferentes amostras de *Leishmania* foram hibridizadas com sonda específica do gene que revelou a presença de dois transcritos de aproximadamente 1,0 Kb e 3,0 Kb em todas as linhagens de *Leishmania* spp. analisadas, com exceção da linhagem selvagem de *L. (V.) guyanensis* que apresentou apenas um transcrito de 1,0 Kb. Berberich *et al.* (1998) analisaram o padrão de expressão do mRNA em formas promastigotas em fase exponencial e estacionária de crescimento de *L. (L.) infantum chagasi*. Os autores observaram a presença de dois transcritos de 1,3 Kb e 2,6 Kb. O fragmento de 1,3 Kb está menos expresso na fase estacionária e o de 2,6 Kb parece ser regulado durante a transição entre a fase exponencial e estacionária.

Conforme discutido anteriormente, os genes em tripanosomatídeos estão organizados em *tandem* separados por regiões intergênicas curtas e, elementos regulatórios são encontrados preferencialmente na região não traduzida 3' UTR. A transcrição de RNAs policistrônicos pode gerar diferentes tamanhos de transcritos dependendo do estágio de crescimento do parasito, o ambiente no qual o mesmo se encontra e suas necessidades metabólicas. A expressão do mRNA também foi investigada através do RT-qPCR. Os resultados mostraram uma diminuição de 2,9 vezes no nível de mRNA do gene *kmp-11* na linhagem resistente de *L. (V.) braziliensis* e um aumento de 1,5 vezes na linhagem resistente de *L. (L.) infantum chagasi*, quando comparado com seus respectivos pares selvagens. Por outro lado, não foi observado alteração na expressão do mRNA entre os pares selvagens e resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*.

A expressão da proteína KMP-11 em linhagens de *Leishmania* spp. foi avaliada por *Western blot* utilizando o anticorpo policlonal produzido contra a proteína recombinante KMP-11 de *L. (V.) braziliensis* (anti-KMP-11) em coelhos. Análise de densitometria das bandas mostrou que não foram observadas diferenças no nível de expressão da proteína entre os pares selvagens e resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, os dados mostraram que a proteína KMP-11 está 2,0 vezes menos expressa na linhagem resistente de *L. (L.) braziliensis* e 1,5 vezes mais expressa na linhagem resistente de *L. (L.) infantum chagasi*. Por outro lado, Fadili *et al.* (2009) observaram uma menor expressão da proteína KMP-11 em amastigotas axênicas e promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* resistentes ao SbIII. Essa discrepância de resultados pode ser devido a diferenças entre as cepas usadas nestes dois estudos e aos diferentes métodos de obtenção dos parasitos resistentes. Ensaio de transfecção em *L. (L.) infantum chagasi* é importante para comprovar ou excluir a participação dessa proteína no fenótipo de resistência ao SbIII.

Observamos uma correlação positiva entre o nível de mRNA e a expressão da proteína KMP-11 nas linhagens resistente de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. Por outro lado, o mesmo não é verificado para a linhagem resistente de *L. (L.) braziliensis*.

A expressão da enzima KMP-11 nos parasitos transfectados foi avaliada por *Western blot*. Os resultados mostraram maior expressão da proteína KMP-11 nos parasitos resistentes de *L. (V.) braziliensis* transfectados com o gene *kmp-11* comparado aos parasitos não-transfectados ou transfectados com o vetor vazio. Entretanto, não foi observado diferença na expressão da proteína nos parasitos selvagens transfectados (clones 6 e 7) quando comparado aos parasitos não-transfectados. Como discutido anteriormente, o mecanismo de regulação gênica nos tripanossomatídeos é principalmente pós-transcricional, logo a expressão da proteína KMP-11 exógena pode estar sendo regulada negativamente o que contribuiu para a sua não superexpressão nos parasitos selvagens LbWTS.

Os clones transfectados com a proteína KMP-11 foram avaliados quanto à susceptibilidade ao SbIII. Os resultados mostraram que parasitos selvagens de *L. (V.) braziliensis* transfectados com a proteína KMP-11 não apresentaram alteração no fenótipo quando comparados com as linhagens não-transfectadas ou transfectadas com o vetor vazio. Os resultados de análise da expressão protéica nos clones 6 e 7 mostraram que a proteína exógena KMP-11 não estava superexpressa

nesse parasitos, corroborando com os dados encontrados nos ensaios de susceptibilidade.

Por outro lado, os clone 3 e 4 resistentes superexpressando a proteína KMP-11 foram 1,8 a 2,6 vezes mais suscetíveis ao SbIII, comparado com os respectivos controles. Provavelmente a superexpressão do KMP-11 causou alguma alteração no metabolismo do parasito, que será posteriormente investigado. Nossa hipótese é que a superexpressão da proteína KMP-11 pode ter alterado a fluidez da membrana plasmática dos parasitos e, assim ter modificado a mobilidade dos solutos na membrana.

Os clones selvagens de *L. (V.) braziliensis* transfectados a proteína KMP-11 foram avaliados quanto à infectividade em células THP-1. Os resultados mostraram que não há diferença na taxa de infecção quando comparamos os clones transfectados e os parasitos não-transfectados ou transfectados com vetor vazio. Estudos realizados por Lacerda *et al.* (2012) utilizando cultura de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e com adição de anticorpos anti-KMP-11 no meio, mostraram uma diminuição da carga parasitária no interior dos macrófagos. Os autores sugerem que a proteína KMP-11 é liberada pelos parasitos sendo responsável pela exacerbação da infecção aumentando, assim o número de amastigotas no interior do macrófago pela indução de IL-10. A presença do anticorpo-antiKMP-11 diminuiria, portanto, a infecção. Os autores também avaliaram o efeito da adição de KMP-11 exógena na cultura de macrófagos e observaram que a proteína exógena aumentou a infecção. Os resultados mostram KMP-11 como um fator de virulência em *L. (L.) amazonensis*, fazendo desse antígeno um possível alvo para vacinas e estratégias terapêuticas.

