

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

**“Análise genômica e transcriptômica de populações  
de *Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes  
aos antimoniais”**

**por**

**Daniel Barbosa Liarte**

**Belo Horizonte**

**Junho/2010**

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

**“Análise genômica e transcriptômica de populações de  
*Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes aos  
antimoniais”**

**por**

**Daniel Barbosa Liarte**

**Tese apresentada com vistas à obtenção do  
Título de Doutor em Ciências na área de  
concentração Biologia Celular e Molecular.  
Orientação: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta  
Co-orientação: Dr. Jerônimo Conceição Ruiz**

**Belo Horizonte**

**Junho/2010**

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

Tab.  
Cutter      **Liarte, Daniel Barbosa.**  
Ano         **2010**

**Análise genômica e transcriptômica de populações de *Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes aos antimoniais**

**Daniel Barbosa Liarte. – Belo Horizonte, 2010.**

X, 175f. 210 x 297 mm.

Bibliografia: f. 156 - 185

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

**1. Leishmanioses 2. Resistência a drogas 3. Genômica e pós-genômica**

**I. Análise genômica e transcriptômica de populações de *Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes aos antimoniais. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação). III. Ruiz, Jerônimo Conceição (Co-orientação)**

CDD – 22. ed.

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

**“Análise genômica e transcriptômica de populações de *Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes aos antimoniais”**

**por**

**Daniel Barbosa Liarte**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Profa. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Presidente)**

**Profa. Célia Maria Gontijo**

**Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes**

**Profa. Dra. Glória Regina Franco**

**Prof. Dr. José Franco da Silveira**

**Profa. Dra. Laila Alves Nahum (Suplente)**

Tese defendida em 23/06/2010

## DEDICATÓRIAS

Aos meus pais... guerreiros... heróis...  
Que enquanto puderam me carregar nos braços,  
jamais me deixaram cair!  
E quando não puderam mais me segurar...  
me ensinaram o valor de cada queda...  
E a glória de poder se levantar!

À minha esposa, Alexandra...  
Que com um sorriso respondeu a cada gota de suor,  
E com um abraço fez tudo isso valer a pena!  
Sem você não haveria tese...  
Pois somente contigo posso ser eu mesmo...

Ao Padre Pedro Balzi (*in memoriam*),  
Que me fez perceber que o mundo é bem maior do que meus olhos alcançam...  
E que mesmo um único homem pode transformar toda uma sociedade...  
...fica em paz meu amigo, tu combateste um bom combate,  
agora é a nossa vez...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me acompanhar sempre. Por me permitir alcançar mais este objetivo, guiando meus passos e pensamentos.

Agradeço em especial aos meus pais Francisca Soares Barbosa e Antonio Dias Liarte, pela força, pelo apoio e principalmente pelo exemplo de vida! Eu jamais poderia fraquejar diante das dificuldades da vida sendo filho de quem sou! Muito obrigado...

Agradeço aos meus irmãos Jaira, Jarder, Jardilson, David e Danilo. Muito obrigado pela união, pelo apoio nos momentos difíceis, carinho, amor, compreensão e dedicação sempre. Juntos a gente vence qualquer desafio!

Agradeço a minha eterna namorada, Alexandra, pelo amor, paciência e apoio durante toda esta etapa da minha vida. Ninguém nesse mundo sabe como você o que representa essa conquista, que acima de tudo é nossa!

Agradeço ao meu sogro Aucino Rodrigues Cajado e à minha sogra Isabel Maria de Siqueira Cajado, pela confiança, pela amizade e pelo apoio. Aprendi muito com vocês e só tenho o que agradecer por tudo.

Agradeço aos meus sobrinhos e afilhados, pelos sorrisos e toda essa alegria que me fortaleceu nos momentos de cansaço. A todos da minha família que de forma direta ou indireta colaboraram com mais essa conquista na minha vida.

Agradeço à Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, por ter me orientado durante esse período, pela sua atenção, presença e dedicação. Mais que isso, agradeço pela confiança no meu trabalho e pela impagável amizade ao longo de todos esses anos.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Jerônimo Conceição Ruiz. Muito obrigado pela assistência, encorajamento, apoio e principalmente, obrigado pela amizade e pelo voto de confiança.

Agradeço à Dra. Celia Maria Gontijo e à Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes pelas sugestões em meu exame de qualificação de tese, pois foram fundamentais para o trabalho aqui apresentado.

Agradeço aos participantes da banca examinadora por terem aceitado o meu convite e pelas contribuições valiosas que certamente irão engrandecer a minha Tese e a mim mesmo.

Agradeço à Patricia Flávia Quaresma e à Eliane de Moraes-Teixeira pela valiosa ajuda nos ensaios de infecção de *L. (L.) infantum chagasi* em camundongos e hamster.

Agradeço aos grandes amigos que fiz ao longo desses quase oito anos no CPqRR. À Maureen, uma das melhores pessoas que tive a honra de conhecer; à Rosana, Fernanda Haad, Fernanda Campos, Gabriela, Fátima e a todos os amigos e colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular.

Agradeço ao Dr. Alvaro José Romanha, uma das mentes mais brilhantes que já conheci, pelos conselhos, pelo apoio e pela amizade durante todo esse tempo.

Agradeço ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, representado pelo chefe Dr. Guilherme Correa Oliveira, e ao Centro de Pesquisas René Rachou, representado pelo diretor Dr. Rodrigo Correa Oliveira, pelo auxílio financeiro e estrutura para a realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos e colegas da Universidade Federal do Piauí, minha nova casa, pelo encorajamento e apoio na conclusão de mais uma etapa. Ao Dr. Carlos Henrique Nery Costa, pela orientação e amizade ainda na minha iniciação científica. Aos meus amigos de longa data hoje professores Heurison, Joxleide e Juciane. Vamos em frente amigos, temos muito que fazer!

Agradeço ao professor e grande amigo Francisco Soares, cujas aulas me inspiraram a seguir no estudo das ciências biológicas.

Agradeço ao coordenador do curso de pós-graduação Dr. Paulo Pimenta, e às agências financiadoras CNPq, FAPEMIG e FIOCRUZ.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a conquista de mais essa vitória na minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Epidemiologia e aspectos clínicos das Leishmanioses.....	20
1.2. Ciclo de vida do parasito.....	25
1.3. Quimioterapia das leishmanioses.....	26
1.3.1. Antimoniais.....	27
1.3.2. Anfotericina B.....	29
1.3.3. Miltefosina.....	31
1.3.4. Paromomicina.....	32
1.3.5. Outras drogas.....	34
1.4. Resistência a drogas.....	36
1.4.1. Resistência a múltiplas drogas (MDR) .....	37
1.4.2. Resistência aos antimoniais.....	38
1.4.3. Resistência a outras drogas.....	40
1.5. O genoma de <i>Leishmania</i> .....	42
1.6. Ferramentas de análise genômica e pós-genômica de moléculas em larga escala.....	44
1.7. Bancos de dados.....	46
1.7.1. Modelo Entidade de Relacionamento – MER.....	48
2. JUSTIFICATIVA.....	50
3. OBJETIVOS.....	51
3.1. Geral.....	51
3.2. Específicos.....	51
4. METODOLOGIA.....	53
4.1. CULTURA DE CÉLULAS.....	53
4.1.1. Cepas de <i>Leishmania</i> e condições de cultivo.....	53
4.1.2. Drogas utilizadas no estudo.....	53
4.1.3. Avaliação do crescimento celular e tolerância a drogas.....	53



4.1.4.	Indução de resistência a drogas.....	54
4.1.5.	Avaliação da estabilidade do fenótipo de resistência <i>in vitro</i> .....	55
4.1.6.	Avaliação da infectividade em camundongos C57BL/6 nocaute para IFN- $\gamma$ (IFN-KO) .....	55
4.1.7.	Estabilidade do fenótipo de resistência <i>in vivo</i> da população de <i>L. (V.) braziliensis</i> resistente ao SbIII.....	55
4.1.8.	Análise estatística.....	56
4.2.	BIOLOGIA MOLECULAR.....	56
4.2.1.	Extração de DNA.....	56
4.2.2.	Extração de RNA total.....	56
4.2.3.	Microarranjo de DNA.....	57
4.3.	BIOINFORMÁTICA.....	58
4.3.1.	Linguagem de Programação.....	58
4.3.2.	ARTEMIS e ACT (ARTEMIS Comparison Tool).....	58
4.3.3.	Agrupamento e alinhamento local de seqüências.....	58
4.3.4.	Identificação e representação de motivos.....	58
4.3.5.	Bancos de dados e genomas utilizados.....	59
4.3.6.	Criação do banco de dados relacional.....	60
4.3.7.	Inserção das predições no banco de dados relacional.....	60
5.	RESULTADOS.....	61
5.1.	Curvas de crescimento e tolerância ao SbIII.....	61
5.2.	Seleção <i>in vitro</i> das populações de <i>Leishmania</i> spp. resistentes ao SbIII .....	66
5.3.	Avaliação de estabilidade do fenótipo e resistência cruzada.....	68
5.4.	Avaliação da infectividade e estabilidade do fenótipo <i>in vivo</i> .....	71
5.5.	Indução de resistência à Anfotericina B.....	73
5.6.	Microarranjos de DNA.....	77
5.6.1.	Agrupamento dos oligonucleotídeos selecionados para ensaios de microarranjos de DNA genômico e cDNA.....	77
5.6.2.	Identificação dos contigs.....	80
5.7.	Estudos de amplificação/deleção genética em populações de <i>L. (V.) braziliensis</i> resistentes ao SbIII.....	82
5.7.1.	Genes identificados e localização cromossômica.....	83

5.7.2. Busca por padrões conservados de amplificação ou deleção gênica.....	91
5.7.3. Comparações com outras espécies de <i>Leishmania</i> .....	93
5.8. Estudos transcriptômicos de expressão genética diferencial em populações de <i>L. (V.) braziliensis</i> resistentes ao SbIII.....	96
5.8.1. Transcritos identificados.....	98
5.8.2. Anotação funcional dos transcritos identificados.....	103
5.8.3. Comparações com bancos de dados de alvos para drogas e com o genoma humano.....	107
5.8.4. Comparações com outras espécies de <i>Leishmania</i> .....	111
5.8.5. Análise comparativa entre os estudos genômicos e transcriptômicos de <i>L. (V.) braziliensis</i> : .....	116
5.9. Montagem de um banco de dados de resistência a drogas em <i>Leishmania</i> .....	120
6. DISCUSSÃO.....	125
7. CONCLUSÕES.....	143
8. ANEXOS.....	146
8.1. Artigo publicado.....	146
8.2. Perspectivas.....	154
8.3. Distribuição das categorias funcionais definidas no COG.....	155
9. REFERÊNCIAS.....	156

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Taxonomia de *Leishmania*. .....
- Figura 2:** Ciclo de vida de *Leishmania*. .....
- Figura 3:** Alguns dos bancos de dados mais utilizados em bioinformática. ....
- Figura 4:** Curvas de crescimento de quatro espécies de *Leishmania*. .....
- Figura 5:** Curvas de tolerância ao SbIII de quatro espécies de *Leishmania*. .....
- Figura 6:** Indução de resistência ao SbIII em populações de quatro espécies de *Leishmania*. .....
- Figura 7:** Susceptibilidade das populações selvagens (WTS) e resistentes ao SbIII (SbR) às drogas: anfotericina B (A), miltefosina (B), e paromomicina (C). .....
- Figura 8:** Patologia observada em camundongos C57BL/6 IFN- $\gamma$  KO infectados com populações de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* selvagens ou resistentes ao SbIII. ....
- Figura 9:** Curvas de tolerância à Anfotericina B de quatro espécies de *Leishmania*.  
.....
- Figura 10:** Tolerância à AMB em populações selvagens (WTS) e após seis (AMB-R<sup>1</sup>) e dezoito meses de seleção (AMB-R<sup>2</sup>). .....
- Figura 11:** Principais dados extraídos dos resultados de microarranjos de DNA. ....
- Figura 12:** Total de contigs identificados nas diferentes espécies de *Leishmania*. ....
- Figura 13:** Análise geral dos microarranjos de DNA genômico de populações de *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII. ....

- Figura 14:** Posição relativa das CDS amplificadas e deletadas de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, por cromossomo. ....
- Figura 15:** Representação esquemática da região amplificada do cromossomo 23 de *L. (V.) braziliensis*. ....
- Figura 16:** Representação esquemática da região amplificada dos cromossomos 17, 20 e 31 de *L. (V.) braziliensis*. ....
- Figura 17:** Anotação das CDS LbrM17\_V2.0100 e LbrM17\_V2.0110 visualizada utilizando o programa ARTEMIS. ....
- Figura 18:** Representação gráfica dos alinhamentos das sequências do motivo mais frequente nas regiões que flanqueiam CDS alteradas em *L. (V.) braziliensis*. ....
- Figura 19:** Distribuição das CDS alteradas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, comparadas a outras três espécies de *Leishmania*. ....
- Figura 20:** Análise geral dos microarranjos de cDNA de populações de *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII. ....
- Figura 21:** Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos identificados em *L. (V.) braziliensis*, segundo o nível de expressão. ....
- Figura 22:** Distribuição dos transcritos identificados de *L. (V.) braziliensis*, segundo as categorias funcionais do banco de dados COG. ....
- Figura 23:** Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, comparados a outras três espécies de *Leishmania*. ....
- Figura 24:** Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, comparados a outras três espécies de *Leishmania*. ....

**Figura 25:** Anotação estrutural e funcional de 14 genes selecionados com base nos resultados de microarranjos de DNA genômico e cDNA, além de comparações com o banco de dados Drug\_Bank. ....

**Figura 26:** Modelo conceitual do banco de dados. ....

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Síndromes clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses. ....

**Tabela 2:** Espécies e cepas de *Leishmania* utilizadas neste estudo. ....

**Tabela 3:** Sensibilidade ao SbIII e coeficiente de resistência de populações selvagens (WTS) e com resistência induzida *in vitro* ao SbIII (SbR) de quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. ....

**Tabela 4:** Dados gerais sobre os microarranjos de DNA. ....

**Tabela 5:** Distribuição de oligonucleotídeos e sequências genômicas de *L. (L.) major* agrupadas por contig. ....

**Tabela 6:** CDS com maior número de cópias amplificadas ou deletadas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII. ....

**Tabela 7:** CDS identificadas em *L. (V.) braziliensis* amplificadas ou deletadas em mais de uma espécie de *Leishmania*. ....

**Tabela 8:** Análise geral dos microarranjos de cDNA. ....

**Tabela 9:** Transcritos identificados por microarranjos de cDNA com aumento de expressão nas duas populações de *L. (V.) braziliensis*. ....

**Tabela 10:** Distribuição dos transcritos analisados por cromossomos de *L. (V.) braziliensis*. ....

**Tabela 11:** Transcritos identificados pelo menos 5,0 X mais ou menos expressos na população resistente ao SbIII de *L. (V.) braziliensis*. ....

**Tabela 12:** Anotação dos transcritos diferencialmente expressos, segundo o banco de dados ENZYME. ....

**Tabela 13:** Frequência e descrição dos alvos para drogas mais encontrados entre os transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis*. .....

**Tabela 14:** Drogas identificadas com maior frequência entre os 191 alvos reconhecidos pelos transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis*. .....

**Tabela 15:** Descrição das proteínas e drogas associadas aos transcritos diferencialmente expressos sem similaridade significativa com o proteoma humano e identificadas no banco de dados Drug\_Bank. .....

**Tabela 16:** Transcritos diferencialmente expressos em populações resistentes ao SbIII de três espécies de *Leishmania*. .....

**Tabela 17:** Genes identificados pelos microarranjos de DNA genômico e de cDNA, porém com resultados contraditórios. .....

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- A1 e A2 → Assíntotas inferior e superior, parâmetros da curva sigmoidal;
- ABC → “ATP-binding cassette”, superfamília de proteínas;
- ACT → “ARTEMIS Comparison Tool”, programa de bioinformática;
- AMB → Anfotericina B;
- AMB-R → Anfotericina B resistente, população de *Leishmania*;
- ATP → Adenosina trifosfato;
- BLAST → “Basic Local Alignment Sequence Tool”, programa de bioinformática;
- CAP3 → “Contig Assembly Program 3”, programa de bioinformática;
- CDC → Centro Norte Americano de Controle de Doenças;
- cDNA → DNA complementar;
- CDS → Seqüência codificante;
- CGH → “Comparative Genome Hybridization”, técnica de microarranjo de DNA;
- COG → “Cluster of Ortholog Groups”, banco de dados de genes ortólogos;
- DER → Diagrama de Entidades e Relacionamentos;
- DHFR-TS → Diidrofolato redutase – Timidilato sintase;
- DNA → Ácido desoxirribonucléico;
- EDTA → Ácido etilenodiaminotetracético;
- FT → Transportador de folato;
- gDNA → DNA genômico;
- gff → “General Feature Format”, formato de anotação de dados genômicos;
- HIV → Vírus da Imunodeficiência Humana;
- IC → Intervalo de Confiança;
- IC50 → Concentração Inibitória de 50%;
- kDNA → DNA do cinetoplasto;
- Lb\_SbR → *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, população de *Leishmania*;
- LC → Leishmaniose Cutânea;
- LMC → Leishmaniose Muco-Cutânea;
- LTA → Leishmaniose Tegumentar Americana;
- LV → Leishmaniose Visceral;
- MDR → “Multidrug Resistance”, fenômeno de resistência a múltiplas drogas;
- MER → Modelo de Entidades e Relacionamentos;
- MR → Modelo Relacional;
- mRNA → RNA mensageiro;



MRP → “Multidrug Resistance Protein”, proteína associada a MDR;  
MTX → Metotrexato;  
NR → “Non-redundant”, banco de dados de seqüências de aminoácidos;  
OMS → Organização Mundial de Saúde;  
ORF → “Open Read Frame”, moldura aberta de leitura;  
 $p$  → Coeficiente de decaimento, parâmetro da curva sigmoideal;  
PERL → “Practical Extration and Report Language”, linguagem de programação;  
*Pgp* → Fosfoglicoproteína;  
pH → Potencial Hidrogeniônico;  
PTR1 → Pteridina redutase 1;  
RNA → Ácido Ribonucléico;  
SbIII → Antimonial Trivalente;  
SbR → SbIII Resistente, população de *Leishmania*;  
SbR<sub>rev</sub> → SbIII Resistente cultivado sem droga, população de *Leishmania*;  
SbV → Antimonial Pentavalente;  
SDS → Duodecil sulfato de sódio;  
SGBD → Sistema de Gerenciamento de Bancos de Dados;  
SQL → “Structured Query Language”, linguagem para consultas de dados;  
TDR → Redutase dependente de tiol;  
® ou ™ → Marca registrada;  
TSH → Tripanotiona;  
UTR → Região não traduzida;  
WTS → População do tipo selvagem, população de *Leishmania*;  
X0 → Centro, parâmetro da curva sigmoideal;

**Unidades de medida:**

$b$  → Número de bases nucleotídicas (múltiplos Kb e Mb);  
 $g$  → Grama (submúltiplo  $\mu g$ );  
 $L$  → Litro (submúltiplos  $\mu L$  e mL);  
 $m$  → Metro (submúltiplo mm);  
 $M$  → Molaridade (submúltiplos  $\mu M$  e mM);  
 $m^2$  → Metro quadrado (submúltiplo  $cm^2$ );  
°C → Grau Celsius  
 $t$  → Tempo (h – hora, min – minuto);  
 $xg$  → Gravidade;

## RESUMO

Na primeira parte desta tese selecionamos *in vitro* populações de *Leishmania Viannia guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. Leishmania amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* resistentes ao tartarato potássico de antimônio (SbIII) (Liarte & Murta, 2010). A concentração inibitória de 50% (IC50) destas populações foi de 4 a 20 vezes maior do que seus pares sensíveis. Nenhuma mudança na resistência foi observada em *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) infantum chagasi* após 37-47 passagens em meio na ausência de SbIII. Entretanto, uma diminuição de duas vezes foi observada no índice de resistência das populações *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Nenhuma das populações resistentes ao SbIII apresentou resistência cruzada a anfotericina B e miltefosina. Entretanto, as populações resistentes de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* foram também resistentes a paromomicina. Uma drástica redução na infectividade de camundongos foi observada nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Na segunda parte, analisamos a amplificação e deleção de genes e identificamos transcritos diferencialmente expressos nas populações de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao SbIII utilizando a metodologia do microarranjo de DNA. Ensaios de CGH (*comparative genomic hybridization*) permitiram a identificação de 124 CDS amplificadas e 128 CDS deletadas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII. Em *L. (V.) braziliensis* foi observada a amplificação de genes associados à região H e ampliações de regiões dos cromossomos 17, 20 e 31. Foram identificados 560 transcritos mais expressos e 397 transcritos menos expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII. Dados de anotação funcional sugerem um aumento na expressão de transcritos associados à replicação e à transcrição do DNA e uma diminuição na expressão de transcritos associados ao metabolismo de lipídios, de carboidratos e ao transporte de proteínas. Análises em bancos de dados de drogas mostraram que 247 transcritos diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis* apresentam pelo menos um alvo para drogas. Destes 247, 15 possuem pouca similaridade com proteínas humanas sendo, portanto bons alvos para quimioterapia. Um banco de dados de resistência a drogas em *Leishmania* foi construído possibilitando a integração de todos os dados obtidos nesta tese. A análise integrada dos dados fenotípicos, genômicos e transcriptômicos estão permitindo estabelecer novas estratégias de pesquisa básica e aplicada, dessa forma contribuindo para o desenvolvimento de novas drogas para a quimioterapia das leishmanioses.

## ABSTRACT

In this thesis initially we selected *in vitro* populations from *Leishmania Viannia guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. Leishmania amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi* that were resistant to potassium antimony tartrate (SbIII). The resistance index of these populations varied from 4- to 20-fold higher than that of their wild-type counterparts. No change in the resistance indexes of *L. (V.) guyanensis* and *L. (L.) infantum chagasi* was observed after 37-47 passages in a culture medium without SbIII. In contrast, a decrease in the resistance index was observed for *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*. None of the antimony-resistant populations exhibited cross-resistance to amphotericin B and miltefosina. However, the resistant populations of *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi* were also resistant to paromomycin. A drastic reduction was observed in the infectivity in mice for the resistant *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* populations.

In the second part of this thesis we analyzed gene amplification and deletion and identified transcripts differentially expressed in *Leishmania* spp. populations susceptible and resistant to SbIII using DNA microarray methodology. CGH assays (*comparative genomic hybridization*) allowed the identification of 124 CDS amplified and 128 CDS deleted in the SbIII-resistant *L. (V.) braziliensis* population. The amplification of the H region and regions from chromosomes 17, 20 and 31 was observed in the SbIII-resistant population from *L. (V.) braziliensis*. We identified 560 up-regulated transcripts and 397 down-regulated transcripts in SbIII-resistant *L. (V.) braziliensis* population. Functional annotation data suggest an increased expression of transcripts related to DNA replication and transcription and a decreased expression of transcripts associated with metabolism of lipids and carbohydrates and transport of proteins. Drug bank analysis showed that 247 transcripts differentially expressed in SbIII-resistant *L. (V.) braziliensis* population present at least one target for drugs. 15 out of 247 transcripts present low similarity with human proteins being then, a good target for chemotherapy. A database of drug resistance in *Leishmania* was constructed, allowing the integration of all data obtained in this thesis. The integrated analysis of phenotypic, genomic and transcriptomic data, is allowing to define new strategies for basic and applied research, thereby contributing to the development of new drugs for the Leishmaniasis chemotherapy.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Epidemiologia e aspectos clínicos das Leishmanioses:

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida; Família Trypanosomatidae). Elas incluem um conjunto de síndromes com características clínico-patológicas representadas principalmente pelas formas: visceral, cutânea e muco-cutâneo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as seis maiores doenças tropicais nos países em desenvolvimento. Estima-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados e cerca de 350 milhões em risco de infecção (CDC, 2007). Parasitos do gênero *Leishmania* estão dispersos por todos os continentes, exceto Antártica. Estima-se que a incidência mundial de leishmaniose visceral seja de 500.000 casos por ano, sendo que 90% destes ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Por outro lado, estima-se que a incidência mundial de leishmaniose cutânea seja de 1,0 a 1,5 milhões de casos por ano, sendo que 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Paquistão, Algeria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. As leishmanioses estão associadas com aproximadamente 2,4 milhões de anos de vida perdidos e 70.000 mortes por ano (revisado por Murray *et al.*, 2005).

Consideradas primariamente como zoonoses, as leishmanioses podem acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose (CDC, 2007). No entanto, ciclos antroponóticos da doença já são observados na Turquia e Irã (Turgay *et al.*, 2006; Sadeghian *et al.*, 2007; Akkafa *et al.*, 2008). O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, fêmeas de dípteros pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos hospedeiros mamíferos, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplicam obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. Nos vetores, as formas flageladas promastigotas das leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo (revisado por Gontijo & Carvalho, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado a reativação de diversos focos das leishmanioses na Itália, China, Brasil e Israel. Além destes países, o surgimento de novos focos epidêmicos tem sido relatado em áreas de Israel e Marrocos. Outros estudos indicam uma subestimação da severidade dessas infecções e seu impacto sócio-econômico. Além disso, a co-infecção de indivíduos com *Leishmania* e o vírus da

imunodeficiência humana (HIV) tem se tornado um problema cada vez maior tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (revisado por Bañuls *et al.*, 2007).

A classificação de *Leishmania* foi baseada inicialmente em critérios ecológicos, tais como distribuição geográfica do parasito, espécie do vetor, tropismo, propriedades antigênicas e manifestações clínicas. Entretanto, estudos bioquímicos e moleculares mostraram que critérios patológicos e geográficos estavam frequentemente inadequados. Diante disso, outros critérios passaram a ser utilizados (como polimorfismos exibidos por marcadores de DNA do cinetoplasto (kDNA), proteínas ou antígenos). Os dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* foram separados com base na localização do parasito no intestino do vetor (Lainson & Shaw, 1987). Rioux e colaboradores (1990) utilizaram análises isoenzimáticas para definir complexos de espécies dentro dos subgêneros (revisado por Bañuls *et al.*, 2007).

A classificação das espécies também foi inicialmente baseada em vários critérios extrínsecos, como características clínicas, geográficas e biológicas. Por exemplo, *L. (V.) guyanensis*, isolada na Guiana, e *L. (L.) infantum*, isolada de uma criança na Tunísia. Desde os anos 70, porém critérios intrínsecos tais como dados genéticos, bioquímicos e imunológicos passaram a ser utilizados para definir espécies de *Leishmania*. O uso dessas técnicas levou à publicação de um esquema taxonômico dos parasitos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990). Novos métodos de detecção, isolamento e identificação genética resultaram em um aumento substancial no número de espécies descritas (revisado por Bañuls *et al.*, 2007). A Figura 1 ilustra um esquema moderno de classificação de *Leishmania*.

Pelo menos 21 espécies de *Leishmania* infectam humanos (CDC, 2007). O conjunto de síndromes que elas causam pode ser categorizado inicialmente em Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV é a forma mais grave da doença, na qual os parasitas deixam o local de inoculação e proliferam no fígado, baço e medula óssea, levando a imunossupressão do hospedeiro e até morte se não for tratada. A LT pode ainda ser subdividida em Leishmaniose Cutânea (LC), onde os parasitas permanecem no local de inoculação e causam uma (Leishmaniose Cutânea Localizada) ou várias ulcerações (Leishmaniose Cutânea Disseminada); Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), com lesões em placas infiltradas, nódulos, tubérculos associados a exulcerações envolvendo grandes áreas do tegumento cutâneo e Leishmaniose Muco-Cutâneo (LMC), quando ocorre uma destruição crônica de mucosas (Marsden, 1986; Marzochi, 1992; Costa, 1998).

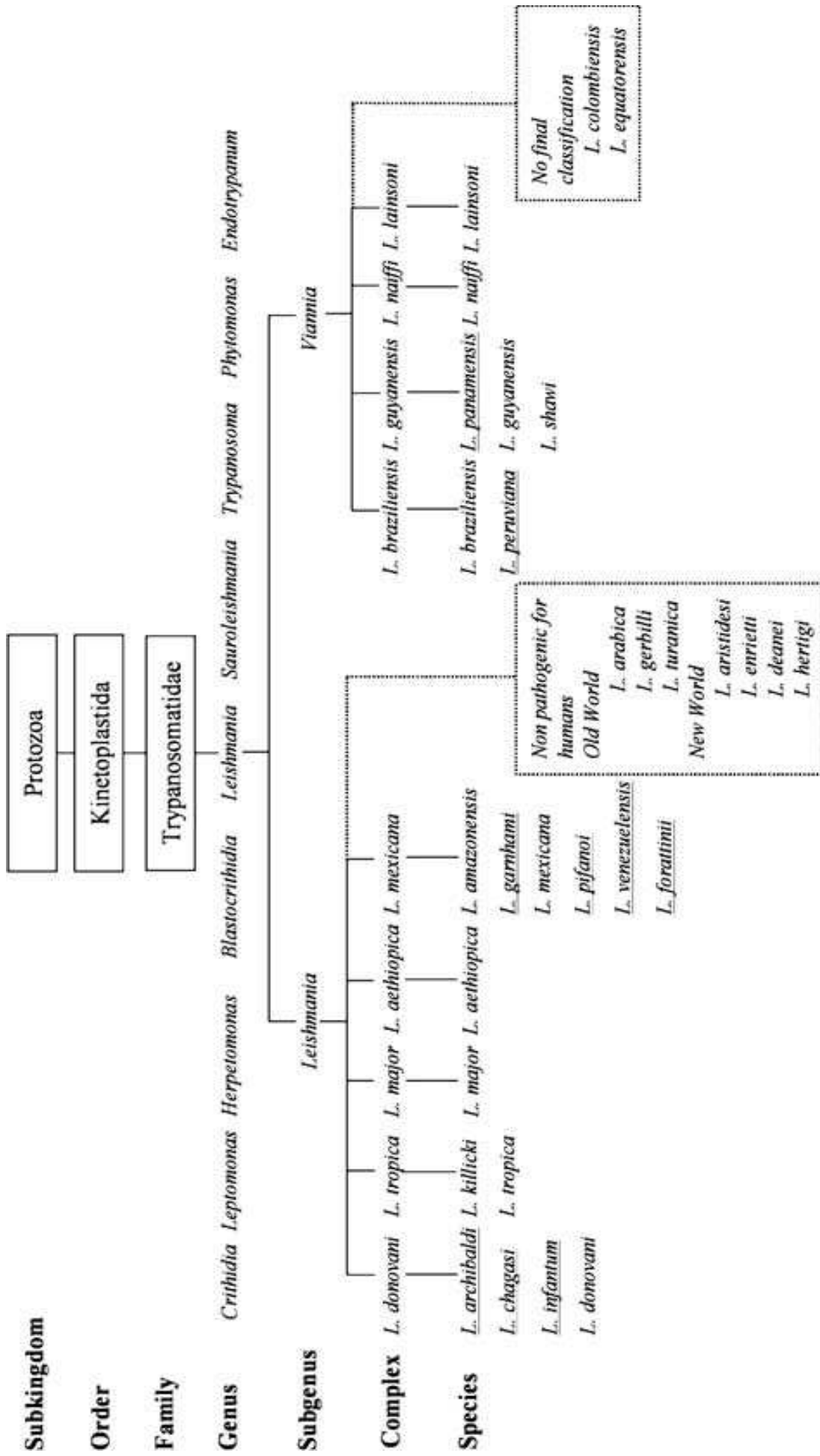


Figura 1: Taxonomia de *Leishmania*. A Figura é baseada no esquema publicado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990) com modificações feitas por Bañuls et al., 2007). Espécies sublinhadas estão ou têm sido questionadas.