Os macrófagos infectados com formas promastigotas de linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* não-transfectadas e transfectadas com a proteína KMP-11 foram avaliados quanto à susceptibilidade ao antimonial trivalente e anfotericina B. Não observamos diferenças na inibição da infecção para as duas drogas avaliadas. A virulência dos clones transfectados com KMP-11 também foi avaliada em modelo *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6 nocaute para interferon- γ . Observamos apenas que o clone 6 (pIR1-BSD-KMP11_6) apresentou menor infectividade em camundongos em comparação com os parasitos não-transfectados e o clone 7. A diferença em relação à infectividade observada entre os clones transfectados pode ser devido a diferenças intra-específicas.

7.0 CONCLUSÕES

Patógenos intracelulares desenvolvem diversos mecanismos para detoxificação de espécies reativas de oxigênio. Em vários sistemas são descritos diferentes enzimas participantes da defesa antioxidante: catalases, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e peroxiredoxinas. Em *Leishmania*, a enzima FeSOD-A aparece como a primeira linha de defesa contra ROs. Essa enzima é importante na sobrevivência dos parasitos no interior dos macrófagos.

Os nossos resultados mostraram que parasitos resistentes das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* apresentam maior atividade da enzima FeSOD-A quando comparado com os respectivos pares selvagens. Além disso, parasitos selvagens superexpressores de FeSOD-A apresentaram maior atividade enzimática e um aumento na resistência ao SbIII quando comparado com os respectivos pares não-transfectados ou transfectados com o vetor vazio. Além disso, o clone superexpressor de FeSOD-A da linhagem selvagem de *L. (V.) braziliensis* apresentou maior tolerância ao estresse oxidativo induzido por paraquat. Assim, nossos resultados sugerem que a enzima FeSOD-A está envolvida no fenótipo de resistência de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* ao antimonial.

A proteína KMP-11 está presente em todos os tripanosomatídeos o que mostra a importância dessa proteína na biologia do parasito. Entretanto, a sua função não está totalmente clara. Em nossos resultados observamos que a superexpressão da proteína em parasitos resistentes de *L. (V.) braziliensis* altera o fenótipo de resistência ao SbIII, tornando esses parasitos mais suscetíveis ao SbIII. Esses resultados serão posteriormente melhor investigados.

8.0 PERSPECTIVAS

- **FeSOD-A:**

Experimentos adicionais como a co-transfecção de outro gene que participa da via de defesa antioxidante, como por exemplo a enzima triparedoxina peroxidase em parasitos superexpressores de FeSOD-A de *L. (V.) braziliensis* pode ajudar a elucidar os mecanismos de resistência ao SbIII.

Ensaio de atividade enzimática da SOD e transfecção dos gene FeSOD-A nas linhagens sensíveis e resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* irá auxiliar no entendimento da participação dessa enzima no mecanismo de resistência ao SbIII nessas espécies de Leishmania.

Para melhor investigar a participação da enzima SOD na resistência ao estresse oxidativo e na infectividade dos parasitos em macrófagos, ensaios *in vitro* utilizando os clones superexpressores de FeSOD-A e células THP-1 deverão ser realizados.

- **KMP-11:**

A presença de dois transcritos do gene KMP-11 na análise de *Northern blot* deve ser melhor investigada utilizando PCR com iniciadores que amplifiquem as regiões 5'UTR e 3'UTR do gene.

Nos ensaios de infectividade utilizando os parasitos selvagens de *L. (V.) braziliensis* superexpressores em células THP-1 foi avaliado o número de macrófagos infectados. Uma melhor resposta da superexpressão da proteína KMP-11 na virulência dos parasitos pode ser obtida pela quantificação do número de parasitos por macrófagos, pois a proteína pode estar envolvida na multiplicação dos parasitos no interior da célula hospedeira. Posteriormente iremos também avaliar a expressão da proteína KMP-11 nas formas amastigotas.

Nos ensaios *in vivo* utilizando camundongos nocaute para interferon- γ observamos que clone 6 (LbrWTS + pIR1-BSD_KMP-11) apresentou menor virulência quando comparado ao clone 7. Para investigar as causas da diferença encontrada entre os dois clones podemos quantificar a carga parasitária da lesão e determinar a expressão da proteína KMP-11 na infecção. Além disto, seria importante avaliar um maior número de clones.


Na linhagem *L. (L.) infantum chagasi* resistente observamos maior expressão da proteína KMP-11. Ensaio de transfecção podem ser realizados para investigar se parasitos da linhagem selvagem de *L. (L.) infantum chagasi* superexpressores de KMP-11 irão apresentar alteração no fenótipo de resistência ao antimonial.

Para melhor investigar a participação da proteína KMP-11 na virulência dos parasitos, experimentos utilizando parasitos mutantes deficientes para KMP-11 e ensaios utilizando cisplatina, fármaco transportado pela membrana plasmática seriam importante serem realizados para detectar possíveis alterações no fenótipo de resistência ao SbIII e avaliar o transporte de solutos nesses parasitos.