Embora características genéticas do hospedeiro e do vetor, resposta imunológica e fatores ambientais exerçam influência no curso da infecção (Lipoldova & Demant, 2006), acredita-se que o fator principal que determina a apresentação clínica da doença seja a espécie do parasito. Por exemplo, no Novo Mundo, *L. (L.) infantum chagasi* é o agente causador da LV, enquanto *L. (L.) amazonensis* é responsável pela LC e LCD; e *L. (V.) braziliensis* é responsável pela LC e LMC. Algumas das principais espécies causadoras dessas formas clínicas estão apresentadas na Tabela 1. Na Tabela também estão destacadas as espécies estudadas neste trabalho.

Tabela 1: Síndromes clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses.

<b>Síndromes Clínicas</b>	<b>Subgênero</b>	<b>Espécies<sup>a</sup></b>	<b>Epidemiologia</b>
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i>	Índia, Mediterrâneo
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania</i>	<b><i>L. (L.) infantum chagasi</i></b>	América Latina
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) major</i> , <i>L. (L.) tropica</i>	Ásia, África, Índia, Oriente Médio
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) mexicana</i> , <b><i>L. (L.) amazonensis</i></b>	América Latina
Leishmaniose Cutânea	<i>Viannia</i>	<i>L. (V.) panamensis</i> , <b><i>L. (V.) braziliensis</i></b> , <b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>	América Latina
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania</i>	<b><i>L. (L.) amazonensis</i></b>	América Latina
Leishmaniose Muco-cutânea	<i>Viannia</i>	<b><i>L. (V.) braziliensis</i></b> , <i>L. (V.) panamensis</i>	América Latina

<sup>a</sup> → em negrito estão destacadas as espécies utilizadas nesse estudo.

No Brasil, *L. (L.) infantum chagasi* é a espécie responsável pela LV e o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* é o seu principal vetor (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). A LV se encontra em franca expansão. Desde a década de 90 vem ocorrendo o aumento significativo do número de casos da doença, sendo que em grandes cidades brasileiras como Belo Horizonte e Teresina, ela já se tornou endêmica. A dificuldade em se controlar o vetor, sacrificar os reservatórios domésticos, bem como o diagnóstico preciso dos pacientes tem levado a ocorrência cada vez mais freqüente de óbitos. (Werneck *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2001; Gontijo & Melo, 2004; Costa, 2008).

Já as principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) são seis (revisado por Gontijo & Carvalho, 2003):

1. *L. (V.) braziliensis*: é a espécie mais prevalente no homem e pode causar lesões cutâneas e mucosas. É encontrada em todas as zonas endêmicas do País, desde o norte até o sul, tanto em áreas de colonizações antigas ou recentes, estando geralmente associada à presença de animais domésticos. É transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia*, dentre outras;
2. *L. (V.) guyanensis*: causa sobretudo lesões cutâneas. Ocorre na margem norte do Rio Amazonas em áreas de colonização recente, estando associada com desdentados e marsupiais. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são a *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani*;
3. *L. (V.) naiffi*: ocorre na Amazônia, nos Estados do Pará e Amazonas, tendo o tatu como reservatório natural. O parasita causa LTA de evolução benigna e seus principais vetores são a *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. ayrozai*;
4. *L. (V.) shawi*: responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará, tem como reservatórios vários animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos e como vetor a *Lu. whitmani*;
5. *L. (V.) lainsoni*: registrada apenas na Amazônia, tem a paca como animal suspeito de reservatório natural e como vetor a *Lu. ubiquitalis*;
6. *L. (L.) amazonensis*: agente etiológico de LTA, incluindo a forma anérgica ou leishmaniose cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais e a *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca*, os principais vetores.

Outra questão importante é a relevância dos hospedeiros vertebrados na epidemiologia das leishmanioses. Diferentes reservatórios domésticos e silvestres, como caninos, felinos, bovinos, eqüinos e roedores, têm sido identificados. Porém a importância epidemiológica destes varia de acordo com a região (Werneck *et al.*, 2002; Hatam *et al.*, 2009; Diakou *et al.*, 2009; Quinnell & Courtenay, 2009; Lobsiger *et al.*, 2010; Akhavan *et al.*, 2010). Os cães são considerados os mais importantes reservatórios domésticos e certamente contribuem para a mudança no perfil epidemiológico da LV. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. Além disso, a eliminação de cães soropositivos, embora não seja suficiente para erradicar a LV, contribui para diminuir significativamente o número de casos humanos



(Marzochi *et al.*, 1994; Ashford, 1996; Ashford *et al.*, 1998). Isso porque o cão apresenta uma alta susceptibilidade de infecção, intenso parasitismo cutâneo, e proximidade com o homem, tanto em áreas rurais quanto urbanas (Deane & Deane, 1954; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Na Europa, estudos recentes têm externado a preocupação com a expansão da leishmaniose canina (Chamailié *et al.*, 2010; Menn *et al.*, 2010; Galvez *et al.*, 2010). No ambiente silvestre, os principais reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (revisado por Quinnell & Courtenay, 2009).

## **1.2. Ciclo de vida do parasito:**

Durante seu ciclo de vida, parasitos do gênero *Leishmania* alternam entre hospedeiros vertebrados e vetores. No momento do repasto sanguíneo, ao picarem um animal infectado, flebotomíneos ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo do inseto ocorre o rompimento dos macrófagos e a liberação dos parasitos. Esses amastigotas então se diferenciam rapidamente em formas promastigotas procíclicas, que se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. Posteriormente, as formas promastigotas colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas (WHO, 2010).

A transmissão das leishmanioses para o hospedeiro vertebrado geralmente ocorre pela picada de fêmeas de insetos contendo parasitos infectantes que, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Entretanto, é provável que em algumas situações específicas, existam outras fontes de infecção e que o homem esteja envolvido na cadeia de transmissão, como por exemplo, no caso de pacientes imunodeficientes portadores do HIV (Arias *et al.*, 1996). Na epiderme do hospedeiro, estas formas infectantes são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento da célula, ocorrendo então a liberação das formas amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo (WHO, 2010). Resumidamente, o ciclo de vida de *Leishmania* spp. está representado na Figura 2:

# Leishmaniasis

(*Leishmania spp.*)

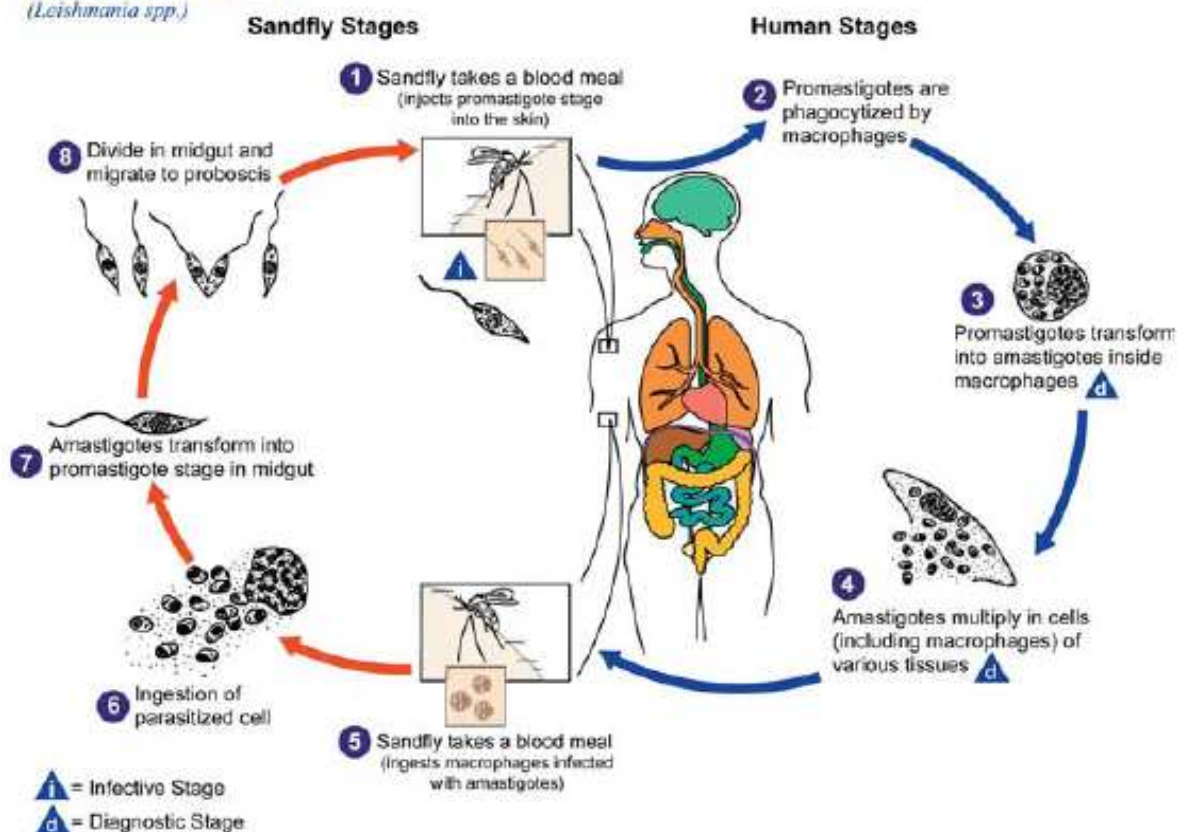


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania*. Fonte: WHO, 2010.

### 1.3. Quimioterapia das leishmanioses:

Diversos medicamentos têm sido usados no tratamento das leishmanioses, entre eles os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metilglucamina e estibogluconato sódico), as pentamidinas (isotionato e mesilato) e a anfotericina B (AMB). No Brasil, a quimioterapia das Leishmanioses se baseia na utilização do antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e da anfotericina B (Murray *et al.*, 2005). Quanto ao tratamento das leishmanioses, os principais obstáculos incluem: alta toxicidade, provocando efeitos adversos no paciente; custo elevado, considerando-se o sistema de saúde pública de países em desenvolvimento; a co-infecção *Leishmania* / HIV, com maior frequência de falhas terapêuticas e o surgimento de resistência em larga escala ao tratamento com antimonial pentavalente, principalmente na Índia (Murray 2001; Croft *et al.*, 2006). As drogas disponíveis não são consideradas ideais: são altamente tóxicas, caras ou simplesmente estão se tornando obsoletas devido ao aparecimento de resistência do parasito às drogas.

Outro grave problema observado na quimioterapia das leishmanioses é o tratamento de cães. Embora o tratamento com antimoniais pentavalentes e alopurinol seja permitido em alguns países, esta não é uma medida recomendada, pois não é eficaz em cães e traz vários problemas. As tentativas de tratamento da leishmaniose visceral canina, por meio de drogas tradicionalmente empregadas (antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol), tem apresentado baixa eficácia. Cães infectados tanto sintomáticos quanto assintomáticos possuem formas infectivas do parasito na pele e no sangue (Moshfe *et al.*, 2009). O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos e não previne a ocorrência de recidivas. Além disso, as drogas têm efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (Gramiccia *et al.*, 1992; Alvar *et al.*, 1994; Oliva *et al.*, 1995). No Brasil, estes fatores levaram o Ministério da Saúde a proibir o tratamento de cães com drogas de uso clínico em humanos (Portaria Interministerial Nº 1.426 de 11 de Julho de 2008).

### **1.3.1. Antimoniais:**

No Brasil, os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram utilizados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1912 por Gaspar Vianna. O tratamento obteve relativo sucesso, considerando que naquela época, 90% dos casos de leishmaniose evoluíam para óbito (Lainson, 1996). Esses compostos, no entanto apresentavam alta toxicidade e menor eficácia, comparados com os derivados pentavalentes (SbV) introduzidos na década de 40. Desde então, os antimoniais têm sido considerados como drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses em muitos países (Marsden 1985).

As duas formulações de SbV existentes no mercado (estibogluconato sódico e antimoniato de N-metilglucamina) aparentemente não apresentam diferenças quanto à eficácia terapêutica (Ouellette *et al.*, 2004). Entretanto, Amato e colaboradores (2007) realizaram uma revisão sistemática da terapia das leishmanioses e observaram diferenças significativas entre as duas formulações. Os autores observaram maiores índices de cura em pacientes com leishmaniose mucosa tratados com o antimoniato de N-metilglucamina do que em pacientes tratados com estibogluconato sódico. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>), que vem sendo distribuída pelo

Ministério da Saúde em ampolas de 5 ml, contendo 405mg de SbV. A dose recomendada e o tempo de duração do tratamento dependem de fatores como a síndrome clínica, condições de saúde do paciente e ocorrência de coinfeções. Em geral a dose recomendada é de 5 a 20mg/kg/dia (CRLeish-IPEC/FIOCRUZ, 2004).

Dependendo da dose e do tempo de administração, os antimoniais pentavalentes são bem tolerados. No entanto, podem surgir reações colaterais que vão desde incômodos como disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, dor no local da injeção e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária até reações adversas graves como arritmias cardíacas e pancreatite. O principal efeito colateral do antimoniato de N-metilglucamina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Este efeito é dependente da dose e tempo e se traduz por distúrbios de repolarização. Além disso, pode ocorrer a elevação das transaminases hepáticas e amilase que, no entanto, são reversíveis após o final do tratamento (Gasser *et al* 1994; Berhe *et al.*, 2001; Tracy & Webster Junior 2003).

Apesar de ser empregado no tratamento das leishmanioses há mais de 70 anos, o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está totalmente elucidado. Pacientes com leishmaniose e imunodeprimidos respondem fracamente aos antimoniais, apresentando falha e recidivas da ordem de 52% entre 1 e 36 meses após o tratamento (Desjeux 1999). Este resultado sugere que a maior eficácia dos antimoniais requer a atuação conjunta do sistema imunológico. Sabe-se que o SbV atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos (Herwaldt, 1999). Acredita-se que antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido em antimônio trivalente após sua administração (Roberts *et al* 1998). A redução pode ocorrer tanto no fagócito do hospedeiro quanto nas formas amastigotas do parasito, ou mesmo *in vitro* em sistemas axênicos (Shaked-Mishan *et al.*, 2001; Brochu *et al.*, 2003). Os antimoniais parecem interferir em formas amastigotas inibindo tanto a glicólise quanto a  $\beta$  oxidação dos ácidos graxos (Tracy & Webster Junior 2003). Outras possibilidades incluem a inibição de uma metaloproteinase zinco dependente (Bangs *et al* 2001), da enzima topoisomerase II (Chakraborty & Majunder, 1988) ou ainda da enzima fosfofrutoquinase (Berman *et al* 1985). Além destes, estudos recentes sugerem que o antimonial trivalente (SbIII) causa distúrbios no potencial tiol redox do parasito, o que levaria a sua morte (Wyllie *et al.*, 2004).

Por serem drogas potencialmente arritmogênicas, os antimoniais pentavalentes são contra-indicados em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores e drogas antiarrítmicas. Os antimoniais também são contra-indicados em pacientes com insuficiência renal ou hepática, em mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres da gestação e nos casos que apresentam alguma alteração no eletrocardiograma (Murray *et al.*, 2005). Assim, o modo de administração, a longa duração dos esquemas terapêuticos e a alta toxicidade da droga e o crescente problema da resistência a drogas (conforme será descrito adiante) são limitações importantes para o uso dos antimoniais.

### **1.3.2. Anfotericina B:**

A anfotericina B pertence ao grupo dos antibióticos poliênicos produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces*. A anfotericina é encontrada sob duas formas: A e B, sendo a última mais ativa e a única usada clinicamente no tratamento de micoses e leishmanioses. A anfotericina B é um fármaco anfotérico, insolúvel em água e com pH neutro. A formulação licenciada para o uso de rotina clínica, produzido e comercializado pela Bristol-Myers Squibb como Fungizon<sup>®</sup> é a mistura de anfotericina B com o detergente desoxicolato em tampão fosfato, o que promoveu a solubilização da substância (Brajtburg & Bolard 1996). No Brasil, o desoxicolato de anfotericina B é empregado como terapia de segunda escolha, sendo recomendado para gestantes, casos graves de leishmaniose, falha terapêutica ou efeitos adversos intensos com o uso de antimoniais e em situações de risco de morte.

A atividade leishmanicida da anfotericina B foi demonstrada no final da década de 50, e até hoje ela é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A anfotericina B é um esteróide de 28 carbonos (C – 28), contendo uma dupla ligação em C-22 e uma metila em C-24. Seu mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática do parasito, provocando alterações na permeabilidade da membrana e no equilíbrio osmótico do parasito (Saha *et al.*, 1986; Berman *et al.*, 1992; Olliaro & Bryceson, 1993; Urbina, 1997; Tiphine *et al.*, 1999). *Leishmania* e fungos contêm ergosterol como principal constituinte de suas membranas plasmáticas ao invés do colesterol das membranas de células animais e esse fato provavelmente explica a eficácia da anfotericina B contra *Leishmania* spp.

Os efeitos colaterais da anfotericina B são inúmeros e freqüentes, todos, dose-dependente, sendo altamente tóxica para as células do endotélio vascular, causando flebite, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão. Ao longo do tratamento, poderão surgir sobrecarga hídrica e hipopotassemia, alterações pulmonares, dispnéia e cianose (Gontijo & Carvalho, 2003).

No final da década de 1990, novas formulações da anfotericina B (anfotericina B lipossomal e anfotericina B dispersão coloidal) foram desenvolvidas com reduzida toxicidade e maior eficácia no tratamento das leishmanioses, sendo utilizadas principalmente no tratamento da LV. Nestas formulações, o desoxicolato foi substituído por outros lipídios: anfotericina B lipossomal, colesterol sulfato de anfotericina B e o complexo lipídico de anfotericina B. Essas formulações mostraram-se eficazes na redução da carga parasitária, além de bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear e pouco absorvidas pelos rins, o órgão alvo de toxicidade do fármaco (Mullen *et al.*, 1997). A eficácia da anfotericina B lipossomal foi maior do que a obtida com o fármaco livre em camundongos Balb/c infectados com *L. major* (Yardley & Croft 1997).

Apesar do custo elevado, devido à possibilidade de tempo mais curto de administração, eficácia e menor freqüência de efeitos adversos, a anfotericina B lipossomal é considerada o melhor fármaco atualmente disponível para o tratamento da LV. Em muitos países da Europa e Estados Unidos ela é utilizada como a primeira linha de tratamento para essa doença. No Brasil essas formulações tornaram-se disponíveis comercialmente, porém ainda apresentavam custo elevado, impossibilitando o seu uso na rotina do serviço. Seu uso foi recomendado apenas em pacientes graves de LV, que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do antimoniato de N-metilglucamina e de outras drogas de escolha, não obtendo melhora ou cura clínica (Davidson *et al.*, 1991). Apesar da elevada eficácia e relativa menor toxicidade das novas formulações lipídicas de anfotericina B no tratamento das leishmanioses, o alto custo (US\$ 2.800) inviabilizava seu uso no sistema de saúde pública de países em desenvolvimento. Felizmente, em maio de 2007 a Organização Mundial da Saúde anunciou uma drástica redução no preço da droga (US\$ 200) para que ela possa ser utilizada nos serviços de saúde pública de países onde a LV é endêmica (Chappuis *et al.*, 2007).

### 1.3.3. Miltefosina

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um alquil fosfolípido que foi desenvolvido inicialmente como um agente antitumoral. Administrada oralmente, o fármaco tem um longo período de meia-vida, variando de 100 a 200 horas. Os níveis do fármaco no plasma permanecem constantes após 26 dias de administração contínua (Berman *et al.* 2006). As primeiras evidências de sua atividade leishmanicida foram obtidas de estudos *in vitro* com *L. (L.) donovani* (Croft *et al.*, 1987). Posteriormente outros estudos revelaram um índice terapêutico favorável para a LV na Índia (Murray *et al.*, 2005; Schraner *et al.*, 2005; Mohebbali *et al.*, 2007).

Entre as vantagens do uso do miltefosina está a possibilidade de administração por via oral. Outra questão importante é a possibilidade do mecanismo de ação do miltefosina ser independente da resposta imune mediada por células T e B (observado em *L. (L.) donovani* por Escobar *et al.*, 2001). Outros estudos sugerem que a miltefosina apresenta propriedades imunomoduladoras (Vehmeier *et al.*, 1991; Hochhuth *et al.*, 1992; Eue *et al.*, 1995). O modo de ação da droga ainda não foi bem esclarecido, mas parece estar associado com o metabolismo de lipídios e biossíntese de fosfolípidios (Lux *et al.*, 2000). Em formas promastigotas, assim como em células tumorais, foi observado que miltefosina pode induzir morte celular por apoptose (Paris *et al.*, 2004).

Recentemente a miltefosina vem sendo utilizada em países como a Índia, Alemanha e Colômbia, com resultados promissores no tratamento da LV (Murray *et al.*, 2005). Na Índia, a miltefosina foi registrada para o tratamento da leishmaniose visceral em março de 2002, embora estudos tenham demonstrado que a droga é teratogênica em animais (Murray *et al.*, 2005). O fármaco vem sendo usado desde então para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais (Sindermann *et al.*, 2003). Mohebbali e colaboradores (2007) consideraram que o tratamento da miltefosina foi tão bom quanto o tratamento com o antimoniato de meglumina em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. major*. O fármaco foi também usado com sucesso no tratamento de pacientes portadores de HIV, infectados com *L. major* (Schraner *et al.*, 2005).

Na Colômbia e Guatemala, em um estudo com controle de placebo, a miltefosina (2,5 mg/Kg/dia, durante 28 dias), foi utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea. Na Colômbia, onde a *L. (V.) panamensis* é mais prevalente foram obtidas taxas de cura de 91%, comparadas com 38% no grupo placebo. Já na

Guatemala, onde predominam *L. (V.) braziliensis* e *L. (mexicana) mexicana*, o tratamento foi ineficaz contra *L. (V.) braziliensis*. Foi obtida baixa taxa de cura de 53% no grupo tratado comparada à de 21% no grupo placebo (Soto *et al.*, 2004). No entanto, o mesmo grupo de autores obtiveram taxas de cura de 85%, 88% e 82% após 2,4 e 6 meses respectivamente de tratamento com miltefosina em pacientes bolivianos com leishmaniose cutânea infectados com *L. braziliensis*. Nesse caso, o fármaco foi considerado eficaz no tratamento da doença (Soto & Toledo, 2007). No Brasil, a eficácia da miltefosina no tratamento da LC experimental causada por *L. (L.) amazonensis* em camundongos foi semelhante ou maior que a do N-metilglucamina (Costa Filho *et al.*, 2008).

Os problemas relacionados ao uso deste fármaco no tratamento das leishmanioses incluem efeitos adversos que afetam o sistema gastrointestinal, causando principalmente vômitos e diarreia (Kaminsky, 2002), aumento nos níveis sanguíneos de transaminase, bem como uréia e creatinina (Fischer *et al.*, 2001). A resistência induzida *in vitro* do fármaco foi também descrita em linhagens de promastigotas de *L. (L.) donovani* (Seifert *et al.*, 2003). Foi demonstrado também pelo mesmo grupo que a resistência experimental induzida em promastigotas de *L. donovani* foi mantida em amastigotas, caracterizando assim, um fenótipo de relevância clínica para este estágio do parasito (Seifert & Croft, 2006). No entanto, a maior limitação do uso da miltefosina consiste no seu emprego em mulheres em idade fértil uma vez que este fármaco apresentou efeitos teratogênicos em animais (Kaminsky, 2002).

#### **1.3.4. Paromomicina**

A paromomicina (ou aminosidina) é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, com boa atividade leishmanicida (den Boer & Davidson, 2006). A atividade deste fármaco contra leishmaniose cutânea experimental foi demonstrada pela primeira vez em 1963 (Neal *et al.*, 1995). Estudos realizados nos anos 90 na Índia e na África mostraram que a paromomicina por via parenteral também foi ativa no tratamento da leishmaniose visceral em áreas endêmicas (Chunge *et al.*, 1990; Thakur *et al.*, 1992; Jha *et al.*, 1998). Na Europa a paromomicina foi licenciada para o tratamento parenteral de infecções bacterianas, enquanto que na Índia o fármaco está registrado para o tratamento de LV desde 2006.



A paromomicina apresenta uma diversidade de atividade antiparasitária que não foi ainda descrito por outro antibiótico aminoglicosídeo. Neal e colaboradores (1995) avaliaram a sensibilidade *in vitro* à aminosidina de várias cepas de *Leishmania* causadoras de LC e LV e encontraram variações de sensibilidade dessas diferentes cepas. No Brasil, Romero e colaboradores (1998), trataram pacientes portadores de leishmaniose mucosa com sulfato de aminosidina, obtendo 66,5% de remissão completa da lesão nos pacientes até três meses após o tratamento.

Como relatado acima, a paromomicina vem apresentado atividade leishmanicida tanto para o tratamento da LC quanto da LV. A droga em geral é bem tolerada, no entanto podem ocorrer problemas graves. Ela é potencialmente nefrotóxica e ototóxica, podendo causar surdez irreversível, além de ser contra indicada durante a gravidez. Outro problema relacionado a este fármaco é o possível surgimento de resistência. Maarouf e colaboradores (1998) conseguiram obter *L. (L.) donovani* com resistência *in vitro* à paromomicina. Por outro lado, estudos mais recentes em pacientes com LV na Índia (onde a droga está em fase III de testes) demonstraram que a atividade da paromomicina é equivalente à da anfotericina B (Sundar *et al.*, 2007). Os autores observaram também ausência de nefrotoxicidade, ototoxicidade reversível em 2% dos pacientes e aumento significativo das transaminases hepáticas em 1,8% dos pacientes. Apesar de ser uma medicação administrada por via intramuscular, a paromomicina é ainda considerada uma boa alternativa terapêutica. Isto devido à alta eficácia, atividade contra uma variedade de patógenos, inclusive bactérias, necessidade de um menor tempo de tratamento que os demais medicamentos disponíveis e baixo custo (US\$ 5–10 por tratamento) (Chappuis *et al.*, 2007).

Quanto ao mecanismo de ação, em bactéria os aminoglicosídeos inibem a síntese de proteínas através da ligação à subunidade ribossomal 30S, causando a terminação prematura da tradução do RNA mensageiro. A ação da aminosidina foi demonstrada em formas promastigotas de *L. (L.) donovani*, apresentando modificações na síntese de RNA e em lipídios polares da membrana, promovendo alterações na fluidez da membrana (Maarouf *et al.*, 1997a). Outras implicações observadas foram alterações no ribossomo mitocondrial e disfunção na indução respiratória (Maarouf *et al.*, 1997b).

Formulações tópicas da paromomicina têm sido avaliadas no tratamento da LC. A pomada contendo paromomicina 15% associada ao cloreto de metilbenzetônio

12% foi eficaz em pacientes de Israel com *L. (L.) major* e pacientes da Guatemala com LC, no entanto problemas de toxicidade foram observados em ambos os casos (El-On *et al.*, 1992; Arana *et al.*, 1999). A toxicidade local das formulações de paromomicina e cloreto de metilbenzetônio limitam seu uso clínico e formulações contendo apenas paromomicina apresentaram baixa eficácia, principalmente por penetrarem pouco na pele (Neal *et al.*, 1995). Procurou-se então aumentar a permeabilidade cutânea da paromomicina através de formulações hidrofílicas (géis ou cremes). Utilizando essa formulação, a eficácia da paromomicina 10% em camundongos ou hamsters infectados foi semelhante às formulações contendo paromomicina 15% e cloreto de metilbenzetônio (Fernandes *et al.*, 2001). Essa formulação também foi avaliada com resultados promissores em modelos animais infectados com *L. L. amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Gonçalves *et al.* 2005), e *L. L. amazonensis* e *L. (L.) major* (Mussi *et al.*, 2007).

### **1.3.5. Outras drogas**

#### **Azitromicina**

A azitromicina é um antibiótico azalídeo da família dos macrolídeos. Os macrolídeos interferem com a síntese de proteínas pela ligação à subunidade ribossomal 50S de organismos susceptíveis (Scheinfeld *et al.* 2004). Em geral são bacteriostáticos. Sua atividade leishmanicida é controversa: Krolewiecki e colaboradores (2002) demonstraram a atividade da azitromicina em modelos *in vitro* e *in vivo* sobre promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major*. Tanyuksel e colaboradores (2003), também investigaram a ação *in vitro* da azitromicina em *L. (L.) major* e observaram que o fármaco só apresentou atividade significativa em doses mais elevadas (0,1 a 0,6 µg/mL). Recentemente, em modelo *in vivo*, a azitromicina foi ativa contra *L. (V.) braziliensis*, mas com atividade inferior ao SbV e não foi ativo contra *L. (L.) amazonensis* (Sinagra *et al.*, 2007). Por outro lado, Oliveira-Silva e colaboradores (2008), mostraram que a azitromicina foi ativa em modelo *in vitro* de formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

#### **Pentamidinas**

A pentamidina, uma diamina aromática, apresenta atividade tripanosomicida, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (Berman, 1997). Para o tratamento das leishmanioses, esse composto tem sido usado desde 1939. Em *Leishmania*

*donovani*, a pentamidina parece inibir o transporte de arginina (Kandpal *et al.*, 1995; Kandpal *et al.*, 1996), e inibe também enzimas, como a ornitina descarboxilase e a espermicina sintetase (Basselin *et al.*, 1997). Esses compostos são capazes ainda de se ligar ao DNA em regiões ricas em seqüências A-T. A alta proporção de cura em LC está associada a baixas doses de pentamidina administrada por curtos períodos. Em um estudo na Colômbia, o tratamento curto e com baixas doses de pentamidina apresentou índices de cura de 96%, semelhante ao do SbV (91%). Entretanto ela também apresenta com freqüência efeitos adversos similares (Soto *et al.* 1994). Para a LV, a pentamidina tem sido usada com fármaco de segunda escolha em casos refratários ao tratamento com SbV. No entanto, diferente do tratamento da LC, o tratamento desta doença requer longos esquemas terapêuticos para prevenir recidivas, elevando a toxicidade da pentamidina (Bryceson 1985), e contribuindo para o surgimento de resistência.

### **Alopurinol**

O alopurinol é um inibidor seletivo da biossíntese de ácido úrico que, em *Leishmania*, provavelmente inibe o metabolismo do parasito pela competição com o ATP (Van Voorhis, 1990). São geralmente ineficientes na ausência do SbV (Blum *et al.*, 2004); no entanto, quando em combinação (alopurinol + antimoniais) a eficácia é aumentada (Esfandiarpour & Alavi, 2002; Momeni & Aminjavaheri, 2003). O efeito do alopurinol em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi relatado por Neal e colaboradores (1985).

### **Sitamaquina (WR6026)**

A sitamaquina (WR6026) é um derivado de 8-aminoquinolina administrado por via oral. A sitamaquina é rapidamente metabolizada, formando desetil e derivados 4-CH<sub>2</sub>OH, os quais podem ser responsáveis por sua atividade (Croft & Coombs, 2003). O primeiro teste clínico com este fármaco para LV ocorreu no Quênia, sendo empregadas doses de 1mg/Kg/dia durante quatro semanas. Nesta avaliação, 50% dos pacientes responderam ao tratamento com o fármaco (Sherwood *et al.*, 1994). Estudos posteriores com doses maiores (1,75 a 3mg/Kg/dia) mostraram índices de cura de 80 a 92% (Wasunna *et al.*, 2005). No Brasil, 67% dos pacientes foram curados de *L. (L.) infantum chagasi*, quando tratados com 2mg/Kg/dia durante 28 dias. A metamoglobinemia é um efeito colateral comum e alguns pacientes desenvolveram nefropatias (Dietze *et al.*, 2001).

## **Antifúngicos**

Os antifúngicos azólicos como o cetoconazol, triazol, itraconazol e fluconazol agem em *Leishmania* spp. bloqueando a síntese de ergosterol (Croft & Yarley, 2002). Eles são considerados fármacos de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses. Diversos estudos foram realizados avaliando a eficácia dos antifúngicos (tanto compostos azólicos quanto não azólicos, como a Terbinafina) no tratamento das leishmanioses, porém os resultados foram variáveis e em geral menos efetivos que os antimoniais e anfotericina B (revisado por Mishra *et al.*, 2007). Os efeitos tóxicos mais freqüentemente observados para os antifúngicos azólicos foram náuseas e vômitos, em geral quando utilizadas dosagens superiores a 10mg/Kg/dia (Van Voorhis 1990).

### **1.4. Resistência a drogas:**

A resistência aos medicamentos é um dos principais problemas clínicos para o tratamento de doenças que vão desde infecções bacterianas e parasitárias ao câncer. Vários mecanismos de resistência a drogas têm sido identificados em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (Croft *et al.* 2006). Na Índia em torno de 60% dos pacientes com leishmaniose visceral não respondem ao tratamento com compostos antimoniais devido ao aparecimento de resistência do parasito a essas drogas (Lira *et al.*, 1999; Sundar, 2001). As espécies patogênicas de *Leishmania* do Novo Mundo apresentam considerável variabilidade na resposta à quimioterapia antimonial. Cepas de *Leishmania* com diversos graus de resistência têm sido isoladas (Moreira *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 2001). *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie responsável pela forma muco cutânea na América do Sul (Laison *et al.*, 1983) e freqüentemente apresenta resistência a tratamentos de curta duração ou em baixas doses (Moreira *et al.*, 1995; 1998). No Brasil, a resposta ao Glucantime<sup>®</sup> varia de acordo com a forma clínica e área geográfica. Insucessos terapêuticos têm sido observados em 10 a 25% dos casos (Rocha *et al.*, 1980; Marsden *et al.*, 1985).

Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos devido ao aparecimento de resistência primária do parasito a essas drogas (Brasil, Ministério da saúde, 2006). Estudos *in vitro* apontam ainda para a possibilidade de surgimento de populações de *Leishmania*

resistentes a outras drogas, como a anfotericina B e miltefosina (Mbongo *et al.*, 1998; Rakotomanga *et al.*, 2005).

O estudo da resistência a drogas é muito complexo, uma vez que existem vários mecanismos de resistência a drogas e a resistência a uma única droga pode envolver mecanismos distintos. Os principais mecanismos de resistência a drogas são: (1) diminuição da entrada da droga na célula, (2) eliminação da droga pela fosfoglicoproteína de membrana (*Pgp*) ou outras proteínas transportadoras dependentes de ATP, (3) diminuição da ativação da droga, (4) inativação da droga, (5) alteração da formação do complexo alvo-droga e (6) eficiência no sistema de reparo (revisado por Ouellette & Borst, 1991; Borst & Ouellette, 1995).

#### **1.4.1. Resistência a múltiplas drogas (MDR):**

A resistência a múltiplas drogas (MDR) em linhagens de células tumorais e em protozoários como *Leishmania*, *Plasmodium* e *Entamoeba* estão associadas com a superexpressão de uma fosfoglicoproteína de membrana (*Pgp*) (Ouelette & Papadopolou, 1993). A *Pgp* funciona como uma bomba de efluxo de drogas dependente de ATP, que reduz o acúmulo de compostos citotóxicos dentro da célula (Ullman, 1995). Em *Leishmania*, o primeiro gene associado à MDR, *ltpgpA*, foi identificado em um DNA extra cromossômico conhecido como círculos H. Ele está amplificado em linhagens celulares de *L. tarentolae* resistentes ao metotrexato (Ouellette *et al.*, 1990 e 1991). Desde então foram identificados vários genes pertencentes à família gênica das *Pgp*'s amplificados em linhagens resistentes à vimblastina, arsenitos, antimoniais trivalentes, terbinafina e primaquina de *L. tarentolae* e *L. major* (Ponte-sucré, 2003).

Durante muitos anos, a superfamília de proteínas “ATP-binding cassette” (ABC) foi investigada por sua implicação na resistência a drogas. De fato, o estudo dos mecanismos de resistência a múltiplas drogas está intimamente associado a esta família de proteínas. Em 2009, Sauvage e colaboradores apresentaram uma revisão acerca dessas proteínas e sua importância para a resistência a drogas. As proteínas ABC eucarióticas podem ser divididas em oito famílias (ABCA a ABCH), sendo ABCB e ABCC as de maior interesse no estudo de MDR. Da família ABCB, duas correspondem a homólogos da *Pgp* e estão associadas a MDR. O gene ABCB4 (MDR1) foi inicialmente identificado em cinco linhagens de *Leishmania* resistentes à daunorubicina, com padrões de resistência cruzada com drogas hidrofóbicas não relacionadas, como puromicina, adriamicina e doxorubicina. Como

essas drogas não são utilizadas no tratamento das leishmanioses, o interesse clínico nessas proteínas somente aumentou quando foi demonstrado que LtABCB4 (também denominada LtMDR1) confere resistência ao miltefosina e ao edelfosine. Além disso, foi demonstrado que em *L. (L.) enrietti*, LeABCB4 (LeMDR1) está correlacionado com o acúmulo de pentamidina. O segundo membro da família ABCB com estrutura típica de *Pgp* é a LaABCB2 (ou LaMDR2), identificada em *L. (L.) amazonensis*. Ela possui apenas 47% de identidade de aminoácidos com LaABCB4 (associada com resistência a drogas) e aparentemente está envolvida na eliminação de xenobióticos (revisado por Sauvage *et al.*, 2009).

A família ABCC representa a segunda maior família de proteínas ABC em *Leishmania*, com oito membros identificados. O primeiro gene identificado nesta família foi ABCC3 (também denominado *PgpA* ou MRPA), originalmente identificado nos círculos H de *L. (L.) tarentolae* (*LtPgpA*) resistente ao metotrexato. A amplificação do homólogo da LtABCC3 em *L. (L.) major* (LmABCC3 ou *LmPgpA*) conferiu resistência a metais nas células transfectantes. ABCC3 está freqüentemente amplificado em parasitos selecionados por resistência a drogas contendo arsenitos e antimoniais; porém o nível de resistência depende da espécie de *Leishmania*. Esse dado sugere que ABCC3 necessita de outros fatores para conferir altos níveis de resistência, e que esses fatores podem diferir em várias espécies de *Leishmania*. Uma possibilidade é que ABCC3 confira resistência pelo seqüestro de conjugados metal-tióis (revisado por Sauvage *et al.*, 2009).

Outras proteínas ABC incluem: um homólogo de ABCC4 em *L. (L.) tropica* (LtrABCC4 ou *LtrPgpE*), superexpresso em uma linhagem celular resistente ao metotrexato; ABCC7 (também chamada PRP1 – pentamidine resistance protein 1), que semelhante à ABCC3, pode conferir resistência pelo seqüestro da pentamidina em vesículas que podem ser eliminadas por exocitose; ABCG4 e ABCG6, cuja superexpressão foi associada à resistência ao miltefosina em *L. (L.) infantum* (revisado por Sauvage *et al.*, 2009).

#### **1.4.2. Resistência aos antimoniais:**

Assim como o mecanismo de ação, os mecanismos de resistência do parasito aos antimoniais não estão bem esclarecidos. Acredita-se que o SbV é uma pró-droga e precisa ser reduzido a SbIII para ter atividade leishmanicida, assim, se essa redução não ocorrer ou for diminuída, a atividade da droga poderá ser comprometida. De fato, uma diminuição na redução de SbV a SbIII foi demonstrada

em formas amastigotas de *L. donovani* resistentes a antimoniais pentavalentes (Shaked-Mishan *et al.*, 2001). Estudos posteriores caracterizaram duas enzimas de *Leishmania*, TDR (Thiol-dependent reductase) (Denton *et al.*, 2004) e LmACR2 (*Leishmania major* Sb(V)-As(V) reductase) (Zhou *et al.*, 2004) como envolvidas na redução de SbV em SbIII. No entanto, é importante observar que a redução da droga pode ocorrer tanto no citoplasma do parasito quanto na célula hospedeira ou mesmo em um sistema extracelular (Brochu *et al.*, 2003), sendo incerta a contribuição deste fenômeno no fenótipo de resistência a drogas. Além disso, a captura de SbIII pelo parasito e conseqüente aumento dos seus níveis intracelulares pode ser mediada por aquagliceroporinas, que desta forma teriam efeito modulador da resistência aos antimoniais (Gourbal *et al.*, 2004).

Além dos mecanismos relacionados à concentração da droga no parasito, alguns estudos têm observado um aumento nos níveis de tripanotiona (TSH) em parasitos resistentes ao SbIII (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). A exposição do parasito ao SbIII provoca o efluxo de TSH da célula e inibição da tripanotiona reductase, causando distúrbios no potencial tiol redox (Wyllie *et al.*, 2004). O aumento nos níveis de TSH pode equilibrar o potencial tiol redox na presença da droga tornando o parasito resistente. É provável que a superexpressão de alguns componentes da via biosintética da TSH possa resultar no aumento dos níveis de TSH e conseqüentemente, em resistência ao SbIII (Croft *et al.*, 2006).

Outra característica importante da TSH é sua capacidade de conjugarse ao SbIII e desta forma ser eliminada diretamente através da membrana plasmática ou seqüestrada para o interior de um vacúolo pela *PgpA* (ABCC3). De fato, a superexpressão da *PgpA* foi observada em linhagens de *L. infantum* resistentes ao SbIII (El Fadili *et al.*, 2005), porém ela parece não ser a responsável pela eliminação do conjugado TSH-SbIII através da membrana plasmática, cujo transportador ainda não foi identificado (Croft *et al.*, 2006).

Vale destacar que a grande maioria dos estudos realizados nesta área empregou espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, de forma que pouco se sabe acerca dos mecanismos de resistência a drogas nas espécies endêmicas em nosso país. Moreira e colaboradores (1998) caracterizaram duas cepas de *L. (V.) braziliensis* e duas de *L. (L.) amazonensis* naturalmente resistentes ao glucantime<sup>®</sup>. Os autores não observaram nestas cepas, superexpressão do gene *PgpA*, sugerindo que outros mecanismos poderiam estar envolvidos no fenótipo de resistência. Gazola e colaboradores (2001) mostraram que o perfil de aglutinação por

lectinas foi alterado em cepas de *L. (V.) guyanensis* com resistência induzida *in vitro* ao glucantime<sup>®</sup>, indicando mudanças na estrutura bioquímica dos açúcares presentes na superfície celular.

Em 2003, Anacleto e colaboradores caracterizaram uma amplificação gênica de *L. (V.) guyanensis* resistente ao glucantime<sup>®</sup>, presente como um amplicon extracromossomal de 30 Kb que contém o gene *PgpA (IgPgpA)*, superexpresso na linhagem resistente. Os autores observaram que, como em outras espécies de *Leishmania* não patogênicas e patogênicas do velho mundo, vários mecanismos colaboram na resistência ao SbV em conjunto com amplificação do gene *PgpA* (Anacleto *et al.*, 2003).

Embora o mecanismo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais tenha sido amplamente estudado, muitas questões ainda não foram elucidadas e alguns resultados são aparentemente contraditórios. Essas divergências podem ser devido aos diferentes modelos de obtenção dos parasitos resistentes e de análise do fenótipo, além da diversidade natural de espécies de *Leishmania* (revisado por Croft *et al.*, 2006).

#### **1.4.3. Resistência a outras drogas:**

Além dos antimoniais, foram estudados mecanismos de resistência a outras drogas leishmanicidas como a anfotericina B, metotrexato, miltefosina e paromomicina. A análise desses mecanismos de resistência bem como a ocorrência de resistência cruzada entre diferentes drogas é fundamental para a identificação de novos alvos e estratégias para a quimioterapia das leishmanioses.

Resistência à anfotericina B em isolados de campo não tem sido observada, embora casos excepcionais às vezes sejam observados após tratamento, especialmente em pacientes HIV-positivos (Ouellette *et al.*, 2004). Esses casos, porém precisam ser analisados cuidadosamente, pois a falha terapêutica pode não ocorrer em função da aquisição de resistência, mas pelo surgimento de novas populações do parasito (Durand *et al.*, 1998). Estudos empregando um clone de *L. donovani* resistente à anfotericina B mostraram modificações no perfil de esteróis da membrana plasmática com a substituição do ergosterol por um precursor (cholesta-5, 7, 24-trien-3 $\beta$ -ol) como esterol predominante (Mbongo *et al.*, 1998). Estudos também demonstraram que a resistência induzida *in vitro* à anfotericina B pode estar associada à amplificação gênica (Singh *et al.*, 2001).



Os mecanismos de resistência a antifolatos, como o metotrexato (MTX), têm sido bastante estudados. Estudos de amplificação gênica nos anos 80 e 90 demonstraram que a amplificação de uma região cromossômica (denominada região H) como círculos extracromossomais, estavam associados com a resistência de *Leishmania* spp ao MTX e outras drogas análogas (revisado por Beverley, 1991). Em 2003, Guimond e colaboradores utilizaram uma abordagem transcriptômica para estudar clones de *Leishmania* resistentes ao MTX. Os autores observaram a superexpressão dos genes  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase, P-glicoproteína A, pteridina redutase 1 e dihidrofolato-redutase-timidilato-sintase mediada pela sua amplificação gênica e por outros mecanismos. Os autores observaram também a presença de três novos genes (glutamina sintase, S-adenosilhomocisteína hidrolase e S-adenosilmetionina sintase) que são superexpressos em parasitos resistentes à droga, no qual o gene não está amplificado no genoma do parasito. Além disso, os autores observaram que o gene transportador de ácido fólico FT5 foi deletado na linhagem de parasitos resistentes ao metotrexato. Drummelsmith e colaboradores também em 2003, utilizando uma abordagem proteômica, demonstraram que a enzima pteridina redutase estava superexpressa em clones de *L. major* resistentes ao MTX, o que consistiu segundo os autores na primeira análise proteômica de resistência a drogas em um parasito (Drummelsmith *et al.*, 2003).

Devido provavelmente à recente introdução da miltefosina no campo, parasitos clinicamente resistentes ainda não foram isolados. Entretanto, resistência pode ser facilmente induzida *in vitro* e alguns desses mutantes foram caracterizados. Alguns dos possíveis mecanismos de resistência ao miltefosina incluem reduzida incorporação da droga, alterações na permeabilidade da membrana plasmática, metabolismo acelerado da droga e eliminação da droga (Ouellette *et al.*, 2004). Duas proteínas foram particularmente estudadas: a P-glicoproteína MDR1 (ABCB4) anteriormente comentada; e a proteína LdMT, estudada inicialmente em *L. (L.) donovani* e que corresponde a uma ATPase tipo P pertencente à subfamília das aminofosfolipídios translocases (Perez-Victoria *et al.*, 2003). Miltefosina é uma das drogas mais promissoras para o tratamento das leishmanioses, porém a facilidade com que se obtêm formas resistentes em laboratório é preocupante. Assim, uma alternativa para evitar (ou pelo menos retardar) o surgimento de resistência no campo seria o uso combinado de miltefosina com outras drogas não relacionadas.

Estudos moleculares mostram que, em *L. (L.) donovani*, a resistência à paromomicina está associada com a redução no acúmulo da droga em formas

promastigotas resistentes, com uma redução significativa na ligação inicial da droga à superfície celular. Dessa forma, um menor acúmulo da droga no parasito permite que a síntese protéica permaneça inalterada (Jhingran *et al.*, 2009). Jhingran e colaboradores (2009) estudaram a resistência à paromomicina e enfatizam a grande dificuldade de selecionar leishmanias com altos índices de resistência a essa droga. Os autores destacam ainda que no surgimento de resistência no campo, esses parasitos poderiam ser tratados com as drogas já existentes, uma vez que parasitos resistentes à paromomicina permanecem sensíveis a outras drogas.

### **1.5. O genoma de *Leishmania*.**

A aplicação de técnicas genéticas padronizadas para estudar *Leishmania* tem sido dificultada por dois fatores: a ausência de um ciclo sexual e a não condensação dos cromossomos nas fases do ciclo celular (Victoir e Dujardin, 2002). A leishmania possui em torno de 60% do seu conteúdo em pares de bases de guanina e citosina (conteúdo G-C), estimando-se a presença de apenas cerca de 8.500 genes (Bastien *et al.*, 1998; Wincker *et al.*, 1997). As regiões codificantes tem um conteúdo GC maior que as regiões não-traduzidas e a 3'- UTR é mais rica em GC que a 5'- UTR (Alonso *et al.*, 1992). No gênero *Leishmania*, a organização dos genes de RNA ribossomais (RNAr) se parece com aquela de outros eucariotos: múltiplos, com repetições *head-to-tail* e regiões codificantes separadas por espaçadores não-transcritos (Requena *et al.*, 1997). Por outro lado, os genes não-ribossomais aparecem em situações de cópia única e de cópias múltiplas repetidas em *tandem*, muitos dos quais transcritos policistronicamente. Genes não repetidos de funções relacionadas podem também ocorrer em longas unidades transcricionais, semelhante aos operons em procariotos (Stiles *et al.*, 1999). Extensos processamentos pós-transcricionais são requeridos para produzir RNA mensageiros maduros, incluindo o *trans splicing* do RNA mini-exon (SL – *Spliced Leader*) nas extremidades 5' e poliadenilação (Clayton, 2002; Zeiner *et al.*, 2003). Esses dois eventos parecem ser intrinsecamente acoplados em tripanossomatídeos, reconhecendo sinais regulatórios que consistem em seqüências ricas em polipirimidina (CT) (LeBowitz *et al.*, 1993). A transcrição policistrônica de genes contendo apenas exons elimina o requerimento do *cis splicing* observado nos eucariotos superiores (Stiles *et al.*, 1999).

Importantes avanços na genética e biologia molecular de tripanosomatídeos foram obtidos a partir da publicação dos genomas de *L. (L.) major* (Ivens *et al.*, 2005)

e de *L. L. infantum* e *L. V. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007). O genoma de *L. (L.) major* (cepa Friedlin) foi o primeiro a ser publicado, possui aproximadamente 32,8 Mb de genoma haplóide distribuídos em 36 cromossomos. A análise das seqüências de *L. (L.) major* (versão 5.2) utilizando diferentes algoritmos permitiu a predição de 911 genes que transcrevem diferentes tipos de RNAs, 39 pseudogenes e 8.272 genes codificantes de proteínas. Essas seqüências foram organizadas em 3.083 grupos de 662 prováveis famílias de genes relacionados. A maioria das famílias gênicas pequenas (com menos de 10 membros) parecem ter surgido de duplicação gênica em arranjos em tandem, enquanto a maioria dos membros de famílias maiores (com mais de 10 membros) possui múltiplos loci contendo genes isolados ou em tandem (Ivens *et al.*, 2005).

A organização dos genes codificantes de proteínas em longos grupos policitrônicos fita-específica e a ausência de fatores gerais de transcrição nos genomas sugere que os mecanismos regulatórios que dirigem a transcrição pela RNA polimerase II em *Leishmania* (e também no *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*) são distintos daqueles operantes em outros eucariotos. Além disso, a abundância de proteínas ligantes de RNA que são codificadas nos genomas de tripanosomatídeos é consistente com atividades de regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional (Ivens *et al.*, 2005).

Os genomas de *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* inicialmente publicados foram constituídos por 470 e 1.031 contigs, respectivamente. Em *L. (L.) infantum* (versão 2.0) foram preditos 8.164 genes codificantes e 41 pseudogenes distribuídos em aproximadamente 32,1 Mb de genoma haplóide. Por outro lado, *L. (V.) braziliensis* (versão 2.0) apresentou 8.153 genes codificantes e 161 pseudogenes distribuídos em aproximadamente 32,0 Mb de genoma haplóide (Peacock *et al.*, 2007). Um dado interessante é que tanto a ordem quanto a seqüência dos genes estão altamente conservados nas três espécies de *Leishmania*: a sintenia é conservada em mais de 99% dos genes preditos nos três genomas; as seqüências de aminoácidos têm em média 77 a 92% de identidade e as seqüências de nucleotídeos, 81 a 94%. Uma diferença marcante entre as espécies do Velho Mundo e do Novo Mundo é o número de cromossomos: 36 em *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* e 35 em *L. (V.) braziliensis*, aparentemente devido à fusão dos cromossomos 20 e 34 (Brito *et al.*, 1998; Peacock *et al.*, 2007).

Está claro que existe uma forte seleção mantendo tanto a organização quanto as seqüências dos genomas de *Leishmania*. O fato da reprodução sexuada

não ser uma parte obrigatória no ciclo de vida de *Leishmania*, podendo ocorrer apenas raramente (Victoir & Dujardin, 2002) explica em parte essa conservação. Porém é possível ainda que exista uma tendência de organização espacial dos genes em grupos direcionados, que podem ser tanto policistrons quanto grupos de genes que compartilham elementos regulatórios não caracterizados (Peacock *et al.*, 2007).

Os avanços no estudo da genômica e pós-genômica não seriam possíveis sem um desenvolvimento equiparável da bioinformática. Em *Leishmania*, a publicação do genoma de *L. (L.) major* (Ivens *et al.* 2005) e posteriormente os genomas de *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007) forneceu um volume de dados até então desconhecido e que permitiu uma análise comparativa mais precisa da biologia desses parasitos. A partir da comparação entre os três genomas (Peacock *et al.*, 2007) foram identificados em torno de 200 genes (ou pseudogenes) diferentes, incluindo 78 genes que foram restritos a uma única espécie, um número pequeno se comparado às diferenças na apresentação clínica, imunogenicidade e patogenia da doença. *L. (V.) braziliensis* foi a espécie que mais apresentou diferenças em relação às demais, enfatizando a necessidade de se estudar as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Segundo os autores, o pequeno número de genes diferentes entre as três espécies pode ser compensado por um maior controle pós-transcricional (Peacock *et al.*, 2007).

#### **1.6. Uso de microarranjos na análise genômica e transcriptômica em larga escala**

Diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas no intuito de analisar não apenas um grande número de moléculas simultaneamente, mas de entender como elas se relacionam em um contexto específico. As diferentes metodologias empregando microarranjos de DNA têm encontrado aplicações em muitas áreas da pesquisa. Entre as várias aplicações se encontram estudos do ciclo de vida e desenvolvimento de parasitos, relações hospedeiro-parasito, análises de virulência em diferentes organismos, desenvolvimento de vacinas e estudos de resposta a infecções parasitárias ou por microorganismos (Schena *et al.*, 1995; Gobert *et al.*, 2005). Os microarranjos de DNA permitem a obtenção de consideráveis volumes de informação relativa a perfis de expressão genética. Essa técnica tem sido utilizada em estudos de genes diferencialmente expressos no *T.*

*cruzi* (Murta *et al.*, 2010 em preparação) e *Candida albicans* (Rogers e Barker, 2002; Garaizar *et al.*, 2006) correlacionados com o fenótipo de resistência a drogas.

Com relação à *Leishmania*, essa metodologia foi extensivamente utilizada no estudo de padrões de expressão gênica diferencial durante o ciclo de vida do parasito (Duncan *et al.*, 2004; McNicoll *et al.*, 2006; Leifso *et al.*, 2007; El Fadili *et al.*, 2008), análises comparativas entre *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* (Rochette *et al.*, 2008) bem como em análises dos mecanismos de resistência a drogas (Guimond *et al.*, 2003; Ubeda *et al.*, 2008). Guimond e colaboradores (2003) mostraram que em populações de *L. (L.) major* resistentes ao metotrexato, os genes  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase, P-glicoproteína A, pteridina redutase 1 (PTR1) e diidrofolato redutase – Timidilato-sintase (DHFR-TS) estão superexpressos devido a ampliações destes genes no genoma do parasito ou outros mecanismos. Outros genes também foram identificados: glutatona sintase, S-adenosilhomocisteína hidrolase e S-adenosilmetionina sintase. Além disso, os autores observaram que o transportador de folato (FT1) foi deletado nas populações de *L. (L.) major* resistentes ao metotrexato. Recentemente, Ubeda e colaboradores (2008) produziram um microarranjo de oligonucleotídeos de 70 bases para todos os genes codificantes de proteínas de *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum*. Os autores compararam populações dessas duas espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao metotrexato utilizando duas metodologias distintas: o CGH e análise de expressão diferencial. Entre os genes diferencialmente expressos observados estão o transportador ABCA2, que até então não havia sido descrito associado ao fenótipo de resistência, genes anteriormente descritos DHFR-TS, PTR1, FT1 além de outros. Os autores enfatizam a aplicabilidade dos microarranjos nos estudos de resistência a drogas em *Leishmania*, bem como a importância dos fenômenos de amplificação, deleção e aneuploidias cromossômicas, para a modulação da expressão gênica em parasitos resistentes.

Dessa forma, para se compreender melhor a diversidade biológica do parasito e sua resposta à quimioterapia, é necessário o conhecimento do genoma e das modificações genômicas nas diferentes espécies de *Leishmania* do Velho e do Novo Mundo, bem como do uso de metodologias que permitam a observação de modificações pós-transcricionais, como os microarranjos de DNA.

### **1.7. Bancos de dados:**

O uso da tecnologia de banco de dados tem sido necessária desde que o homem percebeu que para organizar sua vida seria necessário organizar o que há a sua volta. Neste ponto estabeleceu-se de forma natural, critérios e padrões para ajudar a classificar objetos existentes em seu contexto e assim permitir que tarefas simples como encontrar “algo” existente em um conjunto de elementos pudesse ser feito identificando características peculiares que em um conjunto o distinguisse dos demais. Com o advento da computação e as propostas apresentadas para lidar com os aspectos pertinentes aos atributos dos objetos que fazem parte de um contexto, definidos como dados em 1970, Codd em seu trabalho apresenta uma maneira diferente de organizar esses dados.

Assim, surge o conceito dos relacionamentos entre os dados onde para Codd (1970), tabelas encerram representações de entidades, ou objetos do mundo real, podendo ser tangíveis ou intangíveis, que se relacionam entre si, definindo assim um comportamento estabelecido pelo “universo de discurso” onde situam-se. Aproveitando o desenvolvimento da proposta de um modelo relacional para construção de banco de dados computacionais, pesquisadores discutiam uma maneira de representar esta maneira proposta. Chen (1975) propõe um modelo gráfico que auxiliasse os profissionais a lidarem com um novo modelo tecnológico de banco de dados. Este modelo foi nomeado modelo “Entidade-Relacionamento” ou simplesmente “MER”.

Atualmente devido ao crescimento da tecnologia, os volumes de dados têm sido cada vez maiores. Em um procedimento normal, são eles que continuamente realimentam processos responsáveis por refiná-los gerando novos dados. Diante de tal perspectiva, onde dados vão sendo desdobrados em outros e sistematicamente reinseridos em seus processos geradores, pode-se dizer que o volume tem uma tendência praticamente exponencial de crescimento.

Nos últimos anos, o banco de dados passou a ser um grande aliado no desenvolvimento de pesquisas da área biológica. Notadamente, o volume de dados e seu crescimento sugerem o uso de uma ferramenta computacional que possibilite o desenvolvimento de análises adequadas para a apresentação dos resultados em procedimentos de pesquisa. No contexto do trabalho com sequências biológicas como de nucleotídeos e de aminoácidos que são produzidas atualmente, o uso de ferramentas de bancos de dados vem assumindo uma importância crescente. Um banco de dados pode ser considerado uma coleção de dados inter-relacionados,

projetado para suprir as necessidades de um grupo específico de aplicações e usuários. Ele organiza e estrutura as informações de modo a facilitar consultas, atualizações e deleções de dados (Prosdocimi *et al.*, 2003). Na Figura 3 estão representados alguns dos bancos de dados mais utilizados em bioinformática:

**Genbank** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>  
Banco de dados americano de seqüências de DNA e proteínas.  
**EBI** <http://www.ebi.ac.uk/>  
Banco de dados europeu de seqüências de DNA.  
**DDBJ** <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>  
Banco de dados japonês de seqüências de DNA.  
**PDB** <http://www.rcsb.org/pdb>  
Armazena estruturas tridimensionais resolvidas de proteínas.  
**GDB** <http://gdbwww.gdb.org/>  
Banco de dados oficial do projeto genoma humano.  
**TIGR Databases** <http://www.tigr.org/tdb/>  
Banco com informações de genomas de vários organismos diferentes.  
**PIR** <http://www-nbrf.georgetown.edu/>  
Banco de proteínas anotadas.  
**SWISS-PROT** <http://www.expasy.ch/spro/>  
Armazena seqüências de proteínas e suas respectivas características moleculares, anotado manualmente por uma equipe de especialistas.  
**INTERPRO** <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>  
Banco de dados de famílias, domínios e assinaturas de proteínas.  
**KEGG** <http://www.genome.ad.jp/kegg/>  
Banco com dados de seqüências de genomas de vários organismos diferentes e informações relacionadas às suas vias metabólicas.