9. ANEXOS

ANEXO I

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene FESOD-A de LgWTS X *Leishmania (V.) braziliensis* (XM_001562044.2)

> [ref|XM_001562044.2](#)  *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 iron superoxide dismutase (FESODA) mRNA, complete cds
Length=693

GENE ID: 5413072 FESODA | iron superoxide dismutase
[*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904] (10 or fewer PubMed links)

Score = 1236 bits (669), Expect = 0.0
Identities = 685/693 (99%), Gaps = 0/693 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   ATGCTCCGCCGTGTCTCCATAAAGACGGTGATGGCCACCGCCGCCGTCCACGCTTCCTTT 60
          |||
Sbjct 1   ATGCTCCGCCGTGTCTCCATAAAGACGGTGATGGCCACCGCCGCCGTCCACGCTTCCTTT 60

Query 61  CTGAGCTACCACAGCCTGCCGGAGCTTCAGTACCCGGCCGAAGTGCCGAAGCTCGAGTAC 120
          |||
Sbjct 61  CTGAGCTACCACAGCCTGCCGGAGCTTCAGTACCCGGCCGAAGTGCCGAAGCTCGAGTAC 120

Query 121 AGCTATGCGGACGGCATCAAGCCCGTCTTCAGCGCCAGGCAAGTGGCGCTGCACTACACG 180
          |||
Sbjct 121 AGCTATGCGGACGGCATCAAGCCCGTCTTCAGCGCCAGGCAAGTGGAGCTGCACTACACG 180

Query 181 AAACACCACAAGGCGTACGTGGATAAGCTAAACACGCTTGGCACAGGCTACGAGGGGAAG 240
          |||
Sbjct 181 AAACACCACAAGGCGTACGTGGATAAGCTAAACACGCTTGGCACAGGCTACGAGGGGAAG 240

Query 241 CCGATTGAAGAGATCATTAAAGACTACCAACGGAATCGCTGCGAACACCGTTCTCTTCAAC 300
          |||
Sbjct 241 CCGATTGAGGAGATCATTAAAGACTACCAACGGAATCGCCGCGAACACCGTCTCTTCAAC 300

Query 301 CAGGCCCTCTCAGCACTTCAACCACACTTTCTTCTGGAAATGCCTGGTGCCGGGTGGCAAG 360
          |||
Sbjct 301 CAGGCCCTCTCAGCACTTCAACCACACTTTCTTCTGGAAATGCCTAGCGCCGGGTGGCAAG 360

Query 361 GCCATGCCGAAGCCGCTCGAGGCCGCCATCGCGAAGCAGTTTGAAGCGTTGACGACTTC 420
          |||
Sbjct 361 GCCATGCCGAAGCCGCTCGAGGCCGCCATCGCGAAGCAGTTTGAAGCGTTGACGACTTC 420

Query 421 AAGTCAICTTTTTCAGCAGGCAGGCATGAACAACCTTTGGCTCTGGCTGGACGTGGCTCTGC 480
          |||
Sbjct 421 AAGTCAICTTTTTCAGCAGGCAGGCATGAACAACCTTTGGCTCTGGCTGGACGTGGCTCTGC 480

Query 481 GTCAACCCCAAGACGACAGAGCTTTTGATCGATAACACGAGCAACCGGGCTGCCAGTG 540
          |||
Sbjct 481 GTCAACCCCAAGACGAGAGAACCTTTTGATCGATAACACGAGCAACCGGGCTGCCAGTG 540


Query 541 ACTGCTGGCATGCGCCCGATCTTCACAGCCGACGTGTGGGAGCACGCCTATTACAAAGAC 600
          |||
Sbjct 541 ACTGCTGGCATGCGCCCGATCTTCACAGCCGACGTGTGGGAGCACGCCTATTACAAAGAC 600


Query 601 TTCGAGAACCGGCGCGCAGACTAICTGAAGGAGATATGGCAGGTTGTCAACTGGGAGTAC 660
          |||
Sbjct 601 TTCGAGAACCGGCGCGCAGACTAICTGAAGGAGATATGGCAGGTTGTCAACTGGGAGTAC 660

Query 661 GTCGCCCAGATGTACAGTAGGGCTATCAAGTAA 693
          |||
Sbjct 661 GTCGCCCAGATGTACAGTAGGGCTATCAAGTAA 693
```

ANEXO II

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene FESOD-A de LgWTS X *Leishmania (L.) infantum chagasi* (XM_001463334.1)

> [ref|XM_001463334.1](#)  *Leishmania infantum* JPCM5 iron superoxide dismutase (FESODA) mRNA, complete cds

[ref|XM_003858547.1](#)  *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase (LDBPK_080300) mRNA, complete cds
Length=693

GENE ID: 5066768 FESODA | iron superoxide dismutase [*Leishmania infantum* JPCM5]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 520 bits (281), Expect = 8e-144
Identities = 544/675 (81%), Gaps = 2/675 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ATGCTCCGCCGTGTCTCCAT-AAAGACGGTGATGGCCACCGCCCGCTCCACGCTTCCTT 59
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1 ATGTTCCGCCGCTCTCGATGAAAG-CCGCCACGGCCACCGCTCCCGTCGGGTTTTTCGTT 59

Query 60 TCTGAGCTACCACAGCCTGCCGGAGCTTCAGTACCCGGCCGAAGTGCCGAAGCTCGAGTA 119
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 60 CCTGTGCTACCATACCCTTCCTCATCTTCGGTACCCGGCCGAGCTGCCGACGCTCGGCTT 119

Query 120 CAGCTATGCGGACGGCATCAAGCCCCTTCAGCGCCAGGCAAGTGGCGCTGCACTACAC 179
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 120 CAACTACAAGGACGGCATCCAGCCCCTCATGAGCTCCCGTCAGTTGGAGCTGCACTACAA 179

Query 180 GAAACACCACAAGGCGTACGTGGATAAGCTAAACACGCTTGGCACAGGCTACGAGGGGAA 239
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 180 GAAGCACCACAGCGCTACGTGGACAAGTTGAACACGCTCGGCAAGGGCTGCGAGGGGAA 239

Query 240 GCCGATTGAAGAGATCATTAAGACTACCAACGGAATCGCTGCGAACACCGTTCTCTTCAA 299
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 240 GACGATTGAGGAGATCATCTTGGCGACCAGCGGCAGCACTGAGAGCAAGGTCATGTTCAA 299

Query 300 CCAGGCCTCTCAGCACTTCAACCACACTTTCTTCTGGAAATGCCTGGTGCCGGGTGGCAA 359
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 300 CCAGGCCGCTCAGCACTTCAACCATTCTTCTTCTGGAAAGTGCCTGTCGCCTGGTGGCAA 359

Query 360 GGCCATGCCGAAGCCGCTCGAGGCCGCCATCGCGAAGCAGTTTGGAAAGCGTTGACGACTT 419
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 360 GCCGATGCCGAAGACGCTCGAGAATGCCATCGCGAAGCAGTTTCGGAAGCGTCGACGACTT 419

Query 420 CAAGTCATCTTTTTCAGCAGGCAGGCATGAACAACCTTTGGCTCTGGCTGGACGTGGCTCTG 479
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 420 CACGGTTTTCTTCCAGCAGGCCGGCGTGAACAACCTTTGGCTCTGGCTGGACGTGGCTCTG 479

Query 480 CGTCAACCCCAAGACGACAGAGCTTTTGATCGATAACACGAGCAACGCGGGCTGCCAGT 539
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 480 CGTCGATCCCGGACGAAGGAGCTTCGCATCGACAACACGAGCAACGCGGGCTGCCCGCT 539

Query 540 GACTGCTGGCATGCGCCCGATCTTCACAGCCGACGTGTGGGAGCACGCCTATTACAAAGA 599
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 540 GACCTCTGGCTTGCGCCCATCTTCACCGCTGATGTGTGGGAGCACGCCTACTACAAAGA 599

Query 600 CTTGAGAACC GGCGCGCAGACTATCTGAAGGAGATATGGCAGGTTGTCAACTGGGAGTA 659
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 600 CTTGAGAACC GGCGCGGACTACCTGAAAGAGCTCTGGCAGATCGTCGACTGGGAGTT 659

Query 660 CGTCGCCAGATGTA 674
      ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 660 TGTCGCCAGATGTA 674
```