Figura 3: Alguns dos bancos de dados mais utilizados em bioinformática. Fonte: Prosdocimi *et al.*, 2003.

El-Tabakh e cols. (2007) menciona que a falta de uma ferramenta de banco de dados que possibilite trabalhar de maneira mais alinhada às necessidades do ambiente biológico, tem sido um fator que tem contribuído negativamente ao progresso científico da área. Desta forma, o uso de um sistema de gerenciamento de banco de dados modelado adequadamente se reverte em um pré-requisito essencial para a construção de uma base tecnológica mais adequada ao tratamento e interpretação biológica das predições feitas *in silico* e *in vivo*.

A grande maioria dos bancos de dados é atrelada a um sistema denominado SGBD (Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados). Este sistema é responsável por intermediar os processos de construção, manipulação e administração do banco de dados solicitados pelos usuários ou por outras aplicações. Existem vários sistemas de gerenciamento de banco de dados, sendo que cada sistema possui seus pontos positivos e negativos. O mysql é um sistema muito utilizado pela comunidade acadêmica e em projetos genoma. Ele é gratuito, possui código aberto e acesso veloz aos dados, mas apresenta certas limitações em suas ferramentas.

### **1.7.1. Modelo Entidade de Relacionamento – MER:**

Um dos desafios do trabalho de produzir dados é conhecer e representar de maneira adequada a relação entre esses dados. Existem hoje diversas técnicas que possibilitam a representação de relações entre várias coleções de dados. Técnicas modernas de representação de dados para sistemas computacionais, como a XML, são muito eficientes na troca de informações estruturadas entre sistemas, porém ainda são precárias quanto à recuperação rápida e integrada de dados. Os bancos de dados XML nativos são utilizados em sistemas em que a origem de dados se dá por meio de arquivos XML, e a sua posterior utilização também ocorre pelos mesmos tipos de arquivos. Nesses sistemas, a utilização de bancos XML nativos se justifica e é bastante simplificada pelo uso de linguagens específicas, tais como a Xquery (<http://www.w3.org/TR/xquery>).

Modelos de Entidades e Relacionamentos (MER) é uma metodologia que se mostrou eficiente na representação da relação entre dados de naturezas diferentes. Com o uso dessa técnica, torna-se viável a utilização de computadores no armazenamento e recuperação de dados e/ou informação. Em um MER, todo e qualquer conceito que se deseje representar, que possa ser classificado como substantivo torna-se uma entidade. Uma entidade é algo que pode possuir características (atributos), e que possa ter algum tipo de relação com outra entidade. As relações entre as entidades são representadas por um conceito conhecido como “relacionamento”.

As entidades e os relacionamentos de MER podem ser convertidos em um Modelo Relacional (MR). Um MR representa as entidades e relacionamentos de MER em termos de estruturas de dados que podem ser implementadas em um sistema computacional, tais como tabelas por exemplo. A simplicidade do MER na representação de dados, e a possibilidade de converter um MER em um Modelo Relacional (MR) levaram ao surgimento de uma classe de programas extremamente poderosos; os Sistemas Gerenciadores de Bancos de Dados, ou SGBDs. Um SGBD é um conjunto de programas, que trabalha de maneira integrada e sincronizada, para viabilizar o armazenamento, a manipulação e a recuperação de dados. Tais sistemas deram origem aos bancos de dados relacionais.

Em um banco de dados relacional, as entidades de um MER são representadas por tabelas, e os relacionamentos são representados por identificadores que se repetem nas tabelas. As colunas de cada tabela representam cada uma das características de uma entidade, e em cada uma das linhas são



armazenados os elementos daquela entidade. Cada elemento de uma entidade (tabela) recebe um identificador exclusivo, conhecido como chave primária. Essa chave primária se repete como chave estrangeira, nas outras tabelas que tenha relação com a primeira tabela.

A construção de um DER (Diagrama de Entidades e Relacionamentos) é o primeiro passo para a implementação de um sistema de armazenamento de dados eficiente. Nesse diagrama, as entidades, seus atributos e suas relações são representados graficamente, pois a avaliação visual do modelo é muito mais eficiente e segura. Após o desenvolvimento correto do DER, o emprego de técnicas de mapeamento possibilitam a transformação desse diagrama, em um conjunto de tabelas com suas respectivas chaves primárias e chaves estrangeiras. A partir daí, pode-se criar as tabelas resultantes em um SGBD e então povoá-lo.

Para ter acesso aos dados armazenados em um banco de dados relacional, é preciso fazer uso de uma linguagem computacional específica para consultas. Essa linguagem é conhecida com SQL (*Structured Query Language*). Trata-se de uma linguagem declarativa, e não 'procedural', o que a torna bastante simples de aprender e utilizar. Em SQL, os resultados que se deseja obter com a consulta ao banco de dados devem ser explícitos, entretanto, os mecanismo algébricos entre as entidades para obter esses resultados, são implícitos, sendo realizados automaticamente pelo SGBD. Essa linguagem foi adaptada diversas vezes pelos desenvolvedores de programas para computador, porém foi padronizada em 1992 pela ISO (*International Organization for Standardization*), e hoje é um padrão mundialmente aceito como método de consulta e manipulação de um banco de dados relacional.

## 2. JUSTIFICATIVA

A alta toxicidade dos fármacos utilizados, alto custo e a ocorrência de cepas resistentes ao tratamento são pontos relevantes que direcionam para a busca de novos alvos para quimioterapia das leishmanioses. Do ponto de vista molecular, muitos genes, mecanismos de ação e de resistência a drogas já foram descritos; apesar disso, pouco se avançou no desenvolvimento racional de novas drogas. Algumas das razões apontadas para explicar isso são as variações provocadas pelos diferentes protocolos de seleção e análise molecular do fenótipo de resistência e principalmente a grande diversidade biológica dos parasitos do gênero *Leishmania*. A grande maioria dos estudos de resistência a drogas foi realizada com espécies de *Leishmania* do Velho Mundo e pouco se sabe a respeito desses mecanismos de resistência nas espécies predominantes no Novo Mundo.

Parasitos de diferentes espécies do gênero *Leishmania* apresentam uma forte conservação na ordem e na seqüência nucleotídica de genes; dessa forma é provável que a maior parte das diferenças interespecíficas seja determinada por mecanismos de regulação da expressão gênica. Neste trabalho, procuramos contribuir para o entendimento da resistência a drogas em *Leishmania* empregando três abordagens distintas: 1) a seleção de populações de diferentes espécies de *Leishmania* resistentes ao SbIII obtidas a partir de um mesmo protocolo de cultivo e indução de resistência; 2) a análise dos genes e transcritos diferencialmente expressos nessas populações e a identificação de potenciais alvos para quimioterapia; 3) a construção de um banco de dados relacional que integre dados fenotípicos, genômicos e transcriptômicos desses parasitos. Acreditamos que nosso estudo seja de grande importância para a busca e desenvolvimento de novos alvos para a quimioterapia e para a elucidação dos mecanismos de resistência a drogas em *Leishmania*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral:

Caracterizar através de análises fenotípicas, genômicas e transcriptômicas, populações de quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo sensíveis e resistentes aos antimoniais, e identificar potenciais alvos para a quimioterapia das leishmanioses.

#### 3.2. Específicos:

- Desenvolver protocolos de cultivo e indução de resistência ao SbIII e anfotericina B usando as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) infantum chagasi*;
- Selecionar e caracterizar o fenótipo de resistência ao SbIII dessas quatro espécies de *Leishmania*, avaliando:
  - Estabilidade do fenótipo de resistência na ausência de SbIII;
  - Resistência cruzada a anfotericina B, miltefosina e paromomicina;
  - Infectividade *in vivo* e estabilidade do fenótipo de resistência após passagem em camundongos.
- Agrupar e comparar as seqüências nucleotídicas das amostras de *Leishmania* estudadas reconhecidas pelos microarranjos de DNA;
- Identificar CDS amplificadas ou deletadas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII;
- Identificar padrões conservados de amplificação ou deleção gênica na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII;
- Comparar os resultados de CGH de *L. (V.) braziliensis* com os resultados das outras espécies de *Leishmania* estudadas;

- Identificar transcritos diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII;
- Comparar a anotação funcional dos transcritos diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII;
- Comparar as os transcritos diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII com bancos de dados de alvos para drogas e com o proteoma humano;
- Comparar os genes e transcritos diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis* com aqueles identificados nas outras espécies de *Leishmania*;
- Construir um banco de dados relacional capaz de integrar os dados fenotípicos, genômicos e transcriptômicos das populações selvagens e resistentes das quatro espécies de *Leishmania* estudadas;
- Propor, baseado nos resultados deste trabalho e na literatura científica, hipóteses para explicar os mecanismos moleculares de resistência a drogas nas populações estudadas.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. CULTURA DE CÉLULAS:

#### 4.1.1. Cepas de *Leishmania* e condições de cultivo:

Neste estudo foram utilizadas quatro espécies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) guyanensis* (Tabela 2). Formas promastigotas do parasito foram cultivadas em estufa BOD a 26°C em meio definido M199, acrescido de soro fetal bovino (10%), gentamicina (50µg/mL), Hepes (40 mM), biotina (1µg/mL), hipoxantina (14µg/mL), bicarbonato de sódio (0,36 mg/mL), adenina (0,1 mM), Biopterina (6 µM) e hemina (250µg/mL), pH 7,4. Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

Tabela 2: Espécies e cepas de *Leishmania* utilizadas neste estudo.

Espécie	Cepa
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904
<i>L. (V.) guyanensis</i>	IUMB/BR/85/M9945
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MHOM/BR/74/PP75

#### 4.1.2. Drogas utilizadas no estudo:

Para a indução de resistência aos antimoniais, foi utilizado o Tartarato Potássico de Antimônio (Sigma® Cat. Nº. 383376), que possui como molécula ativa o antimoniato trivalente (SbIII). Embora esta não seja uma droga de uso comercial, provavelmente é a forma ativa dos antimoniais. As outras drogas utilizadas nesse trabalho foram: anfotericina B (Sigma® Cat. Nº. A2942), sulfato de paromomicina (Sigma® Cat. Nº. P5057) e miltefosina (gentilmente cedido pelo Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira – Universidade Federal de Minas Gerais).

#### 4.1.3. Avaliação do crescimento celular e tolerância a drogas:

A susceptibilidade *in vitro* das quatro populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII e aos compostos miltefosina, anfotericina B e paromomicina foi determinada pela concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC50). O IC50 foi determinado pela análise da redução do corante azul de Alamar®, conforme descrito por Shimony

& Jaffe (2008) com modificações. Resumidamente, as formas promastigotas de *Leishmania* foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/ml em 180µL de meio M199 contendo várias concentrações da droga. As culturas foram então incubadas por 24 h a 26 °C. Após este período, 20µL de azul de Alamar® foi adicionado a cada poço (10% concentração final) e as placas foram re-incubadas por 14-18 h a 26 °C. As placas foram então submetidas ao leitor de Elisa em comprimentos de onda de 570 e 600 nm e a porcentagem de redução do azul de Alamar® foi determinada. Curvas de tolerância a drogas e o valor do IC50 foram determinados a partir da porcentagem de redução do crescimento em relação ao controle de parasitas não tratados, utilizando um modelo de regressão sigmoidal conhecido como “dose-resposta” (Decuypere *et al.*,2005; Seifert & Croft, 2006). Cada curva foi determinada considerando em média três experimentos independentes com variáveis analisadas em triplicata.

#### **4.1.4. Indução de resistência a drogas:**

A seleção dos parasitos foi realizada em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em um volume final de 5 ml de meio M199. Inicialmente, as curvas de tolerância ao SbIII foram determinados para todas as espécies de *Leishmania*. Parasitos foram inicialmente expostos a 0,1 µM de SbIII. Este valor corresponde ao IC50 de *L. (V.) guyanensis*, a espécie mais susceptível ao SbIII dentre as espécies analisadas. Um aumento gradual na concentração da droga foi realizado apenas quando as culturas expostas a determinada concentração apresentaram uma taxa de crescimento semelhante às das culturas do tipo selvagem. Este aumento foi continuado até a concentração máxima de SbIII que permitiu o crescimento do parasito. A concentração máxima utilizada em nossos experimentos foi de 4 µM, pois valores maiores que este a droga precipitou no meio. As espécies de *Leishmania*, denominadas selvagens, foram cultivadas em meio M199 sem droga.

A indução de resistência à anfotericina B seguiu um protocolo diferente: cada população foi submetida a uma passagem na presença da droga numa concentração próxima ao IC90 (0,12 - 0,14 µg/mL). Os parasitos sobreviventes foram mantidos por, em média, três passagens na ausência de anfotericina B. Este cultivo na ausência da droga foi utilizado até que as culturas apresentassem uma taxa de crescimento semelhante às do tipo selvagem. Após cada recuperação das culturas, a droga foi novamente administrada, selecionando assim os parasitos resistentes.

#### **4.1.5. Avaliação da estabilidade do fenótipo de resistência *in vitro*:**

As populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* foram cultivadas por 50 passagens na ausência de SbIII. Após 37 e 47 subcultivos consecutivos, o IC50 foi determinado e comparado com o IC50 das populações selvagens com o objetivo de avaliar a estabilidade do fenótipo de resistência ao SbIII.

#### **4.1.6. Avaliação da infectividade em camundongos C57BL/6 nocaute para IFN- $\gamma$ (IFN-KO):**

Estes animais foram fornecidos pelo Laboratório de Imunopatologia (CPqRR/Fiocruz/MG) e mantidos sob condições padrão com as barreiras de isolamento experimental no Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou. A infectividade das populações de *Leishmania* resistentes e suscetíveis ao SbIII foi determinada pela infecção do  $1 \times 10^7$  promastigotas metacíclicos na fase estacionária proveniente de 6 dias de cultura. As populações de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foram inoculadas no coxim plantar dos camundongos C57BL/6-IFN $\gamma$ -KO e o crescimento da lesão foi medida conforme protocolo descrito por Cunningham (2001). Dois experimentos diferentes utilizando quatro camundongos por população foram realizados neste estudo.

Os parasitos de *L. (L.) infantum chagasi* foram inoculados via intraperitoneal. Após 20, 40 e 60 dias de infecção, grupos de seis animais infectados com populações selvagens ou resistentes ao SbIII (dois animais por cada dia após infecção) foram sacrificados. Fígado e baço destes camundongos foram macerados em solução salina e as células cultivadas em tubos contendo 5ml de meio de M199. Os tubos foram incubados a 28°C por 60 dias e examinados ao microscópio observando a presença de parasitas. Este experimento com seis camundongos por grupo foi repetido duas vezes.

#### **4.1.7. Estabilidade do fenótipo de resistência *in vivo* da população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII:**

Parasitos recuperados das lesões no 45<sup>o</sup> dia após a infecção foram cultivados em meio M199 sem droga. Posteriormente, esses parasitos foram submetidos a testes de susceptibilidade ao SbIII usando o ensaio colorimétrico com azul de Alamar<sup>®</sup>. O IC50 foi determinado após uma passagem dos parasitos selvagens e resistentes ao SbIII em camundongos.

#### **4.1.8. Análise estatística:**

As curvas de regressão sigmoidal foram realizadas empregando o programa Microcal™ Origin™, versão 5.0 (Microcal software Inc, Northampton, MA, EUA). Os demais dados estatísticos foram analisados pelo teste *t*-Student utilizando o software INSTAT (GraphPad, San Diego, CA, EUA). O valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **4.2. BIOLOGIA MOLECULAR:**

### **4.2.1. Extração de DNA:**

O DNA foi extraído pelo método fenol: clorofórmio, conforme descrito por Maniatis e colaboradores (1982). Resumidamente, o sedimento de promastigotas (aproximadamente  $10^8$  parasitos) foi ressuspenso em tampão de extração contendo 50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0 e incubado com 100 µg/mL de proteinase K por 12h a 37 °C. Posteriormente, o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1 e clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 100% e acetato de sódio 0,3 M a -20°C por 12h. O DNA foi então lavado 2X com etanol 70% e ressuspenso em 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0). Posteriormente o DNA foi tratado com RNase (Invitrogen) conforme protocolo descrito pelo fabricante. A concentração do DNA obtido foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorvância 260 nm = 50 µg/mL .

### **4.2.2. Extração de RNA total:**

O RNA total das diferentes cepas de *Leishmania* foi extraído com TRIZOL (INVITROGEN). O sedimento de parasitos (cerca de  $1 \times 10^9$  promastigotas) foi ressuspenso no TRIZOL (v / v). Após a adição de 200 µl de clorofórmio, a suspensão foi homogeneizada e incubada por 15 min no gelo e posteriormente centrifugada a 13.400 xg por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo contendo o mesmo volume de isopropanol 95% e incubado a -20 °C por 12-18 h. O RNA assim precipitado foi então lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em água autoclavada, estéril e livre de RNase. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorvância  $260_{nm} = 40 \mu\text{g/mL}$ . Após a dosagem, 200µg de RNA total foi tratado com DNase (Kit Ambion) conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os controles da síntese de cDNA com e sem



enzima transcriptase reversa mostraram a pureza do RNA e ausência de DNA contaminante.

#### 4.2.3. Microarranjo de DNA:

Os ensaios de microarranjos de DNA foram realizados em colaboração com o Dr. Stephen Beverley (Washington University in St. Louis), entretanto as análises dos dados foram realizadas em nosso laboratório. O microarranjo foi desenvolvido conforme descrito por Akopyants e colaboradores (2004). Resumidamente, oligonucleotídeos de 70 monômeros (70mer) foram desenhados utilizando o programa TOP (McPherson, unpublished) com base na versão 2.0 do genoma de *L. major* Friedlin FV1 (*Leishmania* GeneDB, Sanger Center, Cambridge, UK). O microarranjo final consistiu de 13.311 oligonucleotídeos, a maior parte (12.779) desenhados a partir do genoma nuclear de *L. major*. Dentre os demais, 532 oligos consistiam em controles (sequências de vetor, camundongo e “cassetes” de resistência a drogas); 132 maxicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. major* e outras sequências de *L. infantum chagasi* e *L. tarentolae*.

Os oligonucleotídeos foram impressos em triplicatas nas lâminas (Corning epoxide slides, Corning, CA), numa concentração de 25 µM em SSC 3X 0,75 M Betaína. Após impressão, os microarranjos foram ressecados e armazenados em temperatura ambiente. As amostras de cDNA de cada uma das populações selvagens e resistentes ao SbIII das quatro espécies de *Leishmania* foram preparadas a partir de 8 µg de RNA total. A transcrição reversa foi realizada com o kit SuperScript™ II (Invitrogen, Carlsbad, CA) e a marcação com fluorescência e hibridização foram realizadas com o kit 3DNA Array 350™ (Genisphere, Hatfield, PA), conforme protocolo do fabricante. A hibridização foi realizada em câmara úmida a 42°C “overnight”. Após a hibridização as lâminas foram lavadas por 12 minutos a 40 °C em SSC 2X, SDS 0,2%; 12 minutos em SC 2X e finalmente 12 minutos em SSC 0,2X em temperatura ambiente. Os microarranjos foram escaneados pelo menos três vezes com diferentes ajustes de detecção, utilizando o Axon GenePix 4200AL (MDS, CA).

Para cada população estudada (selvagem e resistente de cada espécie), foram realizados dois experimentos independentes, que foram comparados entre si e com troca de corantes (dye-swap) (Churchill *et al.*, 2002). A análise das imagens foi realizada utilizando o programa BlueFuse v3.5 (BlueGnome Ltd, UK) conforme metodologia previamente descrita (Van den Ijssel *et al.*, 2005). Poços foram

excluídos quando apresentavam qualidade menor que 1 ou o valor de confiança menor que 0,2 e após processamento dos dados

### **4.3. BIOINFORMÁTICA:**

#### **4.3.1. Linguagem de Programação:**

Foi utilizada a linguagem de programação em ambiente UNIX conhecida como PERL (Practical Extration and Report Language) (<http://www.perl.org>)

#### **4.3.2. ARTEMIS e ACT (ARTEMIS Comparison Tool):**

O ARTEMIS (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>) é uma ferramenta de visualização e anotação de seqüências de DNA e disponibiliza os resultados das análises na própria seqüência e nos seus respectivos seis quadros de leitura (ORFs). O programa foi escrito em linguagem Java e foi utilizado como uma das ferramentas de anotação dentro do projeto (Mural, 2000; Rutherford *et al.*, 2000).

O ACT é um visualizador de resultados de comparações feitas entre seqüências de DNA baseado no programa ARTEMIS (Mural, 2000; Rutherford *et al.*, 2000). O programa é escrito em Java, lê diferentes formatos de seqüências tais como EMBL ou GENBANK bem como "feature tables" e podem trabalhar com seqüências de quaisquer tamanhos, inclusive genomas inteiros.

#### **4.3.3. Agrupamento e alinhamento local de seqüências:**

O agrupamento das seqüências dos oligonucleotídeos foi feito utilizando o programa de agrupamento de montagem de contíguos genômicos CAP3 (Huang & Madan, 1999). O programa pode ser instalado diretamente no computador e a documentação está disponível em (<http://genome.cs.mtu.edu/sas.html>). Já a identificação dos genes foi feita utilizando o programa de alinhamento local de seqüências BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

#### **4.3.4. Identificação e representação de motivos:**

O programa MEME é utilizado na busca por motivos em seqüências de DNA ou proteínas que ocorrem mais freqüentemente que o acaso (Bailey & Elkan, 1994; Bailey & Gribskov, 1998). Neste trabalho ele foi utilizado para identificar padrões moleculares nas regiões 3' e 5' UTR dos genes identificados pelo CGH. O programa pode ser acessado via web (<http://meme.sdsc.edu>) ou instalado diretamente no

computador. As múltiplas ocorrências de cada motivo foram alinhadas e submetidas ao Weblogo (Crooks *et al.*, 2004). Este programa gera uma representação gráfica de múltiplos alinhamentos onde o tamanho do caractere representa o grau de conservação de cada nucleotídeo.

#### **4.3.5. Bancos de dados e genomas utilizados:**

Os genes e transcritos identificados pelos microarranjos de DNA foram comparados com os seguintes genomas e bancos de dados:

Seqüências de *L. (L.) major* → neste trabalho foram utilizados o genoma predito e as seqüências de nucleotídeos dos 36 cromossomos de *L. (L.) major* depositadas no Gene DB versão 5.2 de 31/07/2007 e no TriTrypDB versão 2.0;

Seqüências de *L. (L.) infantum* → foram utilizados o genoma predito e as seqüências de nucleotídeos dos 36 cromossomos de *L. (L.) infantum* depositadas no Gene DB versão 3.0 de 08/05/2008 e no TriTrypDB versão 2.0;

Seqüências de *L. (V.) braziliensis* → foram utilizados o genoma predito e as seqüências de nucleotídeos dos 35 cromossomos de *L. (V.) braziliensis* depositadas no Gene DB versão 2.0 de 29/07/2008 e no TriTrypDB versão 2.0;

Banco de dados NR do NCBI → os oligonucleotídeos dos microarranjos foram comparados com o banco de dados não redundante de proteínas do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/> - acessado em 03/04/2009);

ENZYME → repositório contendo informações relativas à nomenclatura de enzimas baseado nas recomendações da “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB – acessado em 30/09/2009);

COG → banco de dados de todas as proteínas (ou domínios) dos 66 genomas completos do COG, classificados em grupos ortólogos. Ao todo são 192.987 seqüências (acessado em 03/01/2010);

Drug\_Bank → banco de dados de alvos para drogas, o banco conta com 4.535 seqüências de aminoácidos alvos para diferentes drogas (acessado em 03/01/2010);

Proteoma predito humano → foram utilizadas para comparação um total de 37.391 seqüências do proteoma predito humano depositadas no banco de dados de referência, RefSeq, do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/> - acessado em 03/01/2010).

#### **4.3.6. Criação do banco de dados relacional:**

O DER desenvolvido para integrar todas as predições foi desenhado no programa MySQL Workbench (<http://dev.mysql.com/workbench/>). Em sua versão de livre distribuição, esse programa auxilia na construção do DER (no qual as entidades já são tratadas como tabelas), além de criar automaticamente comandos SQL (*Structured Query Language*) para a implementação do MR (Modelo Relacional). O banco de dados foi implementado no SGBD MySQL versão 5 (<http://www.mysql.com/>).

#### **4.3.7. Inserção das predições no banco de dados relacional:**

Para realizar a inserção dos dados das predições realizadas a partir da ferramentas específicas no banco de dados relacional, antes foi necessário fazer o tratamentos dos resultados a partir de *scripts* (em linguagem Perl) exclusivamente desenvolvidos para essa tarefa. Essa etapa é necessária porque os dados precisam estarem ajustados às definições estabelecidas, inicialmente, no modelo de dados proposto.

## 5. RESULTADOS

### PARTE 1: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE *Leishmania* spp. SELVAGENS E RESISTENTES AO SbIII.

#### 5.1. Curvas de crescimento e tolerância ao SbIII:

Para o sucesso na indução de resistência de quatro espécies distintas de *Leishmania* a partir de um protocolo comum, o primeiro passo foi determinar as curvas de crescimento dos parasitos e o intervalo utilizado entre cada repique. As curvas de crescimento foram determinadas pelo método colorimétrico em placas de 96 poços e empregando o corante de viabilidade celular azul de Alamar<sup>®</sup> conforme protocolo descrito na metodologia. O Alamar foi adicionado após 24 h de cultivo das células em meio M199 na presença ou ausência do SbIII. As placas foram lidas no tempo 0, a partir da adição do azul de Alamar<sup>®</sup> e diariamente por um período de sete dias. O crescimento celular relativo foi determinado pelo percentual de redução do corante. Cada cultura foi testada em triplicata e os resultados apresentados correspondem à média de no mínimo dois ensaios independentes.

A Figura 4 representa as curvas de crescimento das quatro espécies de *Leishmania* estudadas. A análise do gráfico sugere que parasitos do subgênero *Viannia* têm crescimento mais lento que parasitos do subgênero *Leishmania*. Considerando o percentual de redução diário do corante, foi observado aproximadamente 16% a 18% de redução do Azul de Alamar<sup>®</sup> por dia nas culturas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*; por outro lado, nas culturas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* esse valor foi de 24% a 30% (dados não mostrados). Com base no crescimento médio das culturas apresentados na Figura 4, é possível observar a ocorrência de três momentos distintos:

(a) Durante as primeiras vinte e quatro horas após o repique, o crescimento das culturas é lento, tendo sido observado 6% a 25% de redução do Azul de Alamar<sup>®</sup>. Curiosamente, *L. (V.) braziliensis* apresentou percentual de redução superior às demais espécies (29%).

(b) Nas quarenta e oito horas seguintes ao primeiro dia de cultivo, foi observado um crescimento acelerado das culturas, com aumento no percentual de redução do Azul de Alamar<sup>®</sup> (22% a 38% por dia). Nas culturas de *L. (L.) amazonensis*, mais de 90% do Azul de Alamar<sup>®</sup> foi reduzido até o terceiro dia de

cultivo. Novamente as culturas de *L. (V.) braziliensis* apresentaram um padrão distinto das demais populações, apresentando no segundo dia de cultivo um percentual de redução do corante de 10%.

(c) Após o terceiro dia de cultivo, houve uma diminuição no percentual de Azul de Alamar<sup>®</sup> reduzido por dia. Nos parasitos do subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*) foi observado uma linearização das curvas de crescimento. Esse resultado não foi observado nos parasitos do subgênero *Leishmania* (*L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*) provavelmente porque quase todo o corante já havia sido reduzido. Esses ensaios foram repetidos posteriormente com um número menor de parasitos e maiores concentrações do Azul de Alamar<sup>®</sup>, e confirmaram a linearização das curvas.

A análise dos resultados sugere que, nas condições de cultivo apresentadas, o período ideal para repique das culturas é após três dias de cultivo. Nesse período os parasitos já possuem reduzida capacidade de multiplicação sem, no entanto apresentar sinais de regressão da cultura. Também é importante ressaltar que a quantificação relativa dos parasitos deve ser feita preferencialmente por volta do terceiro dia de cultura de modo a prevenir a completa redução do azul de Alamar<sup>®</sup>.