ANEXO III

Alinhamento da sequência de aminoácidos de FESOD-A de LgWTS X *Leishmania (V.) braziliensis* (XP_001562094.1)

> [ref|XP_001562094.1](#) **GM** iron superoxide dismutase [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]
[emb|CAM37121.1](#) **G** iron superoxide dismutase [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]
Length=230

GENE ID: 5413072 FESODA | iron superoxide dismutase
[Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904] (10 or fewer PubMed links)

Score = 480 bits (1236), Expect = 9e-171, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 227/230 (99%), Positives = 227/230 (99%), Gaps = 0/230 (0%)

```
Query 1 MLRRVSIKTMATAAVHASFLSYHSLPELQYPALPKLEYSYADGIKPVFSARQVALHYT 60
Sbjct 1 MLRRVSIKTMATAAVHASFLSYHSLPELQYPALPKLEYSYADGIKPVFSARQVELHYT 60

Query 61 KHHKAYVDKLNLTGTGYEGKPIEEIIKTTNGIAANTVLFNQASQHFNHTFFWKCLVPGGK 120
Sbjct 61 KHHKAYVDKLNLTGTGYEGKPIEEIIKTTNGIAANTVLFNQASQHFNHTFFWKCLAPGGK 120

Query 121 AMPKPLEAAIAKQFGSVDDFKSSFQQAGMNNFGSGWTWLCVNPKTTELLIDNTSNAGCPV 180
Sbjct 121 AMPKPLEAAIAKQFGSVDDFKSSFQQAGMNNFGSGWTWLCVNPKTRELLIDNTSNAGCPV 180

Query 181 TAGMRPIFTADVWEHAYYKDFENRRADYLKEIWQVNNWEYVAQMYSRAIK 230
Sbjct 181 TAGMRPIFTADVWEHAYYKDFENRRADYLKEIWQVNNWEYVAQMYSRAIK 230
```

ANEXO IV

Alinhamento da sequência de aminoácidos de FESOD-A de LgWTS X *Leishmania (L.) infantum chagasi* (XP_001463371.1)

```
>[ref|XP_001463371.1] GM iron superoxide dismutase [Leishmania infantum JPCM5]
  GENE ID: 5066768 FESODA | iron superoxide dismutase [Leishmania infantum JPCM5]
  (10 or fewer PubMed links)

  Score = 375 bits (963), Expect = 4e-129, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 170/230 (74%), Positives = 194/230 (84%), Gaps = 0/230 (0%)

Query 1 MLRRVSIKTVMATAAVHASFLSYHSLPELQYPAELPKLEYSYADGIKPVFSARQVALHYT 60
      M RRVVS+K ATA V SFL YH+LP L+YPAELP L ++Y DGI+PV S+RQ+ LHY
Sbjct 1 MFRRVSMKAATATAPVGFSLCYHTLPHLRYPAELPTLGFNYKDGIQVMSSRQLELHYK 60

Query 61 KHKKAYVDKLNLTGTYEGKPIEEIIKTTNGIAANTVLEFNQASQHFNHFFWKCLVPGGK 120
      KHH AYVDKLNLTG G EGK IEEII I+G + V+FNQA+QHFNH+FFWKCL PGGK
Sbjct 61 KHHSAYVDKLNLTGKGCCEGKTIEEIIILATSGSTESKVMFNQAAQHFNHSFFWKCLSPGGK 120

Query 121 AMPKPLEAAIAKQFGSVDDFKSSFQQAGMNNFGSGWTWLCVNPKTTELLIDNTSNAGCPV 180
      MPK LE AIAKQFGSVDDF SFQQAG+MNNFGSGWTWLCV+P+T EL IDNTSNAGCP+
Sbjct 121 PMPKTLENAIAKQFGSVDDFTVVFQQAGVNNFGSGWTWLCVDPRTKELRIDNTSNAGCPL 180

Query 181 TAGMRPIFTADVWEHAYYKDFENRRADYLKEIWQVVNWEYVAQMYSRAIK 230
      T+G+RPIFTADVWEHAYYKDFENRRADYLKE+WQ+V+WE+V QMY +A K
Sbjct 181 TSGLRPIFTADVWEHAYYKDFENRRADYLKELWQIVDWEFVCQMYEKATK 230
```