### Curvas de crescimento de quatro espécies de *Leishmania*.

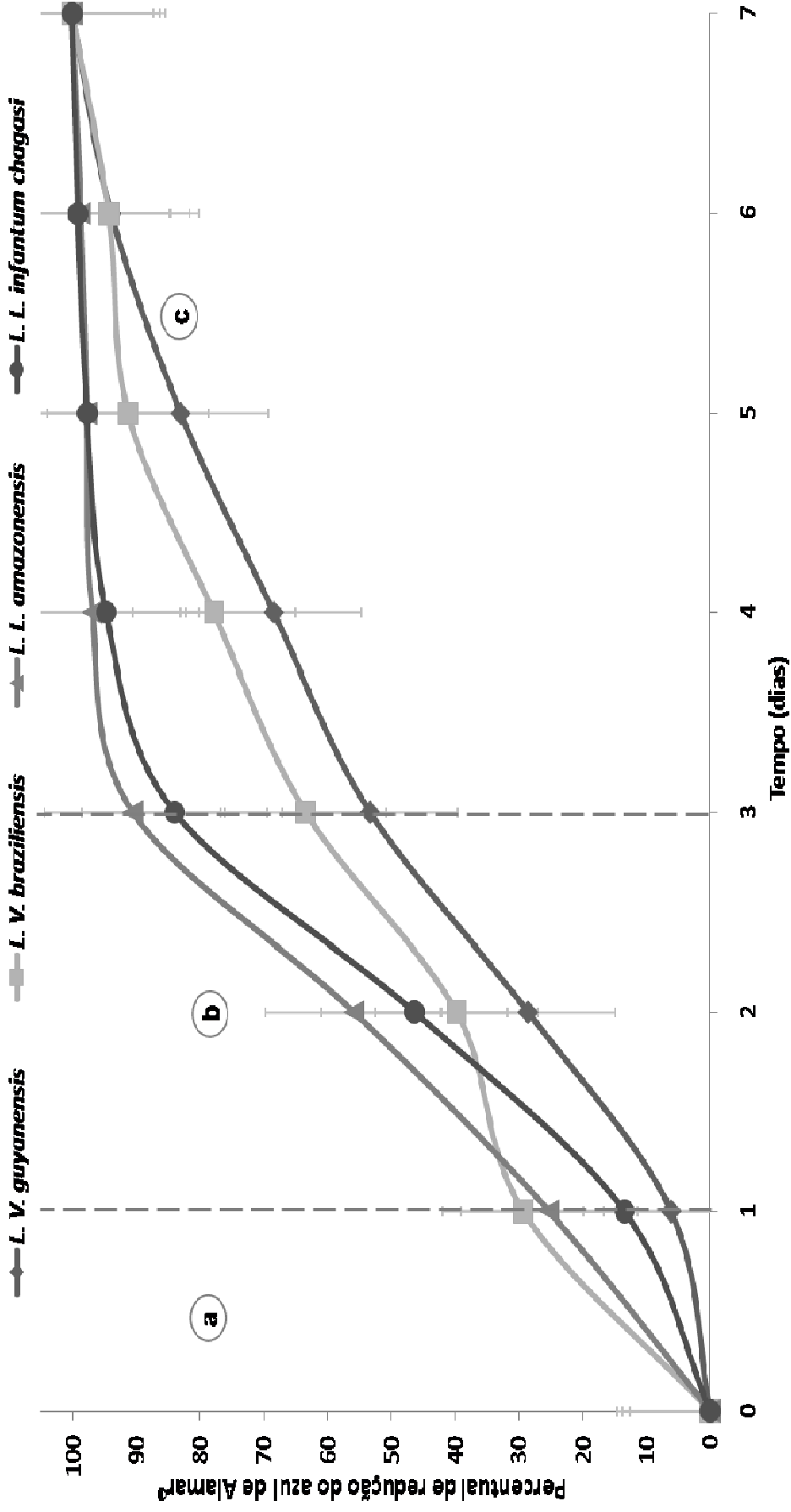


Figura 4: Curvas de crescimento de quatro espécies de *Leishmania*. Na Figura, estão representadas culturas de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa PH8), *L. V. braziliensis* (cepa M2904), *L. (L.) infantum chagasi* (cepa PP75) e *L. V. guyanensis* (cepa M9945). O crescimento das culturas é determinado pelo percentual de redução do Azul de Alamar® em função do tempo. As linhas tracejadas indicam as três fases observadas (a, b e c, ver texto). Inicialmente, foram semeados 10<sup>6</sup> parasitos por poço, em triplicata e os resultados apresentados representam a média de pelo menos dois ensaios independentes.

Foram construídas curvas de tolerância ao SbIII. O IC50 foi determinado em cada uma das populações selvagens de *Leishmania* a partir da redução do azul de Alamar<sup>®</sup>. Curvas de tolerância ao SbIII foram construídas utilizando o modelo de regressão sigmoidal. A Figura 5 representa as curvas de tolerância ao SbIII das quatro espécies de *Leishmania* estudadas. O IC50 das populações selvagens variou de 0,09  $\mu\text{M}$  (*L. (V.) guyanensis*, cepa M9945) a 0,33  $\mu\text{M}$  (*L. (L.) infantum chagasi*, cepa PP75). Cepas pertencentes ao subgênero *Viannia* foram 1,9 a 3,7 vezes mais sensíveis ao SbIII do que as cepas do complexo *Leishmania*.

Estas informações são fundamentais para o desenvolvimento de protocolos de indução de resistência dessas populações ao SbIII. Conforme apresentado na Figura 5, existem diferenças significativas quanto à tolerância ao SbIII, de acordo com a espécie de *Leishmania* estudada. Estas diferenças limitam o desenvolvimento de protocolos de indução de resistência comuns a todas as espécies do parasito, conforme apresentado a seguir.



## Curvas de tolerância ao SbIII de quatro espécies de *Leishmania*.

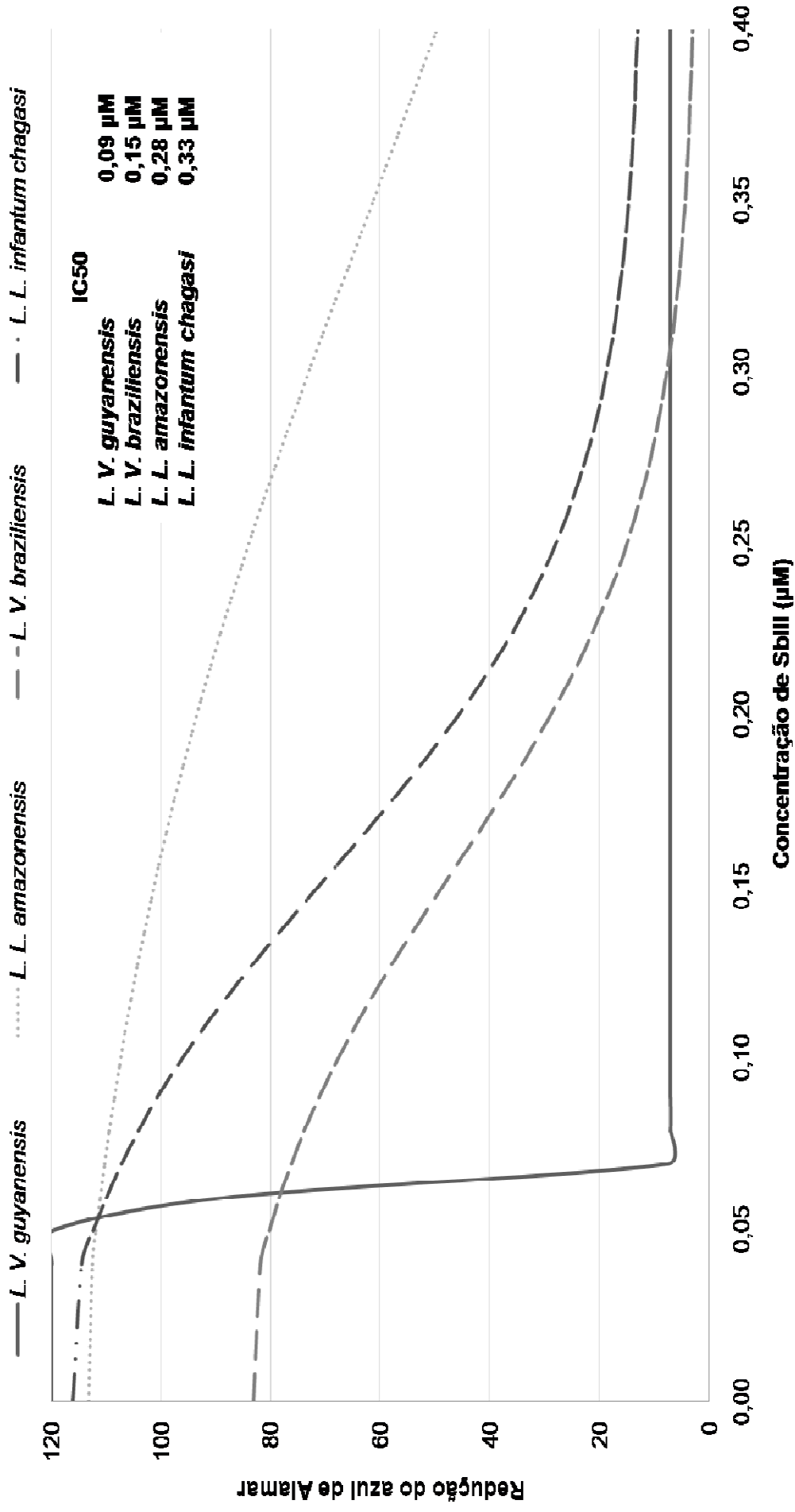


Figura 5: Curvas de tolerância ao SbIII de quatro espécies de *Leishmania*. Na Figura, estão representadas as espécies *L. (L.) amazonensis* (cepa PH8), *L. V. braziliensis* (cepa M2904), *L. (L.) infantum chagasi* (cepa PP75) e *L. V. guyanensis* (cepa M9945). Os valores de IC50 também estão apresentados. Cada cultura foi realizada em triplicata em pelo menos três ensaios independentes.

## 5.2. Seleção *in vitro* das populações de *Leishmania* spp. resistentes ao SbIII:

Para a indução de resistência *in vitro* ao SbIII foi utilizado um protocolo de cultivo do parasito na presença de concentrações gradualmente maiores da droga. Como os valores de IC50 variam significativamente nas populações das quatro espécies selecionadas do parasito, as culturas foram inicialmente submetidas a 0,1  $\mu$ M de SbIII. Essa concentração corresponde aproximadamente ao IC50 da população mais sensível (*L. (V.) guyanensis*). Os repiques foram feitos entre quatro e sete dias. Um aumento gradual na concentração do SbIII, que variou de 0,1 a 4,0  $\mu$ M, foi realizado apenas quando as culturas expostas a determinada concentração de SbIII tiveram uma taxa de crescimento semelhante às das culturas do tipo selvagem. A concentração máxima de SbIII utilizada nesses experimentos foi de 4  $\mu$ M, pois valores maiores que este o SbIII precipita no meio.

A indução de resistência ao SbIII foi iniciada em setembro de 2006 e o processo de seleção dos parasitas resistentes durou 18 meses. O acompanhamento do processo de indução de resistência, em termos de aumento do IC50, bem como as concentrações de SbIII adicionadas a cada cultura podem ser observados na Figura 6. A concentração do SbIII foi aumentada até 4,0  $\mu$ M. Aparentemente, o protocolo utilizado foi menos eficiente na indução de resistência ao SbIII em espécies do subgênero *Leishmania*. Nessas populações a concentração de SbIII adicionada à cultura foi aumentada em até 14 vezes o IC50 das populações selvagens; no entanto foi observado um aumento de apenas 4 a 6 vezes no IC50 das populações resistentes (Figura 6).

## Indução de resistência ao SbIII de quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo.

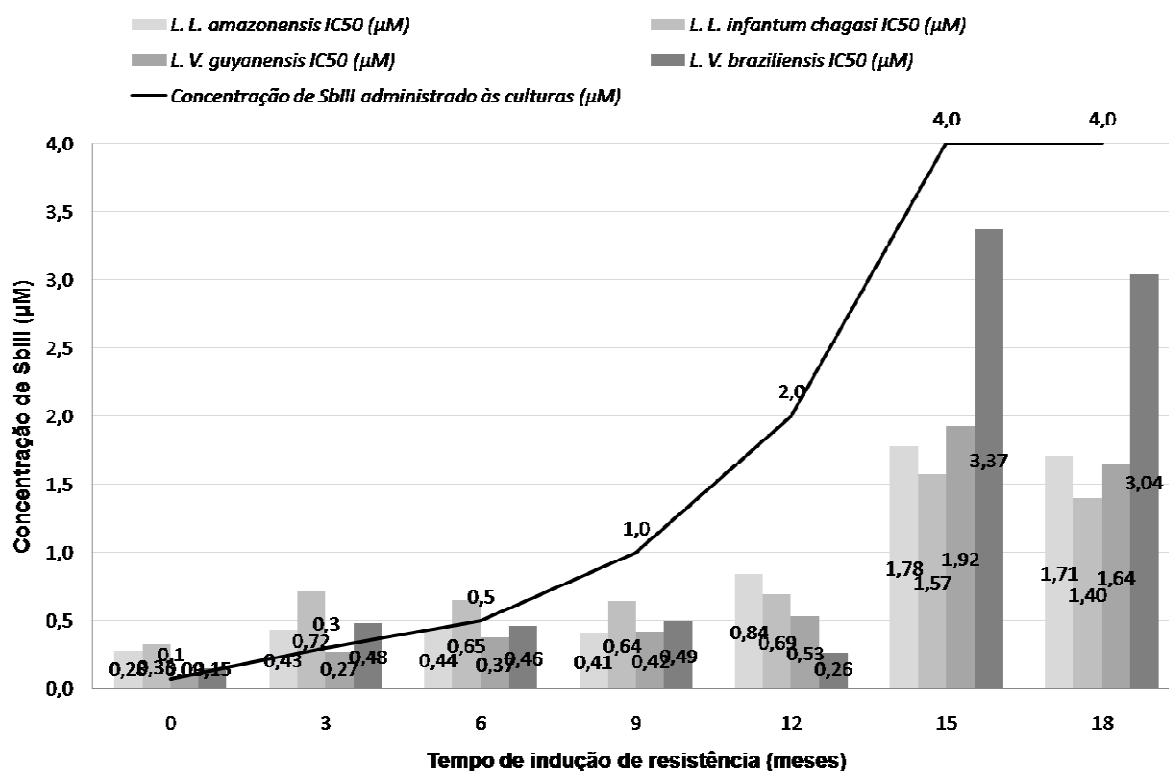


Figura 6: Indução de resistência ao SbIII em populações de quatro espécies de *Leishmania*. Na Figura, a concentração da droga está representada pela linha contínua, enquanto o IC50 das populações em estudo é representado por barras verticais. O acompanhamento do processo de indução de resistência foi realizado no período de setembro de 2006 (quando foi iniciada a adição da droga às culturas) até abril de 2008.

Ao final da indução de resistência, foram selecionadas populações selvagens e resistentes ao SbIII de quatro espécies de *Leishmania*. O IC50 das populações resistentes variou de 1,4 µM (*L. (L.) infantum chagasi*) a 3,04 µM (*L. (V.) braziliensis*). Parasitos do subgênero *Viannia* apresentaram maiores coeficientes de resistência (razão entre os valores de IC50 das populações resistentes e selvagens) do que parasitos do subgênero *Leishmania*. Os coeficientes de resistência ao SbIII para *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* foram de 19 e 20 vezes, respectivamente. Já para as populações de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* esses valores foram de 6 e 4 vezes, respectivamente. Todas as quatro populações resistentes foram mantidas por um período adicional de quatro meses em meio contendo SbIII. O índice de resistência de cada população após esse período foi o mesmo, mostrando que o fenótipo de resistência a drogas está

estabilizado. Os valores de IC50 e o coeficiente de resistência das populações selvagens (WTS) e resistentes ao SbIII (SbR) estão apresentados na Tabela 3:

Tabela 3: Sensibilidade ao SbIII e coeficiente de resistência de populações selvagens (WTS) e com resistência induzida *in vitro* ao SbIII (SbR) de quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo.

Espécie	IC50 ± IC (µM)			Coeficiente de resistência	Coeficiente de resistência <sub>rev</sub>
	WTS	SbR	SbR <sub>rev</sub>		
<i>L. (V.) braziliensis</i>	0,15 ± 0,13	3,04 ± 0,12	1,52 ± 0,16	20	10
<i>L. (V.) guyanensis</i>	0,09 ± 0,03	1,64 ± 0,13	1,65 ± 0,10	19	19
<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,28 ± 0,13	1,71 ± 0,10	0,84 ± 0,19	6	3
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	0,33 ± 0,08	1,40 ± 0,03	1,37 ± 0,10	4	4

IC → Intervalo de confiança.

Coeficiente de resistência<sub>rev</sub> → Coeficiente de resistência da população SbR mantida por 37 passagens na ausência de SbIII.

A Tabela 3 também mostra os resultados do IC50 e coeficiente de resistência de populações com resistência ao SbIII induzida *in vitro* e posteriormente cultivadas na ausência de drogas para avaliação da estabilidade do fenótipo (população SbR<sub>rev</sub>). Essa análise será mais bem apresentada no item a seguir. É importante comentar ainda que, durante a indução de resistência a drogas, além das cepas de quatro espécies de *Leishmania* descritas, outras duas cepas (uma de *L. (L.) amazonensis* e outra de *L. (V.) guyanensis*) também foram utilizadas. Porém os resultados observados foram semelhantes aos das cepas de mesma espécie previamente descritas e por esse motivo não serão caracterizadas nesse estudo. Além do SbIII e da anfotericina B, foram testados protocolos de indução de resistência a outras duas drogas: metotrexato (um anticancerígeno) e paromomicina. Essas duas drogas não induziram resistência significativa, empregando os protocolos que definimos anteriormente, por isso a indução de resistência foi descontinuada.

### 5.3. Avaliação de estabilidade do fenótipo e resistência cruzada:

A estabilidade do fenótipo de resistência foi avaliada após 37 passagens dos parasitas resistentes em meio de cultura na ausência de SbIII (Tabela 3). Essas subpopulações foram denominadas parasitos revertentes (SbR<sub>rev</sub>). Após este período de cultivo na ausência de SbIII, nenhuma alteração foi observada nos coeficientes de

resistência das populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* (19 vezes) e *L. (L.) infantum chagasi* (4 vezes). Por outro lado, uma diminuição no coeficiente de resistência após cultivo na ausência de SbIII foi observada nas populações resistentes de *L. (V.) braziliensis* (de 20 para 10 vezes) e *L. (L.) amazonensis* (de 6 para 3 vezes). Estas quatro sub-populações foram cultivadas por mais 10 passagens na ausência de SbIII, porém o coeficiente de resistência remanescente permaneceu estável (dados não mostrados).

A ocorrência de resistência cruzada entre SbIII e outras drogas foi avaliada a partir da determinação da susceptibilidade *in vitro* das populações WTS e SbR das quatro espécies de *Leishmania* aos compostos anfotericina B, miltefosina e paromomicina. O IC50 para cada fármaco foi determinado pelo ensaio colorimétrico usando o azul de Alamar. Os coeficientes de resistência a cada droga foram calculados, sendo considerados significativos apenas aqueles maiores ou iguais a dois. Os resultados dessa análise estão mostrados na Figura 7. Os números acima de cada barra indicam o coeficiente de resistência.

Nenhuma das populações resistentes apresentou resistência cruzada à anfotericina B ou miltefosina (Figura 7A e 7B). Todas as populações resistentes ao antimônio foram discretamente mais suscetíveis ao miltefosina, comparadas às populações WTS. No entanto essa diferença não é significativa (Figura 7B). Por outro lado, as populações resistentes ao SbIII de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* foram também resistentes à paromomicina comparados com os seus respectivos pares susceptíveis, mostrando coeficientes de resistência de 2, 4 e 5 vezes, respectivamente (Figura 7C). A população de *L. (V.) guyanensis* resistente ao SbIII não apresentou resistência a paromomicina.

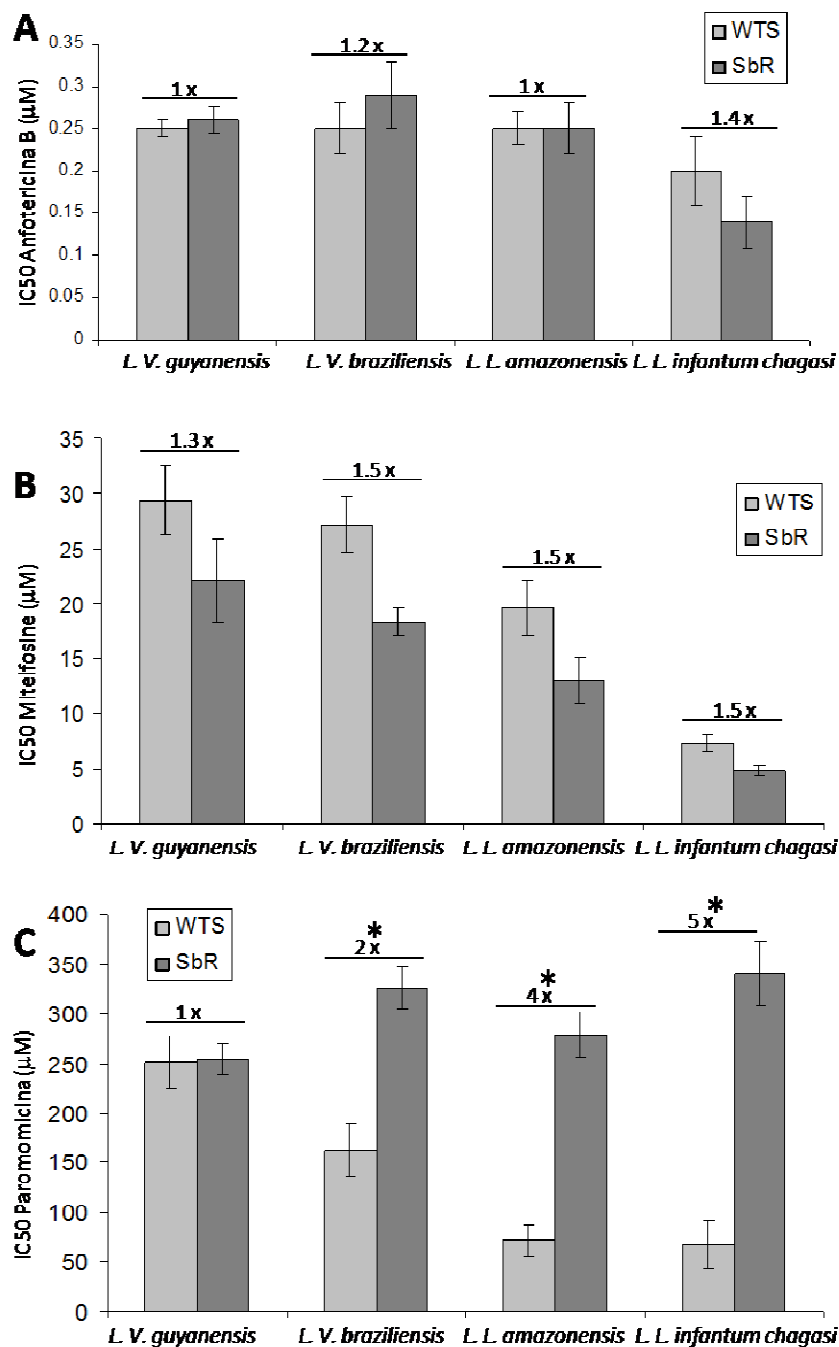


Figura 7: Susceptibilidade das populações de *Leishmania* spp. selvagens (WTS) e resistentes ao SbIII (SbR) às drogas: anfotericina B (A), miltefosina (B), e paromomicina (C). O IC<sub>50</sub> de cada droga (µM) foi determinado pela redução do azul de Alamar. Os ensaios foram feitos em triplicata em três experimentos independentes. \* → IC<sub>50</sub> difere significativamente entre populações SbR e WTS ( $p < 0.0005$ ). Os números acima de cada barra indicam o coeficiente de resistência (valores maiores que 2 foram considerados significativos).

#### 5.4. Avaliação da infectividade e estabilidade do fenótipo *in vivo*:

A infectividade das populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII foi avaliada utilizando o modelo murino. Formas promastigotas metacíclicas de cada população foram inoculadas em camundongos C57BL/6 IFN $\gamma$ -KO, e o aparecimento de lesão foi acompanhado ao longo do tempo. As populações selvagens de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foram altamente infectantes. Estes parasitas causaram lesões que apareceram após 12 dias da infecção e elas progrediram rapidamente. Devido ao grande tamanho das lesões, os camundongos inoculados com essas populações suscetíveis foram sacrificados após 50 dias de infecção. A população susceptível *L. (V.) guyanensis* produziu maiores lesões que *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Embora os parasitos tenham sido inoculados apenas nos coxins plantares dos camundongos, nódulos e lesões também foram observados nas caudas dos camundongos infectados com a população selvagem de *L. (V.) guyanensis* (dados não mostrados).

Uma drástica redução na infectividade foi observada nos camundongos inoculados com populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Estes parasitas produziram lesões muito pequenas após 40 dias de infecção, e as lesões não progrediram. *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII produziu lesões maiores que as outras populações resistentes. As lesões produzidas nesses camundongos progrediram mais lentamente (apareceram depois de 37 dias) e atingiram menor diâmetro (2,1 *versus* 4,5 mm) que as lesões produzidas por parasitas suscetíveis. Os resultados dessa análise estão apresentados na Figura 8.

A infectividade das populações de *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII foi determinada pela infecção de promastigotas metacíclicos por via intraperitoneal nos camundongos C57BL/6 IFN $\gamma$ -KO. Após 20, 40 e 60 dias de infecção, seis camundongos de cada grupo (selvagem e resistente ao SbIII) foram sacrificados. Células do fígado e baço de cada animal foram cultivadas em meio M199 e examinadas ao microscópio para detectar a presença de parasitos. As culturas foram negativas após 30 e 60 dias de incubação, mostrando que ambas as populações perderam a infectividade. Este fato pode ser devido a passagens contínuas dos parasitos em cultura. Novos estudos para confirmar essa hipótese já estão sendo realizadas utilizando modelo de hamster para avaliação de infecção *in vivo*.

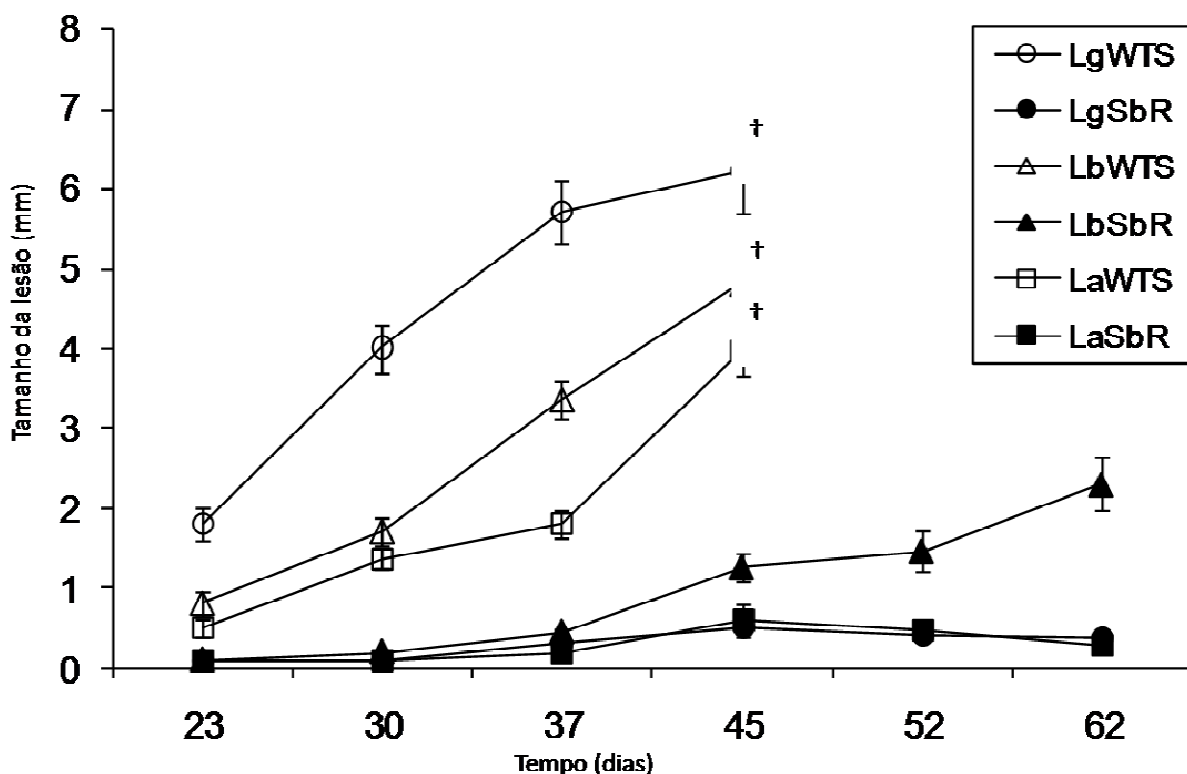


Figura 8: Patologia observada em camundongos C57BL/6 IFN- $\gamma$  KO infectados com populações de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* selvagens ou resistentes ao SbIII. Camundongos foram infectados na pata com  $1 \times 10^7$  promastigotas metacíclicos (sexto dia de fase estacionária) e a progressão da doença foi avaliada pelo tamanho da lesão. Os resultados apresentados correspondem à média e o desvio padrão de dois ensaios independentes. † Camundongos inoculados com populações selvagens foram sacrificados no quinquagésimo dia após a infecção.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade *in vivo* do fenótipo de resistência ao SbIII, populações selvagens e resistentes de *L. (V.) braziliensis* foram recuperadas das lesões no dia 45<sup>o</sup> dia após infecção. Estes parasitas foram repicados duas vezes em meio M199 sem droga e em seguida, submetidos a testes de suscetibilidade ao SbIII. Os parasitas resistentes recuperados dos camundongos (denominados LbSbR M1P2) apresentaram valores de IC50 ( $2,84 \pm 0,14 \mu\text{M}$ ) próximos àqueles dos parasitos resistentes mantidos em meio M199, na presença de SbIII ( $3,04 \pm 0,12 \mu\text{M}$ ). Esse resultado mostra que o fenótipo de resistência de *L. (V.) braziliensis* ao SbIII se manteve estável após uma passagem dos parasitos em camundongos.



### 5.5. Indução de resistência à Anfotericina B:

Além do Tartarato potássico de antimônio, foram realizados ensaios de indução de resistência a Anfotericina B nas quatro espécies de *Leishmania* estudadas. No Brasil a Anfotericina B é a droga de segunda escolha no tratamento das leishmanioses e em alguns países como Índia ela é de primeira escolha. Assim, é importante conhecer seus mecanismos de resistência. Inicialmente foram realizadas curvas de tolerância à droga nas quatro espécies de *Leishmania* estudadas (Figura 9).