ANEXO V

Alinhamento da sequência de aminoácidos de FESOD de *Leishmania* (V.) *braziliensis* (XP_001562094.1) X *T. cruzi* (XP_812157.1)

iron superoxide dismutase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]

Sequence ID: [ref|XP_812157.1](#) Length: 233 Number of Matches: 1

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 233 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
308 bits(790)	5e-103	Compositional matrix adjust.	146/236(62%)	181/236(76%)	9/236(3%)
Query 1	MLRRVSIKTVMATAAAVHASFLSYHSLPEL----	QYPAELPKLEYSYADGIKPVFSARQVE	56		
	MLRR ++ A + +SY +LP+L PAELPKL +++ DG PVFS RQ+E				
Sbjct 1	MLRRA---VNISIARGRMALMSYATLPDLLKPSGAPAE	LPKLGFNWKDGCAPVFSRQME	57		
Query 57	LHYTKHHKAYVDKLNLT-LGIGYEGKPIEEIIKTT	NGIAANTVLFNQASQHFNHTFFWKCL	115		
	LHYTKHHKAYVDKLN L GT Y+GK IEEII A LFNQA+Q	HFNHTF+++C+			
Sbjct 58	LHYTKHHKAYVDKLNALAGTTYDGKSIEEIIILAVAN	DAEKKGLFNQAAQHFNHTFYFRCI	117		
Query 116	APGGKAMPKPLEAAIAKQFGSVDDFKSSFQQAGMNN	FGSGWTWLCVNPKTR-ELLIDNTS	174		
	P GKAMPK LE+A+ QFGSV+ FK +F QAG+NNFGSG	WTWLCV+P + +L+IDNTS			
Sbjct 118	TPNGKAMPKSLESAVTAQFGSVEQFKDAFVQAGVNN	FGSGWTWLCVDPSNKNQLVIDNTS	177		
Query 175	NAGCPVTAGMRPIFTADVWEHAYYKDFENRRADYL	KEIWQVVNWEYVAQMYSRAIK	230		
	NAGCP+T G+RP+ DVWEHAYYKDFENRR DYLKEIW	V++WE+VA+M+++AIK			
Sbjct 178	NAGCPLTKGLRPVLAVDVWEHAYYKDFENRRPDYL	KEIWSVIDWEFVAKMHAQAIAIK	233		

ANEXO VI

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene KMP-11 LbWTS X *Leishmania (V.) braziliensis*

Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 35
Sequence ID: [emblFR799009.1](#) Length: 2012582 Number of Matches: 3

Range 1: 813811 to 814089 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
472 bits(255)	9e-130	271/279(97%)	0/279(0%)	Plus/Plus

Features: [kinetoplastid membrane protein-11](#)

```
Query 1 ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATGAGGAGTTCAAC 60
      |||
Sbjct 813811 ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATGAGGAGTTCAAC 813870

Query 61 AGGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG 120
      |
Sbjct 813871 AAGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG 813930

Query 121 TCGCCCAGATGAAGGAGCACTACGAGAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAACACACAGAG 180
      |||
Sbjct 813931 TCGCCCAGATGAAGGAGCACTACGAAAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAGCACACGGAG 813990

Query 181 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCAGAAGTTCGCCGAGCTG 240
      |||
Sbjct 813991 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCACAAGTTCGCTGAGCTG 814050

Query 241 CTCGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGGGCAAGTAA 279
      ||
Sbjct 814051 CTTGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGGGCAAGTAA 814089
```

Range 2: 816648 to 816926 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
472 bits(255)	9e-130	271/279(97%)	0/279(0%)	Plus/Plus

Features: [kinetoplastid membrane protein-11](#)

```
Query 1 ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATGAGGAGTTCAAC 60
      |||
Sbjct 816648 ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATGAGGAGTTCAAC 816707

Query 61 AGGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG 120
      |
Sbjct 816708 AAGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG 816767

Query 121 TCGCCCAGATGAAGGAGCACTACGAGAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAACACACAGAG 180
      |||
Sbjct 816768 TCGCCCAGATGAAGGAGCACTACGAAAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAGCACACGGAG 816827

Query 181 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCAGAAGTTCGCCGAGCTG 240
      |||
Sbjct 816828 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCACAAGTTCGCTGAGCTG 816887

Query 241 CTCGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGGGCAAGTAA 279
      ||
Sbjct 816888 CTTGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGGGCAAGTAA 816926
```

Range 3: 818564 to 818842 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
472 bits(255)	9e-130	271/279(97%)	0/279(0%)	Plus/Plus

Features: [kinetoplastid membrane protein-11](#)

```
Query 1 ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATGAGGAGTTCAAC 60
      |||
Sbjct 818564 ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATGAGGAGTTCAAC 818623

Query 61 AGGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG 120
      |
Sbjct 818624 AAGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG 818683

Query 121 TCGCCCAGATGAAGGAGCACTACGAGAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAACACACAGAG 180
      |||
Sbjct 818684 TCGCCCAGATGAAGGAGCACTACGAAAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAGCACACGGAG 818743

Query 181 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCAGAAGTTCGCCGAGCTG 240
      |||
Sbjct 818744 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCACAAGTTCGCTGAGCTG 818803

Query 241 CTCGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGGGCAAGTAA 279
      ||
Sbjct 818804 CTTGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGGGCAAGTAA 818842
```

ANEXO VII

Alinhamento da sequência de aminoácidos de KMP-11 LbWTS X *Leishmania (V.) braziliensis* (XP_001568323.1)

kinetoplastid membrane protein-11 [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]

Sequence ID: [ref|XP_001568323.1](#) Length: 92 Number of Matches: 1

[▶ See 6 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 92 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
178 bits(452)	4e-56	Compositional matrix adjust.	89/92(97%)	91/92(98%)	0/92(0%)
Query 1	MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPMKHEHYEKFERMIKEHTE				60
	MATTYEEF+AKLDRLDEEFN+KMQEQNAKFFADKPDESTLSPMKHEHYEKFERMIKEHTE				
Sbjct 1	MATTYEEFAAKLDRLDEEFNKKMQEQNAKFFADKPDESTLSPMKHEHYEKFERMIKEHTE				60
Query 61	KFNKKMHEHSEHFQKFAELLEQQKAAQYPGK		92		
	KFNKKMHEHSEHFK KFAELLEQQKAAQYPGK				
Sbjct 61	KFNKKMHEHSEHFHKFAELLEQQKAAQYPGK		92		

10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, H; SCHOTT, ET.; GAUTHIER, JD.; VASTA, GR. Superoxide dismutase from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Anal. Biochem.*, 2003, v. 318, p. 132-141.

ARIYANAYAGAM, MR.; FAIRLAMB, AH. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2001, v. 115, n. 2, p. 189-198.

ASHUTOSH; SUNDAR, SHYAM; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of medical microbiology*, 2007, v. 56, n. Pt 2, p. 143-53.

BAHRAMI, S.; HATAM, GR.; RAZAVI, M.; NAZIFI, S. In vitro cultivation of axenic amastigotes and the comparison of antioxidant enzymes at different stages of *Leishmania tropica*. *Tropical biomedicine*, 2011, v. 28, n. 2, p. 411-7.

BANNISTER, JV.; BANNISTER, WH.; ROTILIO, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry*, 1987, v. 22, n. 2, p. 111-180.

BEAMAN, L.; BEAMAN, BL. THE ROLE OF OXYGEN IN MICROBIAL AND HOST DEFENSE. *Proteus*, 1984, p. 27-48.

BERBERICH, C; MACHADO, G; MORALES, G. *et al.* The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Biochimica et biophysica acta*, 1998, v. 1442, n. 2-3, p. 230-7.

BERBERICH, C; MACHADO, G; MORALES, G *et al.* The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Biochimica et biophysica acta*, 1998, v. 1442, n. 2-3, p. 230-7.

BERBERICH, C; REQUENA, JM; ALONSO, C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Experimental parasitology*, 1997, v. 85, n. 1, p. 105-8.

BERMAN, JD; GALLALEE, JV; BEST, JM. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochemical Pharmacology*, 1987, v. 36, n. 2, p. 197-201.

BERMAN, JD; WADDELL, D; HANSON, BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1985, v. 27, n. 6, p. 916-920.

BERN, C; MAGUIRE, JH.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 2008, v. 2, n. 10, p. e313.

BEVERLEY, SM; CLAYTON, C. E. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1993, v. 21, p. 333-48.

BHATTACHARYYA, S; GHOSH,S; DASGUPTA, B; MAZUMDER, D; ROY, S. Chemokine-Induced Leishmanicidal Activity in Murine Macrophages via the Generation of Nitric Oxide. *Chemical Biology*, 2002, p. 1704-1708.

BRADFORD, M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, v. 72, n. 1-2, p. 248-254.

BRAY, PG.; BARRETT, MP.; WARD, SA.; KONING, HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, 2003, v. 19, n. 5, p. 232-239.

- BROCHU, C; WANG, J; MESSIER, N. *et al.* Antimony Uptake Systems in the Protozoan Parasite Leishmania and Accumulation Differences in Antimony-Resistant Parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003, v. 47, n. 10, p. 3073-3079.
- CALLAHAN, HL; PORTAL, AC.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, v. 41, n. 4, p. 818-822.
- CALLAHAN, HEATHER L; BEVERLEY, M. Heavy Metal Resistance: A New Role for P-glycoproteins in. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, v. 266, n. October 5, p. 18427-18430.
- CALLAHAN, HEATHER L; ROBERTS, WL.; RAINEY, PM.; BEVERLEY, STEPHEN M. Short communication The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1994, v. 68, p. 145-149.
- CAMPBELL-LENDRUM, D; DUJARDIN, JP.; MARTINEZ, E; FELICIANGELI, MD.; PEREZ, JE. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, v. 96, p. 159-162.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, SHYAM; HAILU, A. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology*, 2007, v. 5, n. 11, p. 873-82.
- CHEN J, RAUCH CA, WHITE JH, ENGLUND PT, C. N. The topology of the kinetoplast DNA network. *Cell*, 1995, v. 80, n. 1, p. 61-90
- CHURCH, G; GILBERT, W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci. [S.l: s.n.]*, 1984. p. 1991-5.
- CROAN, DG.; MORRISON, DA; ELLIS, JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and biochemical parasitology*, 1997, v. 89, n. 2, p. 149-59.
- CROFT, SL.; SUNDAR, S; FAIRLAMB, AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, v. 19, n. 1, p. 111-126.
- DANESH-BAHREINI, MA.; SHOKRI, J.; SAMIEI, A. *et al.* Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing *Leishmania* superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice. *International journal of nanomedicine*, 2011,v. 6, p. 835-42.
- DAVIES, C; LLANOS-CUENTAS, E; SHARP, S.; CANALES, J.; LEON, E. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms, response to treatment, and parasite isolation rate. *Clin Infect Dis*, 1997, v. 25, p. 302-310.
- DECUYPERE, S; VANAERSCHOT, M.; BRUNKER, K. *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS neglected tropical diseases*, 2012, v. 6, n. 2, p. e1514.
- DENTON, H; MCGREGOR, JC.; COOMBS, GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *The Biochemical journal*, 2004, v. 381, n. Pt 2, p. 405-412.
- DOCAMPO, R.; MORENO, SN. Free radical metabolism of anti-parasitic agents. *Fed. Proc*, 1986,v. 45, p. 2471-2476.
- EPHROS, M; BITNUN, A; SHAKED, P; WALDMAN, E; ZILBERSTEIN, D. Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony against *Leishmania donovani* Axenic Amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, v. 43, n. 2, p. 278-282.