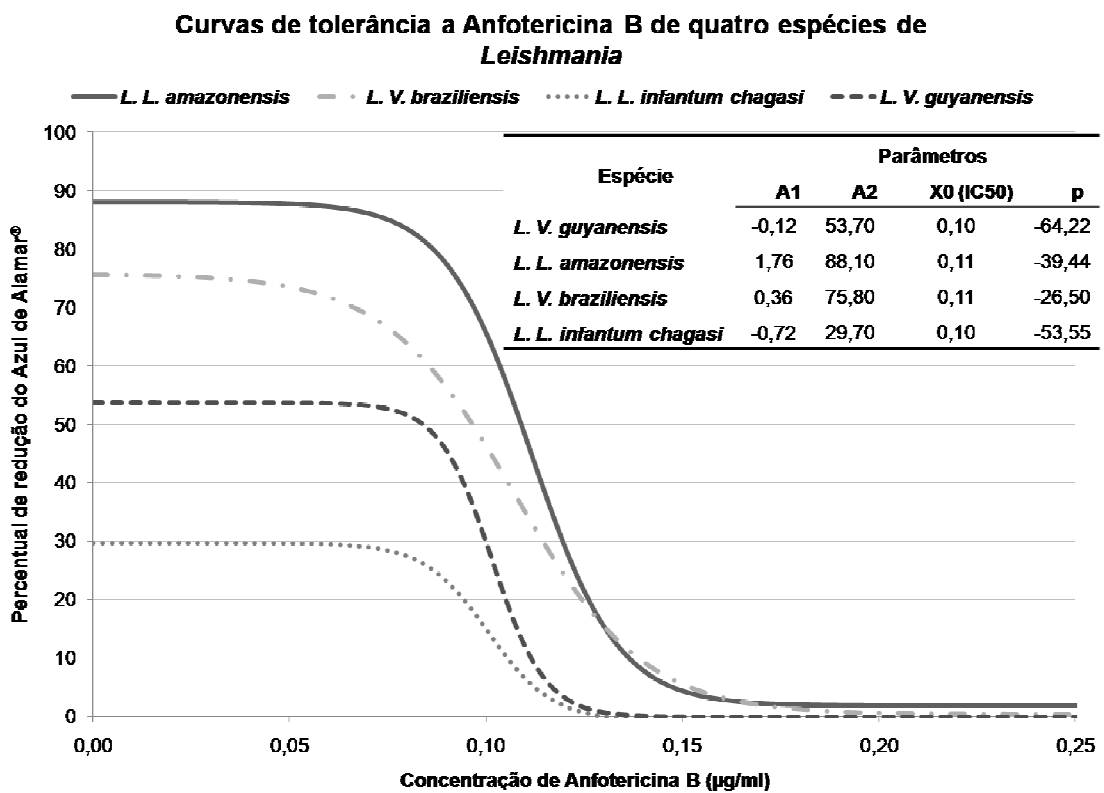


Figura 9: Curvas de tolerância à Anfotericina B de quatro espécies de *Leishmania*.

Na Figura, estão representadas as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) guyanensis*. A curva de tolerância é determinada pelo percentual de redução do Azul de Alamar® em função da concentração da droga. Cada espécie de *Leishmania* foi testada em triplicata e os resultados apresentados representam a média de pelo menos três ensaios independentes. A tabela mostra os parâmetros utilizados em cada curva: A1 e A2 → assíntotas inferior e superior, respectivamente;  $X_0(IC_{50})$  → centro da curva; p → coeficiente de decaimento.

Conforme pode ser observado na Figura 9, os percentuais de redução do Azul de Alamar® variaram de aproximadamente 30% a 87%, de acordo com a espécie de *Leishmania*. No entanto, essa variação não tem correlação com o IC<sub>50</sub> da anfotericina B das quatro espécies, cujos valores foram muito próximos (aproximadamente 0,1 µg/mL).

A partir desses resultados, foram iniciados os ensaios de indução de resistência à AMB. O protocolo de indução de resistência por cultivo na presença de concentrações gradativamente maiores de anfotericina B foi utilizado com o objetivo de obter populações resistentes à droga. No entanto, as populações tratadas com 0,1 µg/mL de AMB (o que corresponde ao IC<sub>50</sub> das quatro espécies) não sobreviveram a mais que três passagens na presença da droga. Procurou-se então utilizar concentrações de droga inferiores a 0,1 µg/mL (0,05 e 0,02 µg/mL). Porém não foram observadas alterações significativas no IC<sub>50</sub> de nenhuma das populações de *Leishmania*, mesmo após seis meses de indução de resistência. Após esse período, foi proposto um novo protocolo para obtenção de populações de *Leishmania* resistentes à AMB.

Na prática, o protocolo de indução por cultivo na presença de concentrações gradativamente maiores de AMB foi substituído por um protocolo de seleção de subpopulações resistentes à AMB. Cada população foi submetida a uma passagem na presença de AMB numa concentração próxima ao IC<sub>90</sub> (0,12 - 0,14 µg/mL). Os parasitos sobreviventes foram então mantidos por, em média, três passagens na ausência de AMB, até que o crescimento da cultura fosse semelhante àquele antes da adição da droga. Após cada recuperação das culturas, a AMB foi novamente adicionada ao meio, selecionando assim os parasitos resistentes. Novas curvas de tolerância à AMB foram realizadas somente após aproximadamente seis e dezoito meses de cultivo utilizando esse protocolo, devido ao pequeno número de parasitos obtidos após cada passagem na presença da droga. Os valores de IC<sub>50</sub> das populações selvagens (WTS) e selecionadas após seis meses (AMB-R<sup>1</sup>) e dezoito meses (AMB-R<sup>2</sup>) de cultivo, estão representados na Figura 10:

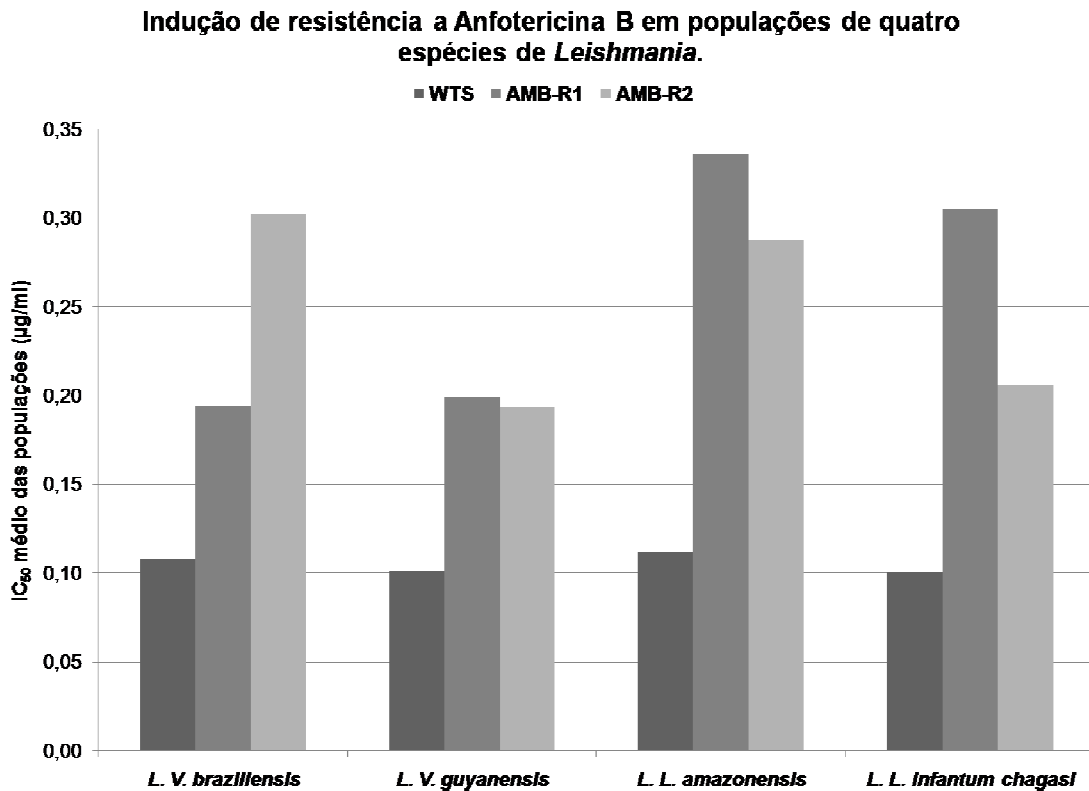


Figura 10: Tolerância à AMB em populações selvagens (WTS) e após seis (AMB-R<sup>1</sup>) e dezoito meses de seleção (AMB-R<sup>2</sup>). A tolerância à droga foi determinada pelos valores de IC<sub>50</sub> médio de cada população. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir de curvas de regressão sigmoideal e representam a média de pelo menos dois ensaios independentes. As populações selvagens utilizadas foram: *L. (V.) braziliensis*, cepa M2904; *L. (V.) guyanensis*, cepa M9945; *L. (L.) amazonensis*, cepa PH8 e *L. (L.) infantum chagasi*, cepa PP75. As populações com resistência induzida *in vitro* são subpopulações das cepas descritas acima.

Conforme pode ser observado na Figura, a seleção de sub-populações resistentes produziu efeitos diferentes de acordo com a espécie de *Leishmania*. De um modo geral, foram obtidas populações duas a três vezes mais resistentes que seus respectivos pares selvagens. Em *L. (V.) braziliensis* foi observado um aumento gradual na tolerância à AMB, de aproximadamente duas vezes nos primeiros seis meses até três vezes ao final de dezoito meses de experimento. *L. (V.) guyanensis* por outro lado apresentou apenas um aumento de duas vezes ainda no primeiro semestre, estabilizando nesse índice. Curiosamente as populações do sub-gênero *Leishmania* tiveram um aumento de cerca de três vezes na tolerância à AMB no primeiro semestre do experimento, seguida de uma redução nesse valor. *L. (L.)*

*infantum chagasi* apresentou a maior redução no coeficiente de resistência, de três para duas vezes.

Vale ressaltar que todas as populações resistentes à AMB apresentaram modificações não apenas nos valores de IC50 mas também no perfil das curvas de tolerância à droga. Essas modificações referem-se principalmente a mudanças no coeficiente de decaimento ( $p$ ) das curvas: enquanto nas populações selvagens o valor de  $p$  variou de -26,5 (*L. (V.) braziliensis*) a -64,2 (*L. (V.) guyanensis*) (Figura 9), nas populações resistentes esse valor variou de -3,4 (*L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*) a -6,5 (*L. (V.) guyanensis* – dados não mostrados). Essa mudança no perfil das curvas pode estar associada a uma maior adaptabilidade das populações ao cultivo na presença de drogas.

## **PARTE 2: ESTUDOS GENÔMICOS E TRANSCRIPTÔMICOS DAS POPULAÇÕES DE *L. (V.) braziliensis* SELVAGENS E RESISTENTES AO SbIII.**

Das quatro espécies de *Leishmania* estudadas nesse trabalho, *L. (V.) braziliensis* foi a primeira selecionada para análise genômica e transcriptômica. Sua escolha se deu principalmente devido a sua relevância epidemiológica, alta tolerância da população resistente comparada a seu par selvagem e a disponibilidade do seu genoma completo publicado. Os estudos moleculares apresentados foram feitos a partir de microarranjos de DNA genômico (*Comparative Genome Hybridization* – CGH) e de cDNA, além de técnicas de bioinformática empregando diferentes programas.

Conforme descrito anteriormente, os oligonucleotídeos empregados nos microarranjos foram desenhados a partir do genoma de *L. (L.) major* e contêm algumas redundâncias, por isso foram agrupados em contigs. Aproximadamente 5% dos contigs correspondem a sequências consenso de 2 a 17 oligonucleotídeos que, embora sejam semelhantes, podem apresentar diferenças significativas nos ensaios com microarranjos de DNA. Por esse motivo, as análises apresentadas a seguir referem-se aos resultados do oligonucleotídeo de maior identidade com a sequência consenso de cada contig.

## 5.6. Microarranjos de DNA:

### 5.6.1. Agrupamento dos oligonucleotídeos selecionados para ensaios de microarranjos de DNA genômico e cDNA:

Conforme descrito em “Materiais e Métodos”, as análises genômicas e transcriptômicas foram realizadas a partir dos resultados de microarranjos de DNA. O microarranjo de DNA utilizado (*Leishmania* v2.2 arrays) é composto por 13.311 oligonucleotídeos, dos quais 12.779 foram identificados no genoma nuclear de *L. (L.) major*. Os demais 532 oligonucleotídeos constituem sequências utilizadas como controle do experimento, bem como sequências de maxi-círculos do kDNA de *L. (L.) major* e sequências específicas de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) tarentolae*. Estas últimas sequências não serão analisadas neste trabalho.

Os oligonucleotídeos selecionados foram sintetizados a partir de sequências de genes ou ORF's presentes no genoma de *L. (L.) major*. É importante observar que genes (ou ORF's) com múltiplas cópias idênticas ou contendo pequenos polimorfismos, podem hibridizar com um mesmo oligonucleotídeo. Também oligonucleotídeos podem diferir em apenas poucos nucleotídeos e assim reconhecerem um mesmo gene ou ORF no genoma. Por esse motivo, o primeiro passo foi mapear cada um desses oligonucleotídeos no genoma de *L. (L.) major* e extrair as sequências que hibridizam com os mesmos. As informações relativas à localização cromossômica foram extraídas dos arquivos contendo os resultados dos microarranjos. Esses arquivos consistem na anotação dos oligonucleotídeos no genoma de *L. (L.) major* (versão 5.2) no formato gff (General Feature Format). Um exemplo dessa anotação e os dados mais importantes extraídos estão mostrados na Figura 11:



Figura 11: Principais dados extraídos dos resultados de microarranjos de DNA.

As sequências nucleotídicas foram extraídas a partir desses arquivos e utilizando *scripts* (desenvolvidos na linguagem de programação PERL – Practical Extraction and Report Language e BASH shell programming) desenvolvidos para facilitar o trabalho. Resumidamente, foi utilizado o seguinte protocolo:

1. Para cada das quatro espécies de *Leishmania* estudadas, foram criados dois arquivos: um contendo anotações de sequências identificadas na fita senso (denominado Microarray\_Oligos\_F) e outro contendo anotações identificadas na fita antisenso (denominado Microarray\_Oligos\_R);
2. Os dados de cada arquivo foram separados em arquivos menores utilizando o *script* “splitgff-4-chr.bsh”. Esse *script* separa os dados de anotação de cada cromossomo, criando arquivos distintos para cada um deles (denominados Microarray\_Oligos\_“cromossomo”\_“fita”);
3. Os arquivos gerados na etapa anterior (no formato gff) foram utilizados para criar arquivos no formato embl. Os *scripts* empregados nessa etapa foram “Microarray-oligos-gff2embl.pl” e “run-gff2embl.bsh”.
4. Os arquivos no formato embl contendo as anotações de sequências das fitas senso (F) e antisenso (R) de cada cromossomo foram reunidas utilizando o *script* “merge-oligos-F-R.bsh”. Assim, ao final dessa etapa foram gerados 36 arquivos, um para cada cromossomo de *L. (L.) major*, contendo as anotações de todos os oligonucleotídeos no formato embl;
5. Os arquivos gerados na etapa anterior e as sequências nucleotídicas de cada um dos cromossomos de *L. (L.) major* foram abertos utilizado o programa de anotação de sequências ARTEMIS (versão 10). Assim, as anotações de cada oligonucleotídeo foi sobreposta às sequências correspondentes no genoma do parasito. Por fim, as sequências dos oligonucleotídeos foram salvas no formato fasta.

Para checar os dados, alguns oligonucleotídeos foram selecionados aleatoriamente e comparados com o genoma de *L. (L.) major* (versão 5.2) utilizando o algoritmo BLASTn. Todas as sequências identificadas por BLAST foram semelhantes aquelas obtidas a partir da anotação feita anteriormente. Ao todo foram identificadas 23.270 sequências que hibridizam com os 12.779 oligonucleotídeos sintetizados a partir do genoma nuclear de *L. (L.) major*. A extensão do alinhamento das sequências reconhecidas por cada oligonucleotídeo variou de 42 a 75 bases. No entanto vale ressaltar que 94,8% dos alinhamentos possuíam exatamente 70 bases (mesmo tamanho dos oligonucleotídeos).

A etapa seguinte foi a clusterização das sequências identificadas e montagem de sequências consenso (contigs). Para isso foram utilizados os programas CAP3 (clusterização), BLASTn (identificação) e Table Maker (construção de tabelas com hiperlinks). Diferentes parâmetros foram testados durante a etapa de clusterização

das sequências com o objetivo de obter um número mínimo de contigs capazes de reconhecer os genes e ORF's com o máximo de especificidade. Os parâmetros selecionados para uso no programa CAP3 foram sobreposição mínima de 60 bases com pelo menos 40% de identidade. Dessa forma foi possível agrupar 12.716 oligonucleotídeos (99,5%) identificados no genoma nuclear de *L. (L.) major* em 12.146 contigs. A extensão de cada contig variou de 60 a 82 bases, sendo que 11.981 contigs (98,6%) têm 70 bases de extensão. Estes resultados estão resumidos nas Tabelas 4 e 5:

Tabela 4: Dados gerais sobre os microarranjos de DNA.

<b>Total de oligonucleotídeos:</b>	<b>13.311</b>
<b>Oligonucleotídeos estudados:</b>	<b>12.779</b>
<b>Sequências identificadas no genoma nuclear de <i>L. (L.) major</i><sup>a</sup>:</b>	<b>23.270</b>
<b>Extensão máxima do alinhamento (bases)<sup>a</sup>:</b>	<b>75</b>
<b>Extensão mínima do alinhamento (bases)<sup>a</sup>:</b>	<b>42</b>
<b>Frequência de alinhamentos com 70 bases de extensão<sup>a</sup>:</b>	<b>94,80%</b>
<b>Total de contigs<sup>b</sup>:</b>	<b>12.146</b>
<b>Oligonucleotídeos agrupados<sup>b</sup>:</b>	<b>12.716</b>
<b>Extensão máxima do contig (bases)<sup>b</sup>:</b>	<b>82</b>
<b>Extensão mínima do contig (bases)<sup>b</sup>:</b>	<b>60</b>
<b>Frequência de contigs com 70 bases de extensão<sup>b</sup>:</b>	<b>98,60%</b>

a → sequências identificadas e alinhadas utilizando o programa BLASTn (comparadas com o genoma de *L. (L.) major*, versão 5.2).

b → agrupamento feito utilizando o programa CAP3 com os parâmetros: 60 bases de extensão mínima e pelo menos 40% de identidade entre as sequências agrupadas.

Tabela 5: Distribuição de oligonucleotídeos e sequências genômicas de *L. (L.) major* agrupadas por contig.

Oligonucleotídeos por contig	Contigs		Sequências por contig	Contigs	
	Nº	%		Nº	%
<b>mais de 10</b>	5	0,04	<b>mais de 100</b>	13	0,11
<b>de 05 a 10</b>	4	0,03	<b>de 05 a 100</b>	232	1,91
<b>de 03 a 04</b>	52	0,43	<b>de 03 a 04</b>	184	1,52
<b>Dois</b>	565	4,65	<b>Duas</b>	733	6,03
<b>Um</b>	11.520	94,85	<b>Uma</b>	10.984	90,43
<b>Total</b>	<b>12.146</b>	<b>100</b>	<b>Total</b>	<b>12.146</b>	<b>100</b>

Conforme pode ser observado na Tabela 5, mais de 90% dos contigs gerados pelo programa CAP3 são formados por um único oligonucleotídeo e reconhecem apenas uma única sequência no genoma de *L. (L.) major*. É importante observar que dos 11.520 contigs gerados a partir de um único oligonucleotídeo, 11.441 são formados por oligonucleotídeos diferentes entre si, os demais 79 são “duplicações” (contigs distintos gerados a partir de sequências reconhecidas por um mesmo oligonucleotídeo). Por outro lado, os 626 contigs gerados a partir de mais de um oligonucleotídeo agrupam um total de 1.275 oligonucleotídeos, reduzindo o volume de informação a ser analisada.

### 5.6.2. Identificação dos contigs:

As sequências nucleotídicas dos 12.146 contigs gerados na etapa anterior foram comparadas com: a) o banco de dados “nr” (proteínas não redundantes) do NCBI; b) as sequências codificantes (CDS) de *L. (L.) major* (versão 5.2), *L. (L.) infantum* (versão 3.0) e *L. (V.) braziliensis* (versão 2.0); c) o genoma completo de cada uma dessas três espécies de *Leishmania*. As análises foram feitas utilizando os algoritmos BLASTn (comparação nucleotídeo-nucleotídeo) e BLASTx (comparação nucleotídeos-aminoácido) com filtro de baixa complexidade desligado e exibição de no máximo 40 alinhamentos por contig. Alinhamentos com “e-value” maior que  $1 \times 10^{-4}$  não foram considerados significativos. Todos os resultados foram montados em tabelas com hiperlinks utilizando o programa Table Maker.

O total de contigs identificados está representado na Figura 12. Todos os 12.146 contigs foram identificados em pelo menos uma espécie de *Leishmania*. Considerando apenas os contigs que reconheceram CDS (Figura 12, diagrama de Venn), foram identificados 7.384 contigs nas três espécies comparadas; 3.480 contigs apenas em *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum chagasi*; e 134 contigs apenas em *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*. Foram identificados ainda 448, 47 e 8 contigs que reconheceram respectivamente CDS apenas nas espécies *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*.



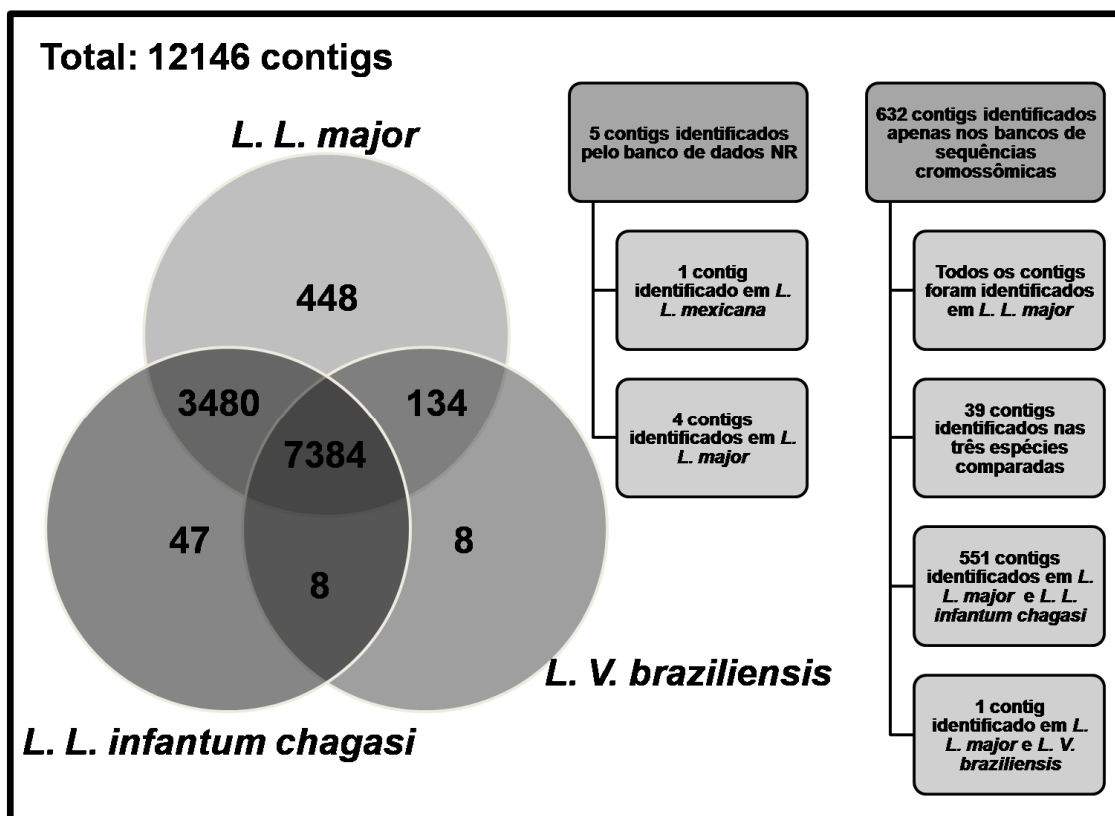


Figura 12: Total de contigs identificados nas diferentes espécies de *Leishmania*. Na Figura, o diagrama de Venn representa a distribuição dos contigs que reconhecem sequências codificantes (CDS) dos parasitos. Ao todo, 637 contigs não foram identificados em CDS de *Leishmania*; destes, 5 foram identificados no banco de dados NR (diagrama ao centro) e 632 foram identificados apenas quando comparados com o genoma completo dos parasitos (diagrama à direita).

É importante observar que 637 contigs não foram identificados quando comparados com as CDS das três espécies. Porém, 5 desses contigs reconhecem proteínas de *Leishmania*, conforme observado após comparação com o banco de dados NR. Um contig reconhece um produto desconhecido de *L. (L.) mexicana* (gi 40557187), enquanto os demais reconhecem proteínas hipotéticas de *L. (L.) major* (gi's 7494031, 5852129, 157870113 e 73536704). Cada um dos 5 contigs foi gerado a partir de um oligonucleotídeo; dessa forma a montagem do contig não interferiu no reconhecimento do mesmo pelas sequências de CDS de *Leishmania*.

Os 632 contigs restantes foram identificados apenas quando comparados com o genoma completo dos parasitos: 39 nas três espécies de *Leishmania*, 551 apenas em *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum chagasi*, 1 contig em *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis* e 41 contigs apenas em *L. (L.) major*. Esses contigs provavelmente

reconhecem ORF's que não codificam proteínas (como pseudogenes) ou sequências codificantes não anotadas no genoma dos parasitos.

Como este trabalho abrange quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, foi necessária a identificação e análise comparativa dos contigs nas três espécies de *Leishmania* com genoma publicado. Os estudos genômicos e transcriptômicos de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (L.) infantum chagasi* foram realizados com base nas sequências de seus respectivos genomas. Por outro lado, os genomas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* ainda não são conhecidos. Nesse caso, a análise dos resultados de microarranjos de DNA foi realizada a partir do estudo da conservação desses genes nos três genomas de *Leishmania* publicado: *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*.

#### **5.7. Estudos de amplificação/deleção genética em populações de *L. (V.) braziliensis* resistentes ao SbIII:**

Através da análise dos contigs descrita anteriormente, foram identificados 7.534 contigs que reconhecem CDS de *L. (V.) braziliensis*. Contigs com diferentes sequências nucleotídicas podem reconhecer uma mesma CDS, porém com afinidades distintas; por isso, as CDS foram comparadas entre si, tendo sido observada a ocorrência de 5.804 sequências codificantes distintas, o que corresponde a aproximadamente 71% do total de CDS anotadas no genoma do parasito (versão 2.0 de 29/07/2008). Deve-se ressaltar porém que esse valor não representa o percentual de genes analisados, uma vez que genes com múltiplas cópias no genoma terão CDS distintas para cada uma. Também é importante considerar que um mesmo contig pode hibridizar com diferentes CDS, sendo estas genes duplicados ou não. Além desses contigs, foram observados outros 346 contigs identificados apenas quando comparados com o genoma completo do parasito. Nesse caso, é necessária a análise da anotação de cada contig individualmente. Fica claro portanto que uma análise detalhada dos microarranjos de DNA é fundamental para uma melhor compreensão dos resultados.

Inicialmente foram analisados os resultados dos Microarranjos de DNA genômico (CGH) com o objetivo de identificar possíveis eventos de amplificação ou deleção genética nas populações de *L. (V.) braziliensis* com resistência induzida *in vitro* ao SbIII. Para isso foram selecionadas as sequências de DNA cuja razão da intensidade de fluorescência entre amostras de populações selvagens e resistentes tenha sido de no mínimo 2 X. Essas sequências foram consideradas amplificadas ou

deletadas (de acordo com a população com maior intensidade de fluorescência) nas populações resistentes. As sequências foram então analisadas conforme descrito a seguir.

#### **5.7.1. Genes identificados e localização cromossômica:**

Inicialmente, alterações genéticas numéricas foram identificadas em 252 das 5.804 CDS identificadas em *L. (V.) braziliensis* (aproximadamente 4,3%). Ao todo foram identificadas 124 CDS amplificadas e 128 CDS deletadas na população do parasito resistente ao SbIII (Lb\_SbR). A razão entre o número de cópias (estimado a partir da intensidade de fluorescência) das CDS amplificadas variou de 2 a 21X; enquanto que nas CDS deletadas, essa razão foi de 2 a 9X. Observou-se ainda que 11 dessas 252 CDS foram identificadas por dois contigs distintos, sendo 1 CDS deletada e 10 CDS amplificadas na população resistente de *L. (V.) braziliensis*.

A Figura 13 mostra uma visão geral dos resultados de microarranjos de DNA genômico. As CDS identificadas são representadas por pontos dispostos no gráfico segundo a razão entre as intensidades de fluorescência das populações resistentes e selvagens de *L. (V.) braziliensis*. Valores positivos indicam amplificação gênica (maior intensidade de fluorescência observada na população resistente), enquanto que valores negativos indicam deleção (maior intensidade de fluorescência observada na população selvagem). Os números na base da Figura indicam a posição de cada cromossomo no gráfico.

Conforme pode ser observado na Figura, a grande maioria das CDS não apresentaram diferenças significativas entre as populações resistentes e selvagens. Foram observadas CDS alteradas em todos os cromossomos de *L. (V.) braziliensis*, especialmente nos cromossomos 20, 23 e 31. A maior parte das CDS codificam proteínas hipotéticas: 80 das 124 CDS amplificadas (aproximadamente 64%) e 81 das 128 CDS deletadas (aproximadamente 63%). As demais CDS codificam proteínas já descritas como associadas com resistência a drogas (como pteridina redutase, proteína de resistência à terbinafina, p-glicoproteína entre outras); síntese do DNA, transcrição e tradução e metabolismo geral da célula. A Tabela 6 relaciona as CDS mais amplificadas ou deletadas na população resistente ao SbIII de *L. (V.) braziliensis*.

**Análise de amplificação/deleção gênica em uma população de *L. V. braziliensis* resistente ao SbIII.**

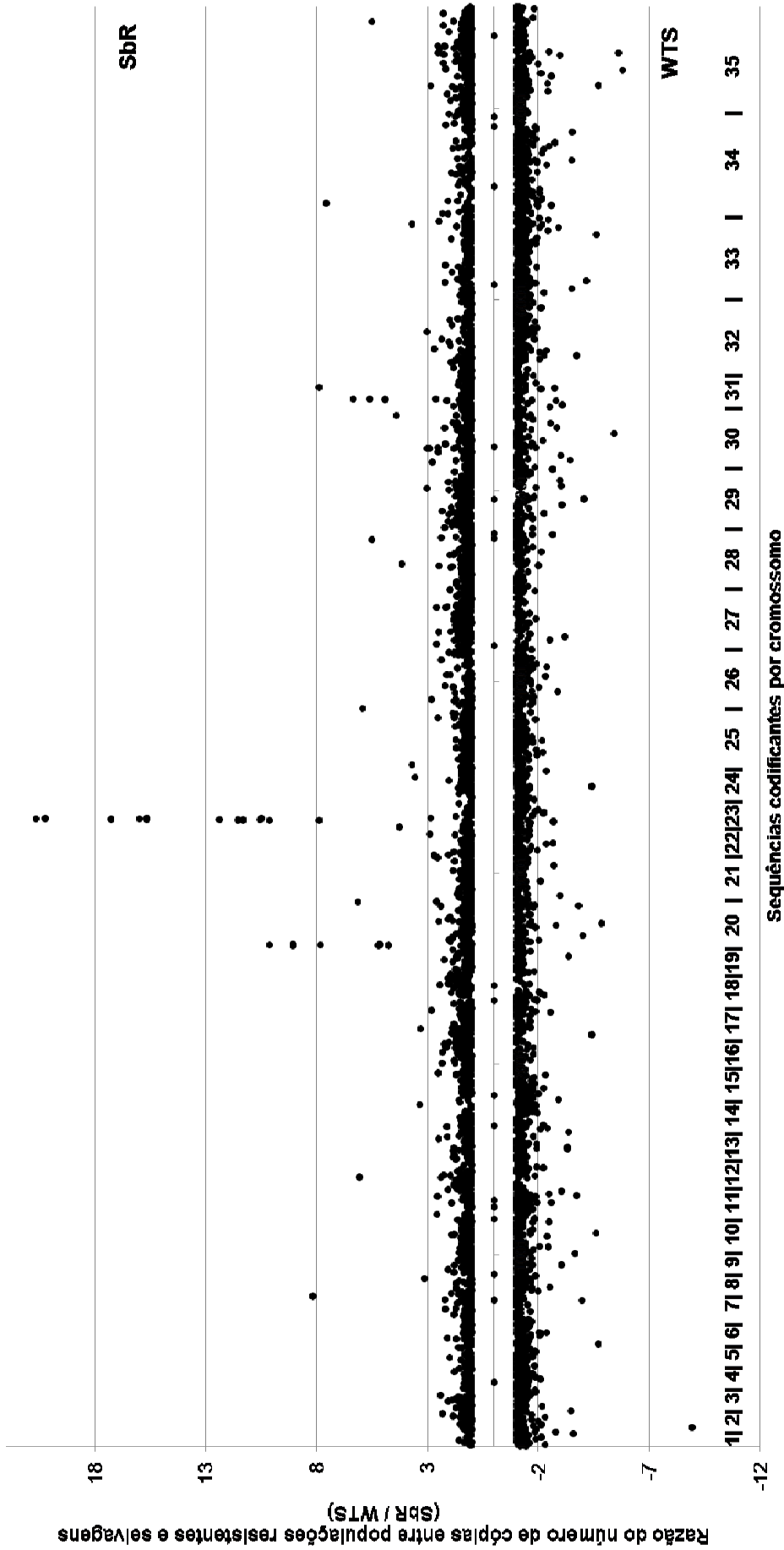


Figura 13: Análise geral dos microarranjos de DNA genômico de populações de *L. V. braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII. No gráfico, as CDS são representadas por pontos segundo a razão entre o número de cópias nas populações resistentes e selvagens. Valores positivos indicam amplificação gênica, enquanto que valores negativos indicam deleção. Os números na base indicam a posição de cada cromossomo no gráfico.

Tabela 6: CDS com maior número de cópias amplificadas ou deletadas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII.

CDS	Descrição	Situação
LbrM23_V2.0320	hypothetical protein, conserved	20,7 X Amplificado
LbrM23_V2.0300	pteridine reductase 1	17,3 X Amplificado
LbrM23_V2.0310	hypothetical protein, conserved	16,0 X Amplificado
LbrM23_V2.0360	hypothetical protein, conserved	15,7 X Amplificado
LbrM23_V2.0290	argininosuccinate synthase, putative	12,4 X Amplificado
LbrM23_V2.0260	hypothetical protein, conserved	11,6 X Amplificado
LbrM23_V2.0270	terbinafine resistance locus protein (yip1)	11,3 X Amplificado
LbrM23_V2.0340	hypothetical protein, conserved	10,5 X Amplificado
LbrM20_V2.1540	ATP-dependent RNA helicase, putative	10,1 X Amplificado
LbrM23_V2.0250	hypothetical protein, conserved	10,1 X Amplificado
LbrM20_V2.1490	hypothetical protein, conserved	9,1 X Amplificado
LbrM20_V2.1560	hypothetical protein, conserved	9,1 X Amplificado
LbrM07_V2.0980	hypothetical protein, conserved	8,2 X Amplificado
LbrM23_V2.0230	multidrug resistance protein, putative	7,9 X Amplificado
LbrM31_V2.1500	p-glycoprotein e	7,9 X Amplificado
LbrM34_V2.1200	hypothetical protein, conserved	7,6 X Amplificado
LbrM31_V2.0640	hypothetical protein, conserved	6,4 X Amplificado
LbrM21_V2.0010	phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase 2	6,1 X Amplificado
LbrM12_V2.0750	surface antigen protein, putative	6,1 X Amplificado
LbrM25_V2.2050	GTP-binding protein, putative	5,9 X Amplificado
LbrM31_V2.0650	hypothetical protein, unknown function	5,6 X Amplificado
LbrM28_V2.2530	hypothetical protein, conserved	5,5 X Amplificado
LbrM35_V2.6190	hypothetical protein, conserved	5,5 X Amplificado
LbrM20_V2.1510	hypothetical protein, conserved	5,2 X Amplificado
LbrM31_V2.0600	cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative	4,9 X Amplificado
LbrM20_V2.1530	hypothetical protein, conserved	4,8 X Amplificado
LbrM30_V2.3400	calmodulin-related protein, putative	4,4 X Amplificado
LbrM22_V2.1500	hypothetical protein, conserved	4,3 X Amplificado
LbrM28_V2.1450	hypothetical protein, conserved	4,2 X Amplificado
LbrM01_V2.0750	hypothetical protein, conserved	8,9 X Deletado
LbrM35_V2.3490	hypothetical protein, conserved	5,8 X Deletado
LbrM35_V2.4190	hypothetical protein, conserved	5,6 X Deletado
LbrM30_V2.2460	tyrosine/dopa decarboxylase, putative	5,4 X Deletado
LbrM20_V2.3000	hypothetical protein, conserved	4,9 X Deletado
LbrM06_V2.0240	5'-3' exonuclease, putative	4,7 X Deletado
LbrM35_V2.2750	hypothetical protein, unknown function	4,7 X Deletado
LbrM33_V2.2980	minichromosome maintenance (MCM) complex subunit, putative	4,6 X Deletado
LbrM10_V2.0360	hypothetical protein, conserved	4,6 X Deletado
LbrM17_V2.1320	hypothetical protein, conserved	4,4 X Deletado
LbrM24_V2.0130	ankyrin/TPR repeat protein	4,4 X Deletado
LbrM33_V2.0540	hypothetical protein, conserved	4,2 X Deletado
LbrM29_V2.1520	hypothetical protein, conserved	4,1 X Deletado
LbrM20_V2.2130	hypothetical protein, conserved	4,0 X Deletado

Após a identificação das 252 CDS alteradas, cada uma das comparações feitas entre os contigs que reconhecem essas sequências e as CDS de *L. (V.) braziliensis* (utilizando BLASTn) foi novamente examinada. Verificou-se que 232 contigs (aproximadamente 92%) reconhece especificamente uma CDS do parasito; 11 dos 124 contigs que reconhecem CDS amplificadas e 9 dos 128 que reconhecem CDS deletadas, hibridizam com mais de uma sequência. A maioria desses contigs (9/20) hibridizam com CDS que correspondem a genes duplicados. Seis contigs hibridizam com CDS que correspondem a genes multicópias (3 a 6 cópias); estes incluem genes de resistência a múltiplas drogas, p-glicoproteína, galactosiltransferases, desaturase de ácidos graxos, receptor de adenilato-ciclase e proteína ribossomal 60S (a única entre essas deletada). Dois contigs hibridizam com CDS de duas proteínas hipotéticas conservadas em *L. (V.) braziliensis* e três contigs hibridizam com CDS que codificam produtos distintos.

Comparando as anotações genômicas das CDS reconhecidas pelos três últimos contigs, observou-se que o primeiro contig (contig11456) hibridiza com uma região repetitiva (TCG)<sub>n</sub> de três CDS distintas (LbrM12\_V2.0900, LbrM27\_V2.1050 e LbrM07\_V2.0290); o segundo (contig4200) hibridiza com uma CDS de proteína hipotética (LbrM16\_V2.1260) e outra de proteína quinase associada a fosfatidilinositol (LbrM32\_V2.1620); o terceiro contig (6594) hibridiza com uma CDS de uma carboxipeptidase (LbrM35\_V2.4270) e outra de proteína hipotética (LbrM33\_V2.0060).

Além da identificação do produto, a localização genômica de cada CDS foi analisada com o objetivo de identificar padrões de genes associados entre si, amplificadas ou deletadas. Inicialmente, todas as CDS alteradas foram mapeadas em relação às CDS inalteradas identificadas nos ensaios de microarranjos de DNA genômico. Desse modo seria possível observar padrões cromossômicos associados aos fenômenos de amplificação ou deleção. A Figura 14 ilustra o resultados dessa análise. Conforme pode ser observado, CDS amplificadas e deletadas estão amplamente distribuídas ao longo de todos os cromossomos de *L. (V.) braziliensis*. Foram observados nos cromossomos 5 e 12 apenas CDS amplificadas, enquanto que nos cromossomos 1, 4 e 13 foram identificados apenas CDS deletadas. No entanto, dado o pequeno número de sequências identificadas nesses cromossomos, não foi realizada uma análise mais aprofundada desse resultado.

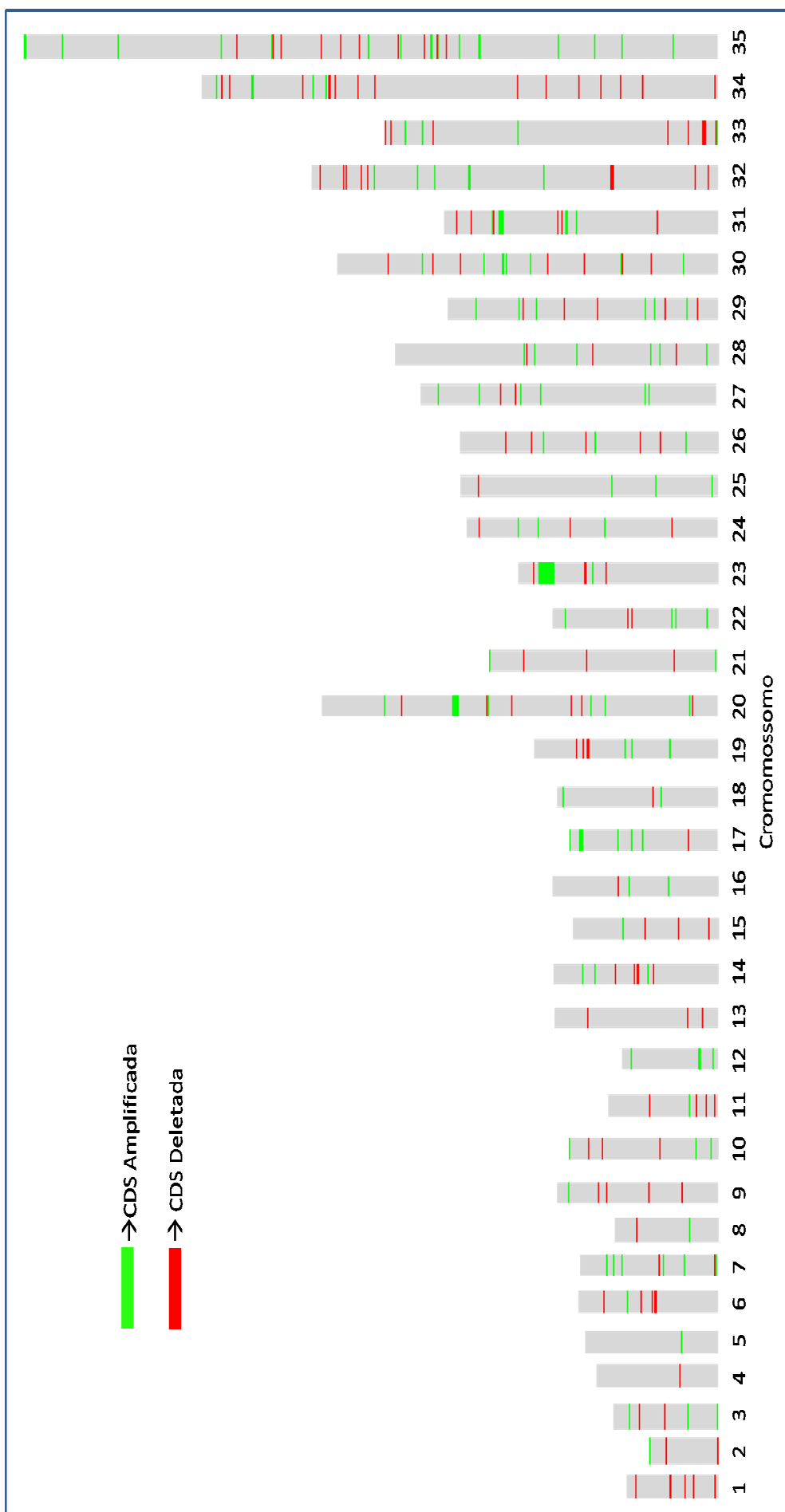


Figura 14: Posição relativa das CDS amplificadas e deletadas de *L. V. braziliensis* resistente ao SbIII, por cromossomo. Na Figura, cada coluna representa um cromossomo do parasito. Traços verdes representam CDS amplificadas enquanto traços vermelhos representam CDS deletadas. CDS que não apresentaram alterações estão representadas por traços cinza enquanto aquelas que não foram identificadas pelos microarranjos de DNA foram ocultadas.

Observando a Figura, é possível notar um número muito pequeno de CDS adjacentes sendo amplificadas ou deletadas. De fato, foram observadas apenas 6 regiões contendo duas CDS adjacentes deletadas, 8 contendo duas ou três CDS amplificadas e uma única região, localizada no cromossomo 23, contendo mais de três CDS amplificadas adjacentes.

A maior região amplificada identificada pelos microarranjos de DNA genômico está representada pela Figura 15. Ela condiz com a região H, descrita originalmente por Beverley e colaboradores (1984) em *L. (L.) major*, possui aproximadamente 44 kb, está localizada no cromossomo 23 e é formada por 15 CDS, que incluem genes associados com resistência a drogas amplamente descritas na literatura (como transportadores ABC, proteína de resistência à terbinafina e pteridina redutase1), bem como 8 proteínas hipotéticas. Das 15 CDS que compõe a região, 4 (representados na Figura 15 por retângulos escuros) não foram identificadas pelos microarranjos, porém as demais CDS estavam em média 12X amplificadas na população resistente ao SbIII. Também é importante observar que, diferentemente de *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum chagasi*, em *L. (V.) braziliensis* a CDS que codifica a argininosuccinato sintase (LbrM23\_V2.0290) é um pseudogene e portanto não funcional.

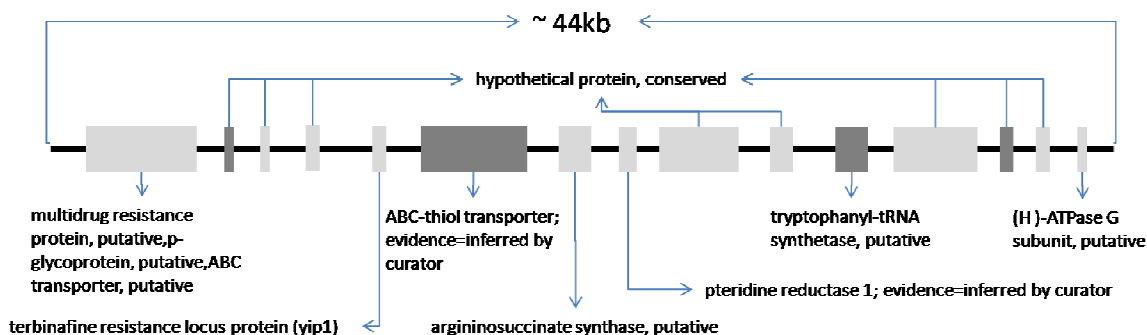


Figura 15: Representação esquemática da região amplificada do cromossomo 23 de *L. (V.) braziliensis*. A Figura representa uma região de aproximadamente 44 quilobases; as CDS são representadas por retângulos proporcionais à extensão da CDS. Retângulos escuros representam CDS não identificadas nos ensaios de microarranjo de DNA, enquanto retângulos claros representam CDS identificadas e amplificadas na população resistente do parasito.

Além da região amplificada de 44 kb, foram analisadas outras três regiões: uma de aproximadamente 18 kb localizada no cromossomo 17; outra de



aproximadamente 32 kb localizada no cromossomo 20 e uma terceira região, de aproximadamente 17 kb localizada no cromossomo 31 (Figura 16).

A localização genômica da região amplificada do cromossomo 17 é: Lbr.chr17: 34.518 - 53.013 (-). Na anotação mais recente de *L. (V.) braziliensis* (TritrypDB-2.0) essa região de aproximadamente 18 kb é formada por 4 CDS que codificam quatro cópias de um mesmo produto. Três dessas cópias (LbrM17\_V2.0100, LbrM17\_V2.0120 e LbrM17\_V2.0130) foram identificadas nos ensaios de microarranjos de DNA genômico, cerca de 2X amplificadas. A quarta CDS (LbrM17\_V2.0110) embora codificasse o mesmo produto, não possuía região complementar aos contigs do microarranjo e por isso não foi identificada. Observando a anotação da região com o programa ARTEMIS v.11, verificou-se a presença de um “gap” entre as CDS LbrM17\_V2.0100 e LbrM17\_V2.0110, sendo que esta última está incompleta, pois não apresenta o códon de terminação. As duas CDS foram então comparadas utilizando o programa BLASTn, que mostrou uma similaridade de 1151 bases com 98% de identidade entre a extremidade 5’ da primeira CDS e a extremidade 3’ da segunda. A Figura 17 apresenta essa anotação visualizada pelo programa ARTEMIS; nela pode-se observar as duas CDS (em amarelo), a região homóloga (em azul) e o “gap” entre as duas sequências. É possível que tenha ocorrido um erro de sequenciamento ou anotação nessa região, e que as CDS LbrM17\_V2.0100 e LbrM17\_V2.0110 constituam um único gene funcional ou um pseudogene.

A região amplificada do cromossomo 20 (Lbr.chr20: 614.825 - 646.380 (-)) possui aproximadamente 32 kb de extensão e é constituída por 8 CDS, das quais 6 codificam proteínas hipotéticas. Três CDS não foram identificadas pelos microarranjos de DNA, uma CDS codificante da piroglutamil-peptidase I (LbrM20\_V2.1500) e duas codificantes de proteínas hipotéticas. É interessante observar que as cinco CDS identificadas nessa região estão em média 8X amplificadas, sendo que quatro delas codificam proteínas hipotéticas. Apenas uma CDS tem função predita (LbrM20\_V2.1540 – RNA helicase dependente de ATP). É possível que essas proteínas hipotéticas confirmem vantagens seletivas às populações resistentes ao SbIII de *L. (V.) braziliensis*.

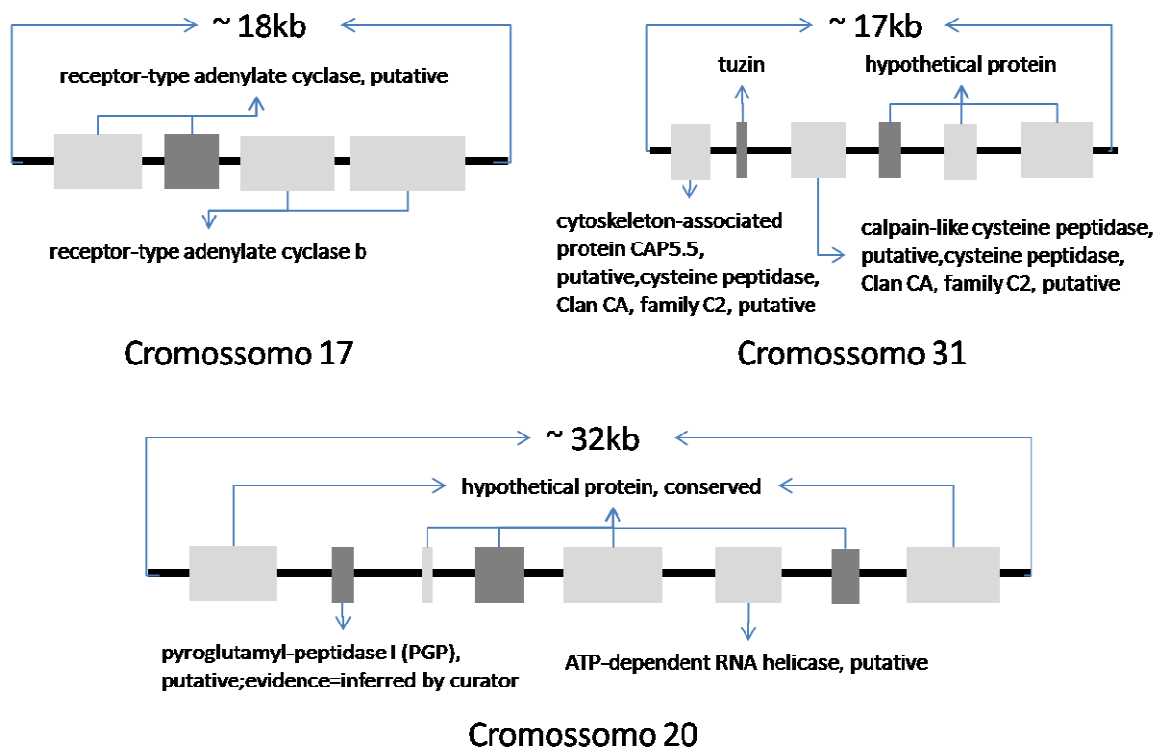


Figura 16: Representação esquemática da região amplificada dos cromossomos 17, 20 e 31 de *L. (V.) braziliensis*. A extensão da região amplificada e os produtos de cada CDS estão indicados. CDS são representadas por retângulos proporcionais a sua extensão. Retângulos escuros representam CDS não identificadas nos ensaios de microarranjo de DNA, enquanto retângulos claros representam CDS identificadas e amplificadas na população resistente do parasito.

A última região analisada tem aproximadamente 17 kb e está localizada no cromossomo 31 (Lbr.chr31: 201.419 - 218.406 (-)). Essa região inclui 6 CDS, sendo três delas codificantes de proteínas hipotéticas, duas prováveis codificantes de cisteino-peptidases e uma CDS codificante da proteína tuzina (LbrM31\_V2.0610). Esta última, porém, não constitui um gene funcional uma vez que apresenta vários códons de terminação ao longo de sua sequência. Duas CDS não foram identificadas nos microarranjos de DNA (uma proteína hipotética e tuzina), as demais estavam em média 5X amplificadas na população resistente de *L. (V.) braziliensis*.

Outro dado importante é que, de acordo com os resultados dos microarranjos de DNA genômico, as quatro regiões descritas neste trabalho estavam amplificadas exclusivamente na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, não tendo sido observado correlação entre a amplificação destas CDS e o fenótipo

de resistência ao SbIII nas demais espécies de *Leishmania* estudadas (*L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*).

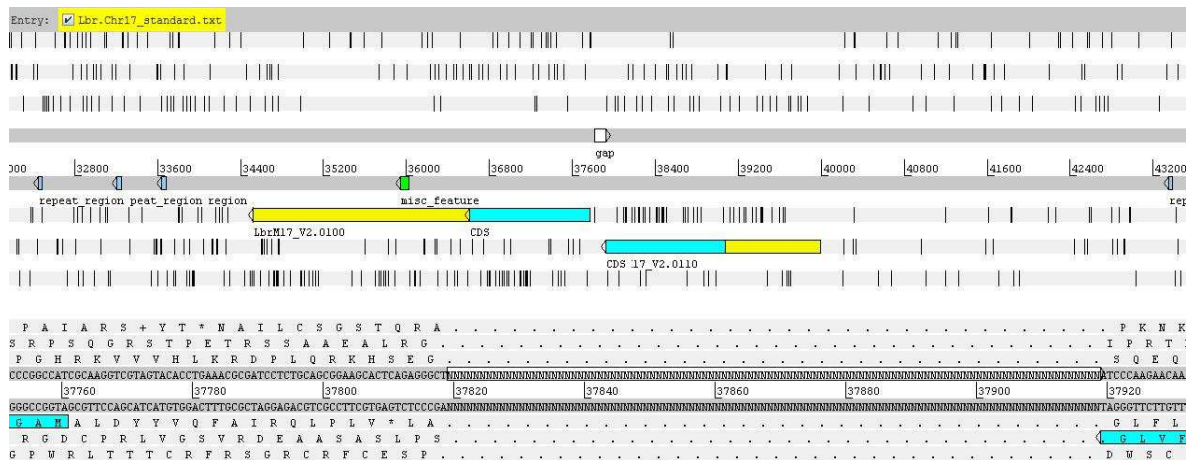


Figura 17: Anotação das CDS LbrM17\_V2.0100 e LbrM17\_V2.0110 visualizada utilizando o programa ARTEMIS. Na Figura, as CDS estão representadas por retângulos amarelos e azuis. As regiões em azul representam a área de similaridade entre as duas CDS (ver texto). O retângulo branco representa a lacuna (gap) na montagem do cromossomo, localizada entre as duas CDS.

### 5.7.2. Busca por padrões conservados de amplificação ou deleção gênica:

Para testar a hipótese de que *L. (V.) braziliensis* amplifica CDS ao acaso como resposta à pressão provocada por drogas foi realizada uma busca por padrões moleculares associados às CDS amplificadas ou deletadas. Trabalhou-se com três possibilidades: 1) a distribuição das CDS ocorre completamente ao acaso e não existem padrões moleculares entre as CDS estudadas; 2) a distribuição das CDS ocorre parcialmente ao acaso e nesse caso macroregiões amplificadas (aquelas contendo várias CDS) teriam padrões conservados entre si; 3) existem regiões genômicas onde ocorre preferencialmente a amplificação ou deleção das CDS.

O teste consistiu inicialmente de comparações entre as regiões flangeadoras (5' e 3') de cada CDS amplificadas ou deletadas. Convencionou-se analisar uma extensão de 1.000 bases a partir de cada extremidade da CDS; essas sequências foram selecionadas e comparadas utilizando o programa BLASTn. As comparações feitas seguiram o seguinte protocolo:

a) Sequências flanqueadoras das 4 regiões amplificadas mais extensas:

I – 1.000nt (5' e 3') – Vs – 1.000nt (5' e 3');

II – 1.000nt (5' e 3') – Vs – genoma completo.

b) Sequências flanqueadoras de todas as CDS alteradas:

I – 1.000nt (5' e 3') CDS amp. – Vs – 1.000nt (5' e 3') CDS amp.;

II – 1.000nt (5' e 3') CDS del. – Vs – 1.000nt (5' e 3') CDS del.;

III – 1.000nt (5' e 3') CDS amp. – Vs – 1.000nt (5' e 3') CDS del.

c) Sequências identificadas no item b):

I – todas as sequências identificadas – Vs – genoma completo;

Durante a análise, a seleção das sequências conservadas mais interessantes foi feita por inspeção visual de todos os resultados, considerando diferentes parâmetros, como o tamanho da sequência, complexidade, número de alinhamentos significativos e número de sequências alinhadas. As buscas por padrões conservados tanto entre as CDS analisadas individualmente quanto entre regiões contendo várias CDS amplificadas retornaram apenas sequências de baixa complexidade, especialmente de trechos com repetições contendo polipirimidinas, (TC)<sub>n</sub>. Repetições desse tipo foram comparadas com o genoma completo de *L. (V.) braziliensis*, e apresentaram ampla distribuição em todo o genoma, não sendo encontrada uma correlação entre tais repetições e as CDS alteradas. Esse resultado foi esperado, uma vez que trilhas de polipirimidinas são comuns em *Leishmania* e estão associadas ao mecanismo de “Splicing” do RNA.

Uma segunda estratégia foi a busca por motivos empregando o conjunto de programas MEME/MAST/WEBLOGO v.4.3.0. Nesse caso, foram selecionadas CDS no mínimo 4X amplificadas ou deletadas na população resistentes de *L. (V.) braziliensis*, comparada à população selvagem. As sequências flanqueadoras de CDS amplificadas e deletadas, bem como sequências 5' e 3' foram analisadas separadamente. Os parâmetros selecionados no MEME foram: número qualquer de ocorrências de cada motivo por sequência (-mod tcm), número máximo de motivo identificados (nmotifs) = 10, número mínimo de sítios (-minsites) = 10, comprimento mínimo (-minw) = 6. Motivos com um e-value menor que  $10^{-8}$  foram considerados significativos.

Os motivos identificados pelo MEME são idênticos tanto entre CDS amplificadas e deletadas quanto entre regiões 5' e 3' e correspondem basicamente a sequências repetitivas de dinucleotídeos, como as sequências (TC)<sub>n</sub> (também identificadas por BLAST), (CA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub> e (GT)<sub>n</sub>. A Figura 18 é uma representação gráfica dos alinhamentos do motivo mais frequente em todas as sequências (logo). Estas repetições estão amplamente distribuídas no genoma do parasito e não apresentam correlação com as CDS amplificadas ou deletadas. Desse modo, os resultados da busca por padrões conservados em regiões amplificadas ou deletadas feito neste trabalho não retornou nenhum motivo específico, sugerindo que a amplificação ou deleção de genes como resposta à pressão provocada por drogas em *L. (V.) braziliensis* ocorre ao acaso, sendo selecionadas aquelas modificações vantajosas (ou neutras) para a população.

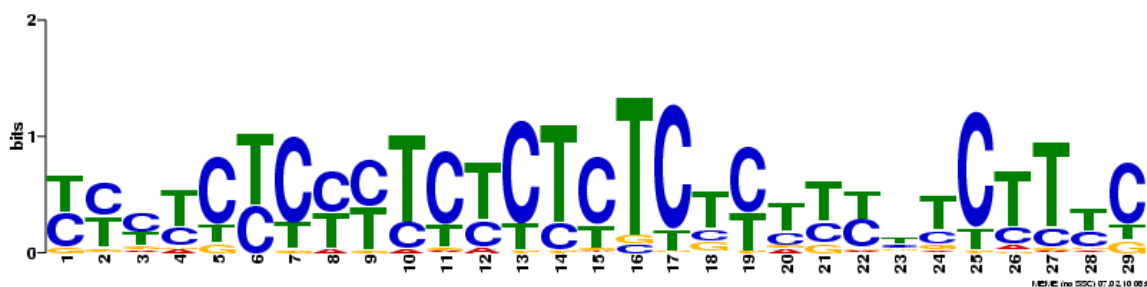


Figura 18: Representação gráfica dos alinhamentos das sequências do motivo mais frequente nas regiões que flanqueiam CDS alteradas em *L. (V.) braziliensis*. Na Figura, o tamanho do caractere representa o grau de conservação de cada nucleotídeo.