FADILI, K. EL; DRUMMELSMITH, J; ROY, G; JARDIM, A.; OUELLETTE, MARC. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. *Experimental parasitology*, 2009, v. 123, n. 1, p. 51-7.

FERREIRA, CDS.; MARTINS, PS.; DEMICHELI, C. *et al.* Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals an international journal on the role of metal ions in biology biochemistry and medicine*, 2003, v. 16, n. 3, p. 441-446.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978, v. 201, n. 4359, p. 875-80.

FRÉZARD, F; DEMICHELI, C; FERREIRA, CS.; COSTA, MAP. Glutathione-Induced Conversion of Pentavalent Antimony to Trivalent Antimony in Meglumine Antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, v. 45, n. 3, p. 913-916.

GETACHEW, F; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. *Molecular and biochemical parasitology*, 2007, v. 154, n. 1, p. 62-9.

GETACHEW, F; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. *Molecular and biochemical parasitology*, 2012, v. 183, n. 1, p. 42-51.

GHOSH, S; GOSWAMI, S; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *The Biochemical journal*, 2003, v. 369, n. Pt 3, p. 447-52.

GOURBAL, B; SONUC, N; BHATTACHARJEE, H. *et al.* Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *The Journal of biological chemistry*, 2004, v. 279, n. 30, p. 31010-7.

GOYARD, S; BEVERLEY, S M. Blastocidin resistance: a new independent marker for stable transfection of *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*, 2000, v. 108, n. 2, p. 249-52.

GOYARD, S; SEGAWA, H.; GORDON, J. *et al.* An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2003, v. 130, n. 1, p. 31-42.

GRAHAM, S. V. of Stage-regulated Gene. *Parasitology Today*, 1995, v. 1, n. 5, p. 217-223.

GREEN, SJ.; MELTZER, MS.; HIBBS, JB.; NACY, CA. ACTIVATED MACROPHAGES DESTROY INTRACELLULAR *Leishmania* major amastigotes by an l-arginine-dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology*, 1990, v. 144, p. 278-283.

GRIMALDI, G; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1996, v. 91, n. 1, p. 37-42.

GUERIN, PJ.; OLLIARO, P; NOSTEN, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet infectious diseases*, 2002, v. 2, n. 9, p. 564-573.

GUPTA, S. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *The Indian journal of medical research*, 2011, v. 133, n. January, p. 27-39.

HAIMEUR, A; GUIMOND, C.; PILOTE, S. *et al.* Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Molecular microbiology*, 1999, v. 34, n. 4, p. 726-35.

HERWALDT, B. L. *Leishmaniasis*. *The Lancet*, 1999, v. 354, p. 1191-1199.

HILL, GC.; SHIMER, SP.; CAUGHEY, B; SAUER, LS. Growth of infective forms of *Trypanosoma rhodesiense* in vitro, the causative agent of African trypanosomiasis. *Science*, 1978, v. 202, p. 763-765.

HUYNH, C; ANDREWS, NW. NIH Public Access. 2008, v. 10, n. 2, p. 293-300.

JARDIM, A; HANSON, S; ULLMAN, B. *et al.* Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *The Biochemical journal*, 1995, v. 305, p. 315-20.

KAZEMI, B. Genomic Organization of *Leishmania* Species. *Iranian J Parasitol*, 2011, v. 6, n. 3, p. 1-18.

LACERDA, DI.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; NUNES, MP. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2012, v. 107, n. 2, p. 238-45.

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

LIARTE, DB.; MURTA, SMF. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. *Parasitology research*, 2010, v. 107, n. 1, p. 205-12.

LUKES, J; MAURICIO, IL.; SCHÖNIAN, G. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, v. 104, n. 22, p. 9375-80.

LÓPEZ-CÉSPEDES, A; LONGONI, SS; SAURI-ARCEO, CH. *et al.* *Leishmania* spp. epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *TheScientificWorldJournal*, 2012, v. 2012, p. 945871.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S; VIZUET-DE-RUEDA, JC.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, LE.; MANNING-CELA, RG.; FIGUEROA-ANGULO, EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, v. 2010, p. 525241.

MARZOCHI, MC; MARZOCHI, KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de saude publica Ministerio da Saude Fundacao Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saude Publica*, 1994, v. 10 Suppl 2, n. Figure 2, p. 359-375.

MARÍN, C; LONGONI, SS.; MATEO, H. The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and *Western blot*-ting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* naturally infected dogs. *Parasitology research*, 2007, v. 101, n. 3, p. 801–808.

MATOS, DCS.; FACCIOLI, LAP.; CYSNE-FINKELSTEIN, L. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, v. 105, n. 3, p. 341-7.

MCCORD, JM.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 1969, v. 244, n. 22, p. 6049-6055.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1º Edição ed. Brasil: [s.n.], 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar americana. 2º Edição ed. Brasil: [s.n.], 2007.

MUKHOPADHYAY, R; DEY, S; XU, N. *et al.* Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, v. 93, p. 10383-10387.

- MURRAY, HW.; BERMAN, JD; DAVIES, CR.; SARAIVIA, NG. Advances in leishmaniasis. [S.l.]: Elsevier, 2005, v. 366p. 1561-1577.
- NOGUEIRA, FB.; KRIEGER, MA; NIRDÉ, P. *et al.* Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benzimidazole. *Acta Trop.*, 2006, v. 100, p. 119-32.
- NOGUEIRA, F; RUIZ, J; ROBELLO, C; ROMANHA, A; MURTA, S. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benzimidazole. *Parasitol Res*, 2008, v. 104, n. 4, p. 835-44.
- OUELLETTE, M; PAPADOPOULOU, B. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol Today*, 1993, v. 9, n. 5, p. 150-3.
- OUELLETTE, M; BORST, P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res. Microbiol.*, 1991, v. 142, p. 737-746.
- OUELLETTE, M; HETTEMA, E; WUST, D; FASE-FOWLER, F. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. *EMBO Journal*, 1991, v. 10, n. 4, p. 1009-1016.
- PALATNIK-DE-SOUSA, CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 2008, v. 26, n. 44, p. 1709–1724.
- PARAMCHUK, WJ.; ISMAIL, SO.; BHATIA, A; GEDAMU, L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Molecular and biochemical parasitology*, 1997, v. 90, n. 1, p. 203-21.
- PEACOCK, CS.; SEEGER, K; HARRIS, D. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, 2007, v. 39, n. 7, p. 839-47.
- PEARSON, RD.; HARCUS, JL.; ROBERTS, D; DONOWITZ, GR. Differential survival of *Leishmania donovani* in human monocytes. *The Journal of Immunology*, 1983, v. 131, n. 4, p. 1994-1999.
- PEARSON, RD.; SOUSA, ADQ. STATE-OF-THE-ART CLINICAL ARTICLE Clinical Spectrum of Leishmaniasis. 1995, p. 1-13, 1996.
- PIACENZA, L; IRIGOÍN, F; ALVAREZ, MN *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *The Biochemical journal*, 2007, v. 403, n. 2, p. 323-34.
- PLEWES, K.; BARR, S.; GEDAMU, LASHITEW. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infection and immunity*, v. 71, n. 10, p. 5910-5920, 2003.
- PONTE-SUCRE, A. Kinetoplastid Biology and Disease their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2003, v. 10, p. 1-10.
- Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Disponível em: <<http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/>>.
- RAMÍREZ JR, BERBERICH C, JARAMILLO A, ALONSO C, V. I. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Vian-nia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998, v. 93, p. 247-254.
- ROACH, TIA.; KIDERLEN, AF; BLACKWELL, JM. Role of Inorganic Nitrogen Oxides and Tumor Necrosis Factor Alpha in Killing *Leishmania donovani* Amastigotes in Gamma Interferon-Lipopolysaccharide-Activated Macrophages from Lshs and Lshr Congenic Mouse Strains. *Microbiology*, 1991, v. 59, n. 11, p. 3935-3944.

ROBINSON, KA.; BEVERLEY, SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2003, v. 128, n. 2, p. 217-228.

SANGUINETTI, CJ; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, v. 17, p. 914-21.

SERENO, D; HOLZMULLER, P; MANGOT, I. *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, v. 45, n. 7, p. 2064-2069.

SHAKED-MISHAN, P; ULRICH, N; EPHROS, M; ZILBERSTEIN, D. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, v. 276, n. 6, p. 3971-3976.

SINGH, N; SINGH, RT; SUNDAR, S. Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. *The Journal of infectious diseases*, 2003, v. 188, n. 4, p. 600-7.

STEBECK, CE; BARON, GS; BEECROFT, RP; PEARSON, TW. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 from African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology*, 1996, v. 81, n. 1, p. 81-8.

STEBECK, CAROLINE E; BEECROFT, ROBERT P; SINGH, BN. *et al.* Kinetoplastid membrane protein- 11 (KMP- 11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Molecular and biochemical parasitology*, 1995, v. 71, p. 1-13.

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. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, v. 278, n. 27, p. 25120-25132.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical medicine international health TM IH*, 2001, v. 6, n. 11, p. 849-854.

SUNDAR, S; THAKUR, BB; TANDON, AK. *et al.* Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala-azar. *BMJ British Medical Journal*, 1994, v. 308, n. 6924, p. 307.

SÁNCHEZ-MORENO, M; GÓMEZ-CONTRERAS, F; NAVARRO, P. *et al.* In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2012, v. 67, n. 2, p. 387-97.

THOMAS, MC; GARCÍA-PÉREZ, JL; ALONSO, C; LÓPEZ, MC. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA and cell biology*, 2000, v. 19, n. 1, p. 47-57.

TOLEDO, JS; VASCONCELOS, EJ.R.; FERREIRA, T. R.; CRUZ, A. K. Using Genomic Information to Understand *Leishmania* Biology. 2010, p. 156-166.

World Health Organization. *Leishmaniasis*. Geneva WHO, [s.d.b]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis>. Acesso em Dez 2012.

WILKINSON, SR.; PRATHALINGAM, SR; TAYLOR, MC; AHMED, A.; HORN, D.; KELLY, J. M. Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic. Biol. Med*, 2006, v. 40, p. 198–209.

WILSON, ME; ANDERSEN, KA; BRITIGAN, B. E. Response of *Leishmania chagasi* Promastigotes to Oxidant Stress. *Media*, 1994, v. 62, n. 11, p. 5133-5141.

WYLLIE, S; CUNNINGHAM, ML; FAIRLAMB, AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of biological chemistry*, 2004, v. 279, n. 38, p. 39925-32.

WYLLIE, S; FAIRLAMB, AH. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochemical Pharmacology*, 2006, v. 71, p. 257-267.

YAN, S; WONG, ILK.; CHOW, LMC.; SUN, H. Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation. *Chemical Communications*, 2003, n. 2, p. 266-267.

ZHOU, Y; MESSIER, N; OUELLETTE, M; ROSEN, BP; MUKHOPADHYAY, R. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, v. 279, n. 36, p. 37445-37451.