### 5.7.3. Comparações com outras espécies de *Leishmania*:

Conforme descrito anteriormente, neste trabalho foram produzidas populações resistentes ao SbIII de quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Todas as populações foram submetidas a ensaios de microarranjos de DNA genômico e de cDNA. Os resultados de microarranjos de DNA genômico das 252 CDS alteradas em *L. (V.) braziliensis* foram comparados com as demais espécies estudadas. O objetivo foi identificar eventos de amplificação e deleção genética associados à resistência a drogas; discriminando-os de eventos que possivelmente ocorreram ao acaso. O pressuposto básico dessa análise é o de que, CDS amplificadas ou deletadas em diferentes populações submetidas a uma mesma pressão seletiva, têm uma maior probabilidade de estarem associadas ao fenótipo

comum. Por outro lado, eventos de amplificação e deleção de uma mesma CDS em populações distintas, têm uma maior probabilidade de terem ocorrido ao acaso.

Os resultados dessas comparações estão representados na Figura 19. Analisando as sequências como um todo, das 5.804 CDS identificadas pelos microarranjos de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*, 252 apresentaram algum tipo de alteração numérica nessa espécie. Destas, 83 CDS apresentaram alterações numéricas distintas (amplificação e deleção) quando comparadas com outras populações de *Leishmania* submetidas à mesma pressão seletiva; 157 CDS possuíam alterações numéricas apenas em *L. (V.) braziliensis* e finalmente 12 CDS apresentaram o mesmo tipo de alteração em mais de uma espécie.

A maioria das 128 CDS deletadas identificadas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII foram amplificadas em populações resistentes de outras espécies de *Leishmania* (65 em *L. (V.) guyanensis* e 01 em *L. (L.) amazonensis*). Foram observadas ainda 54 CDS deletadas apenas em *L. (V.) braziliensis* e apenas 08 CDS deletadas em mais de uma espécie. Destas, 04 CDS foram deletadas em *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e outras 04 CDS foram deletadas em *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Nenhuma das 128 CDS deletadas em *L. (V.) braziliensis* foi amplificada ou deletada em *L. (L.) infantum chagasi* e apenas 01 CDS (LbrM35\_V2.3860 – proteína hipotética) não foi analisada em *L. (V.) guyanensis*.

Um perfil um pouco diferente foi observado nas CDS amplificadas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII. A grande maioria das CDS identificadas foram amplificadas apenas nessa população (103 de 124 CDS). Foram identificadas 15 CDS ausentes na população resistente de *L. (V.) guyanensis* e 01 na população resistente de *L. (L.) amazonensis*. Uma CDS (LbrM28\_V2.1450 – proteína hipotética conservada) foi amplificada nas populações resistentes ao SbIII de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* e deletada na população resistente de *L. (V.) guyanensis*. Apenas 04 CDS foram amplificadas em *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Nenhuma CDS foi amplificada em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Uma CDS (LbrM21\_V2.0010 – fosfoglicano beta 1,3 galactosiltransferase 2) não foi analisada em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. As CDS que apresentaram o mesmo perfil de amplificação ou deleção em diferentes espécies de *Leishmania* estão apresentadas na Tabela 7.

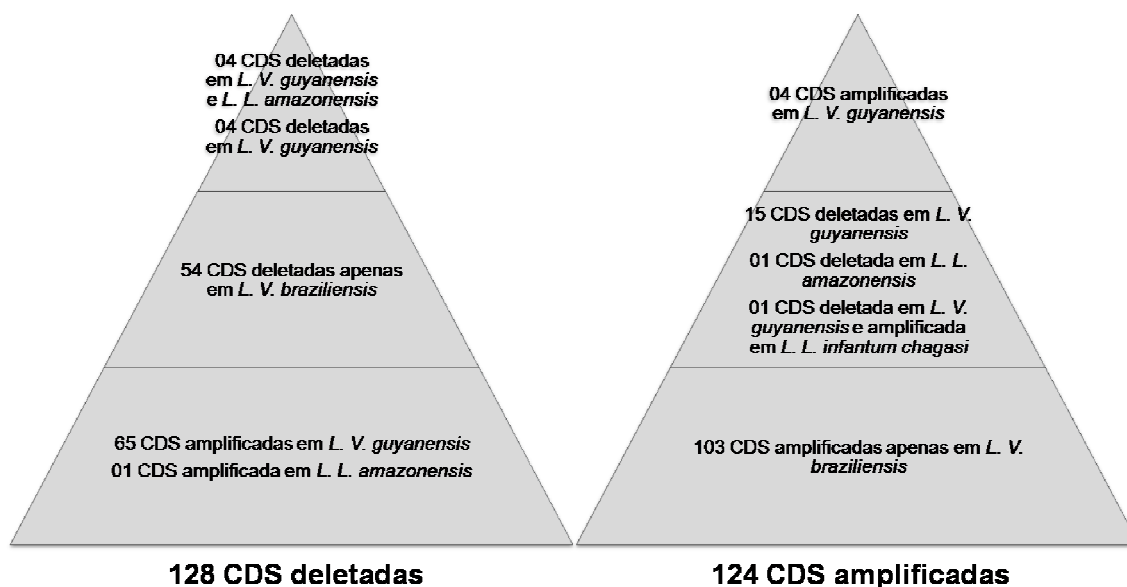


Figura 19: Distribuição das CDS alteradas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, comparadas a outras três espécies de *Leishmania*. À esquerda estão representadas as 128 CDS deletadas e à direita as 124 CDS amplificadas. Todas as comparações foram baseadas nos ensaios de microarranjos de DNA genômico.

Tabela 7: CDS identificadas em *L. (V.) braziliensis* amplificadas ou deletadas em mais de uma espécie de *Leishmania*.

CDS	Descrição	Situação <sup>a</sup>			
		<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>
LbrM12_V2.0750	surface antigen protein, putative	6,1 X Amp	2,0 X Amp	SD	SD
LbrM23_V2.0370	(H+)-ATPase G subunit, putative	2,8 X Amp	2,3 X Amp	SD	SD
LbrM32_V2.1610	hypothetical protein, conserved	3,0 X Amp	2,3 X Amp	SD	SD
LbrM12_V2.0740	hypothetical protein, conserved	2,4 X Amp	3,3 X Amp	SD	SD
LbrM06_V2.0240	5'-3' exonuclease, putative	4,7 X Del	41,9 X Del	10,1 X Del	SD
LbrM34_V2.3250	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative	2,4 X Del	9,2 X Del	4,1 X Del	SD
LbrM21_V2.0870	small GTPase, putative	2,1 X Del	5,5 X Del	4,0 X Del	SD
LbrM01_V2.0070	hypothetical protein	2,3 X Del	2,0 X Del	2,9 X Del	SD
LbrM34_V2.3950	hypothetical protein, conserved	2,2 X Del	3,6 X Del	SD	SD
LbrM35_V2.2820	folylpolyglutamate synthetase	2,4 X Del	2,3 X Del	SD	SD
LbrM06_V2.0780	hypothetical protein	2,0 X Del	2,2 X Del	SD	SD
LbrM28_V2.1330	hypothetical protein	2,0 X Del	2,0 X Del	SD	SD

<sup>a</sup> → resultados dos microarranjos de DNA genômico: Amp – amplificado; Del – deletado; SD – sem diferença significativa.

### **5.8. Estudos transcriptômicos de expressão genética diferencial em populações de *L. (V.) braziliensis* resistentes ao SbIII:**

Conforme descrito anteriormente, amostras de DNA genômico e de cDNA das populações de *Leishmania* selvagens e resistentes ao SbIII foram empregadas em ensaios com microarranjos de DNA. Ambas as amostras foram empregadas visando avaliar os efeitos genéticos do cultivo dos parasitos na presença de SbIII e correlacioná-los com o fenótipo de resistência à droga. Microarranjos contendo amostras de DNA genômico permitiram uma análise de alterações numéricas (amplificação e deleção) ocorridas na molécula de DNA do parasito. Por outro lado, a análise de amostras de cDNA permite avaliar a expressão dos genes, amplificados ou não, a partir de seus transcritos de RNA.

Uma análise geral dos microarranjos de cDNA está apresentada na Tabela 8. Dos 7.534 contigs que reconhecem sequências de *L. (V.) braziliensis*, 5.543 (73,6%) foram analisados e reconhecem transcritos distintos do parasito. Dos contigs restantes, 1.080 (14,3%) reconhecem transcritos repetidos (contigs diferentes que reconhecem um mesmo transcrito) e 911 contigs (cerca de 12,1%) representam contigs que não foram analisados (incluindo contigs duplicados) ou que apresentaram resultados incoerentes (ver Tabela 9 e explicação a seguir).

Inicialmente foram considerados com diferença significativa de expressão os transcritos cuja razão entre o nível de expressão das populações selvagens e resistentes ao SbIII fosse de no mínimo 2X. Utilizando esse ponto de corte obteve-se um total de 6.510 contigs sem diferença de expressão significativa, o que corresponde a 86,4% do total de contigs dos microarranjos. Desses, 4.586 contigs (60,9% do total de contigs) reconhecem transcritos distintos; 1.039 (13,8%) são contigs que reconhecem um transcrito já identificado (transcritos repetidos) e 885 contigs (11,7%) não foram analisados e, portanto não se pode afirmar se houve ou não diferença de expressão. Foram identificados ainda 1.024 contigs (13,6% do total de contigs) com diferenças de expressão. Destes, 957 (12,7%) correspondem a transcritos distintos; 41 (cerca de 0,5%) correspondem a transcritos repetidos e 26 (cerca de 0,4%) representam contigs distintos que, além de reconhecerem um mesmo transcrito, um deles indica aumento enquanto o outro indica diminuição no nível de expressão do transcrito na população resistente ao SbIII. Os transcritos reconhecidos por esses contigs com resultados incoerentes estão relacionados na Tabela 9.



Tabela 8: Análise geral dos microarranjos de cDNA.

	Contigs identificados		
	Sem diferença de expressão	Com diferença de expressão	Total
Transcritos distintos	4.586	957	5.543
Duplicações	1.039	41	1.080
Não analisados ou resultados divergentes (incluindo duplicações)	885	26	911
<b>Total</b>	<b>6.510</b>	<b>1.024</b>	<b>7.534</b>

Tabela 9: Transcritos identificados por microarranjos de cDNA com aumento de expressão nas duas populações de *L. (V.) braziliensis*.

CDS	Descrição	Aumento no nível de expressão	
LbrM03_V2.0230	hypothetical protein, conserved	2,5 X WTS	2,3 X SbR
LbrM04_V2.0330	hypothetical protein, conserved	2,4 X WTS	2,1 X SbR
LbrM06_V2.0320	oligopeptidase B-like protein	2,7 X WTS	2,0 X SbR
LbrM14_V2.0770	hypothetical protein, conserved	2,1 X WTS	2,1 X SbR
LbrM17_V2.0810	OSM3-like kinesin, putative	2,3 X WTS	2,0 X SbR
LbrM19_V2.0490	mitogen activated protein kinase, putative	2,7 X WTS	2,4 X SbR
LbrM20_V2.2130	hypothetical protein, conserved	3,5 X WTS	4,7 X SbR
LbrM24_V2.1800	hypothetical protein, conserved	4,2 X WTS	3,4 X SbR
LbrM25_V2.1640	elongation factor 2-like protein	3,8 X WTS	2,3 X SbR
LbrM26_V2.2610	hypothetical protein, unknown function	2,0 X WTS	4,3 X SbR
LbrM29_V2.0630	ABC transporter, putative	2,3 X WTS	2,2 X SbR
LbrM34_V2.0270	hypothetical protein, conserved	2,0 X WTS	9,6 X SbR
LbrM34_V2.2450	hypothetical protein, conserved	2,1 X WTS	2,2 X SbR

Desse modo, ao comparar os transcritos reconhecidos pelos contigs entre si, foram observadas quatro situações distintas: 1) os transcritos foram reconhecidos por um único contig e possuem um valor de expressão diferencial associados a eles. 2) os transcritos foram reconhecidos por mais de um contig, com aumento ou não de expressão, em uma mesma população; nesse caso o contig que apresentou o menor nível de expressão diferencial foi retirado da análise. 3) os transcritos foram reconhecidos por mais de um contig, sendo que um deles indica aumento de expressão na população resistente ao SbIII e o outro indica diminuição na expressão do mesmo transcrito nessa mesma população; nesse caso ambos os resultados foram retirados da análise. 4) os transcritos não foram analisados e nesse caso foram retirados da análise independentemente de haver duplicações.

É importante ressaltar que a análise feita a seguir refere-se aos 5.543 transcritos distintos, ou seja, todos os transcritos identificados, exceto aqueles retirados nas situações 2, 3 e 4 descritas acima.

### 5.8.1. Transcritos identificados:

Conforme visto no item anterior, dos 5.543 transcritos identificados e analisados em *L. (V.) braziliensis*, 957 transcritos (aproximadamente 17,3%) apresentaram o nível de expressão aumentado ou diminuído pelo menos duas vezes na população do parasito resistente ao SbIII. Ao todo foram identificados 397 transcritos menos expressos e 560 transcritos com expressão aumentada na população resistente do parasito. Foram identificados ainda 41 transcritos diferencialmente expressos e reconhecidos por mais de um contig; destes, 12 estão menos expressos e 29 mais expressos. A Figura 20 mostra uma visão geral dos resultados de microarranjos de cDNA. As CDS correspondentes a cada transcrito são representadas por pontos dispostos no gráfico segundo a razão entre as intensidades de fluorescência das populações resistentes e selvagens de *L. (V.) braziliensis*. Valores positivos indicam aumento na expressão do transcrito na população resistente ao SbIII, enquanto que valores negativos indicam diminuição no nível de expressão dos mesmos.

Comparando os níveis de expressão de cada transcrito diferencialmente expresso entre as duas populações de *L. (V.) braziliensis* (selvagem e resistente ao SbIII), verificou-se que estes variaram de 2 a 13 vezes entre os transcritos menos expressos e de 2 a 17 vezes nos transcritos mais expressos na população resistente. A Figura 21 representa a distribuição destes transcritos segundo o nível de expressão. Conforme pode ser observado, o nível de expressão da grande maioria dos transcritos diferencialmente expressos (81% dos menos expressos e 67% dos mais expressos) foi de até 2,99 X. Transcritos 3 a 9,99 vezes mais expressos foram observados em 19% e 32% das populações selvagens e resistentes ao SbIII, respectivamente. Seis transcritos tiveram sua expressão aumentada em mais de 10 X na população resistente ao SbIII, o que representa cerca de 1% dos transcritos mais expressos nessa população. Por outro lado, apenas um transcrito (LbrM23\_V2.0640 – Proteína hipotética) foi identificado com uma redução de pelo menos 10 X nessa mesma população.

### Análise de expressão gênica diferencial em populações de *L. V. braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII.

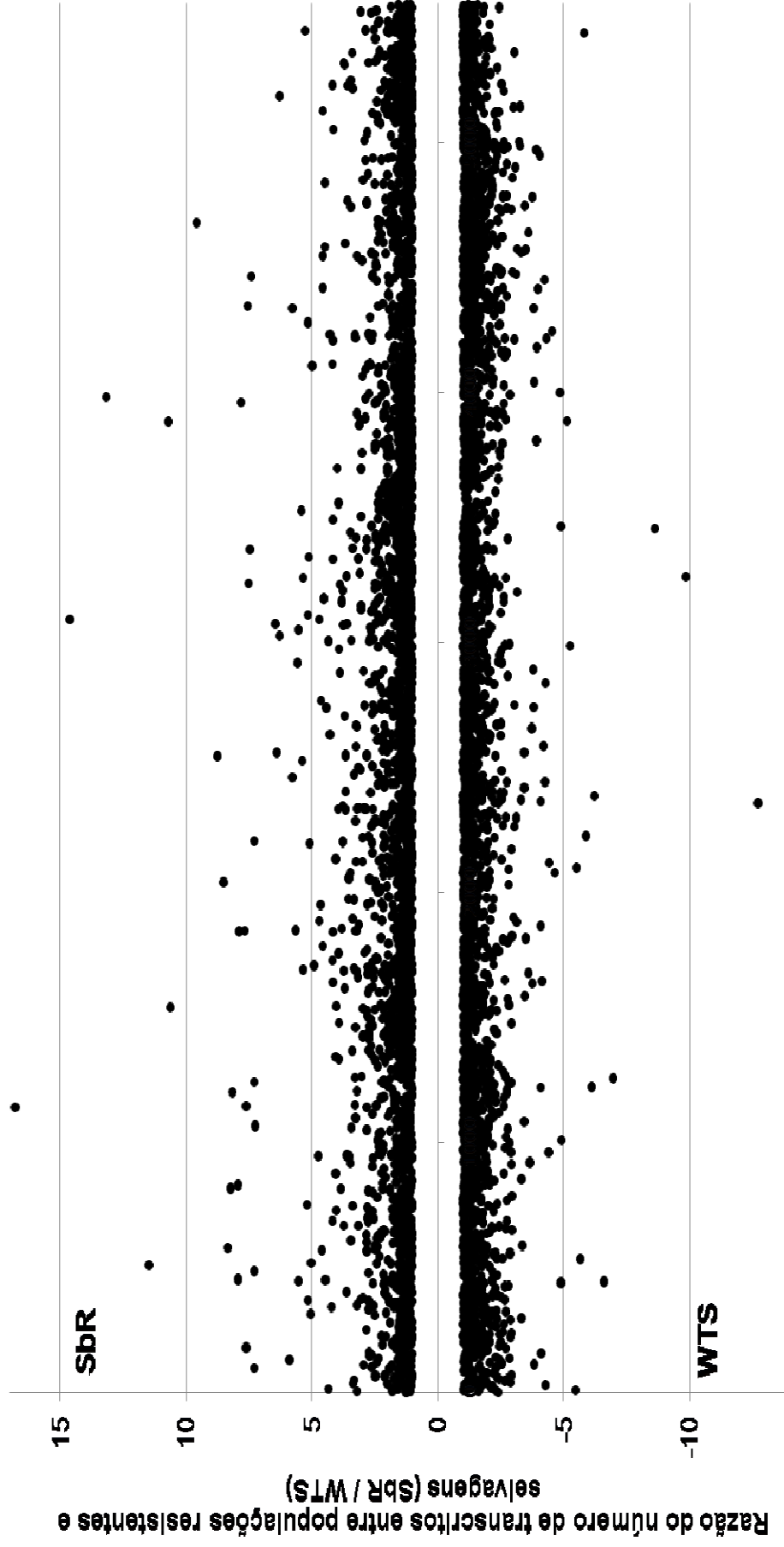


Figura 20: Análise geral dos microarranjos de cDNA de populações de *L. V. braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII. No gráfico, as CDS correspondentes a cada transcrito são representadas por pontos segundo a razão entre o nível de expressão nas populações resistentes e selvagens. Valores positivos indicam aumento de expressão, enquanto que valores negativos indicam diminuição.

**Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos em *L. V. braziliensis*, segundo o nível de expressão**

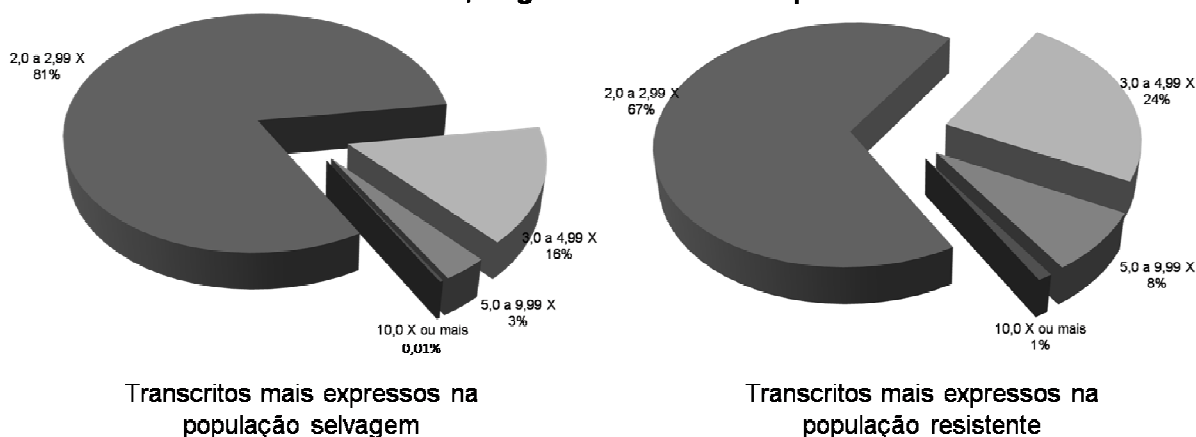


Figura 21: Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos identificados em *L. (V.) braziliensis*, segundo o nível de expressão. Na Figura, o percentual de transcritos identificados mais expressos na população selvagem, segundo o nível de expressão, está apresentado no gráfico à esquerda. O percentual de transcritos identificados mais expressos na população resistente está apresentado no gráfico à direita. O nível de expressão foi determinado pela razão entre a expressão dos transcritos nas populações selvagens e resistentes ao SbIII.

Também foi avaliada a distribuição dos transcritos segundo o cromossomo onde se localizam suas respectivas CDS. Para isso os 35 cromossomos de *L. (V.) braziliensis* foram agrupados em 5 categorias com aproximadamente o mesmo número de CDS anotadas (com base nas CDS anotadas de *L. (V.) braziliensis*, TriTrypDB – V2.0). Em seguida o total de transcritos menos expressos (397), mais expressos (560) e sem diferenças significativas de expressão (4.586) na população resistente ao SbIII, foram distribuídos nas cinco categorias. Foi observada uma discreta diferença na distribuição dos transcritos diferencialmente expressos: a primeira categoria (cromossomos 1 a 14) agrupou o maior percentual de transcritos cuja expressão foi reduzida na população resistente ao SbIII (26%). A terceira categoria (cromossomos 22 a 28) agrupou o maior percentual de transcritos com expressão aumentada na população resistente ao SbIII (28%). A quinta categoria (cromossomos 33 a 35) agrupou o menor percentual de transcritos com aumento na expressão (14%). Os demais resultados mantiveram-se aproximadamente iguais ao percentual de CDS analisadas, com uma variação de no máximo 3%. Esses resultados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10: Distribuição dos transcritos analisados por cromossomos de *L. (V.) braziliensis*.

Cromossomos	CDS		Transcritos		
	Anotadas	Analisadas	Menos expressos	Mais expressos	Sem diferença
<b>1 a 14</b>	1762 – 21%	1183 – 21%	104 – 26%	120 – 21%	959 – 21%
<b>15 a 21</b>	1698 – 20%	1009 – 18%	70 – 18%	115 – 21%	824 – 18%
<b>22 a 28</b>	1746 – 21%	1241 – 22%	77 – 20%	159 – 28%	1005 – 22%
<b>29 a 32</b>	1471 – 18%	974 – 18%	65 – 16%	88 – 16%	821 – 18%
<b>33 a 35</b>	1633 – 20%	1136 – 21%	81 – 20%	78 – 14%	977 – 21%
<b>Total</b>	<b>8310 – 100%</b>	<b>5543 – 100%</b>	<b>397 – 100%</b>	<b>560 – 100%</b>	<b>4586 – 100%</b>

Por último, foram identificados os transcritos com maior e com menor nível de expressão na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, comparado com a população selvagem. Foram selecionados então os transcritos pelo menos 5,0 X mais expressos em uma das populações consideradas (selvagem ou resistente ao SbIII). Ao todo foram identificados 65 transcritos, 51 mais expressos e 14 menos expressos na população resistente ao SbIII. A maior parte dos transcritos codifica proteínas hipotéticas: 31 dos 51 transcritos mais expressos (aproximadamente 61%) e 11 dos 14 transcritos menos expressos (aproximadamente 79%). Os demais transcritos codificam proteínas quinases e fosfatases, proteínas associadas à membrana, replicação e reparo entre outras. Uma observação interessante é a baixa correlação entre esses transcritos mais expressos e as CDS amplificadas ou deletadas, mencionadas na análise genômica dessas mesmas populações. A Tabela 11 relaciona os transcritos mais ou menos expressos na população resistente ao SbIII de *L. (V.) braziliensis*:

Tabela 11: Transcritos identificados pelo menos 5,0 X mais ou menos expressos na população resistente ao SbIII de *L. (V.) braziliensis*.

CDS	Descrição	Situação
<b>LbrM14_V2.1000</b>	hypothetical protein, conserved	16,8 X mais expresso
<b>LbrM27_V2.1230</b>	intraflagellar transport protein IFT88, putative	14,6 X mais expresso
<b>LbrM31_V2.1020</b>	hypothetical protein, conserved	13,2 X mais expresso
<b>LbrM07_V2.0980</b>	hypothetical protein, conserved	11,5 X mais expresso
<b>LbrM30_V2.3340</b>	UV excision repair RAD23-like protein	10,7 X mais expresso
<b>LbrM18_V2.0660</b>	hypothetical protein, conserved	10,6 X mais expresso
<b>LbrM24_V2.1290</b>	amastin-like surface protein-like protein	8,8 X mais expresso
<b>LbrM21_V2.0010</b>	phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase 2	8,5 X mais expresso
<b>LbrM08_V2.0750</b>	protein kinase, putative	8,3 X mais expresso

LbrM10_V2.1450	phosphate-repressible phosphate permease-like protein	8,2 X mais expresso
LbrM15_V2.0220	hypothetical protein, conserved	8,2 X mais expresso
LbrM07_V2.0160	protein kinase, putative	7,9 X mais expresso
LbrM11_V2.0160	hypotehtical protein	7,9 X mais expresso
LbrM20_V2.1490	hypothetical protein, conserved	7,9 X mais expresso
LbrM31_V2.0650	hypothetical protein, unknown function	7,8 X mais expresso
LbrM20_V2.1540	ATP-dependent RNA helicase, putative	7,7 X mais expresso
LbrM14_V2.1050	dynein heavy chain, putative	7,6 X mais expresso
LbrM04_V2.0210	hypothetical protein, conserved in leishmania	7,6 X mais expresso
LbrM32_V2.3300	hypothetical protein, conserved	7,6 X mais expresso
LbrM28_V2.0460	ribonuclease II-like protein, putative	7,5 X mais expresso
LbrM28_V2.2320	cullin 2, putative	7,5 X mais expresso
LbrM33_V2.0700	hypothetical protein, conserved	7,4 X mais expresso
LbrM02_V2.0650	mitochondrial carrier protein, putative	7,3 X mais expresso
LbrM15_V2.0830	hypothetical protein, conserved	7,3 X mais expresso
LbrM22_V2.0130	hypothetical protein, conserved	7,3 X mais expresso
LbrM07_V2.0630	hypothetical protein, conserved	7,3 X mais expresso
LbrM13_V2.1540	pyrroline-5-carboxylate reductase	7,3 X mais expresso
LbrM27_V2.0960	2-oxoglutarate dehydrogenase subunit, putative	6,5 X mais expresso
LbrM24_V2.1450	kinesin, putative	6,4 X mais expresso
LbrM27_V2.0300	acyl carrier protein, putative	6,3 X mais expresso
LbrM35_V2.2190	hypothetical protein, conserved	6,3 X mais expresso
LbrM03_V2.0490	hypothetical protein, conserved	5,9 X mais expresso
LbrM24_V2.0090	hypothetical protein, conserved	5,8 X mais expresso
LbrM32_V2.3190	hypothetical protein, conserved	5,8 X mais expresso
LbrM20_V2.1560	hypothetical protein, conserved	5,7 X mais expresso
LbrM26_V2.1430	hypothetical protein, conserved	5,6 X mais expresso
LbrM27_V2.0610	calpain-like cysteine peptidase, putative	5,5 X mais expresso
LbrM07_V2.0070	hypothetical protein, conserved	5,5 X mais expresso
LbrM29_V2.1160	hypothetical protein, conserved	5,4 X mais expresso
LbrM24_V2.1050	hypothetical protein, unknown function	5,4 X mais expresso
LbrM28_V2.0710	serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit,	5,4 X mais expresso
LbrM19_V2.1050	hypothetical protein, conserved	5,4 X mais expresso
LbrM35_V2.5760	hypothetical protein, conserved	5,3 X mais expresso
LbrM10_V2.0670	hypothetical protein, unknown function	5,2 X mais expresso
LbrM06_V2.0310	hypothetical protein, conserved	5,2 X mais expresso
LbrM32_V2.2390	hypothetical protein, conserved	5,2 X mais expresso
LbrM27_V2.1450	arginyl-tRNA synthetase, putative	5,2 X mais expresso
LbrM28_V2.1930	protein kinase, putative	5,1 X mais expresso
LbrM21_V2.2170	hypothetical protein, conserved	5,1 X mais expresso
LbrM05_V2.0830	hypothetical protein, conserved	5,1 X mais expresso
LbrM07_V2.1100	hypothetical protein, conserved	5,0 X mais expresso
LbrM23_V2.0640	hypothetical protein	12,7 X menos expresso
LbrM28_V2.0770	hypothetical protein, conserved	9,8 X menos expresso
LbrM29_V2.0190	hypothetical protein, conserved	8,6 X menos expresso
LbrM15_V2.1150	60S acidic ribosomal protein P2	7,0 X menos expresso
LbrM07_V2.0040	hypothetical protein, conserved	6,6 X menos expresso
LbrM23_V2.1160	hypothetical protein, conserved	6,2 X menos expresso
LbrM15_V2.0530	hypothetical protein, conserved	6,1 X menos expresso
LbrM22_V2.0420	hypothetical protein, conserved	5,9 X menos expresso
LbrM35_V2.5570	hypothetical protein, conserved	5,8 X menos expresso
LbrM08_V2.0030	vesicle-associated membrane protein, putative	5,7 X menos expresso
LbrM21_V2.0760	dual specificity protein phosphatase, putative	5,5 X menos expresso
LbrM01_V2.0130	hypothetical protein, conserved	5,5 X menos expresso
LbrM26_V2.2400	hypothetical protein, conserved	5,2 X menos expresso
LbrM30_V2.3360	hypothetical protein, conserved	5,1 X menos expresso

### 5.8.2. Anotação funcional dos transcritos identificados:

Além da anotação estrutural descrita anteriormente foi realizada a anotação funcional dos 957 transcritos identificados pelos microarranjos de cDNA. Para tanto foram utilizadas duas abordagens distintas: a) o banco de dados ENZYME (Enzyme nomenclature database) que é um repositório contendo informações relativas à nomenclatura de enzimas baseado nas recomendações da “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB) e que descreve cada tipo de enzima caracterizado através de um número conhecido como número EC (Enzyme Commission); b) a classificação em categorias funcionais baseada no banco de dados COG (Cluster of Ortholog Groups), que consiste em proteínas e domínios de 66 genomas distintos anotados em categorias funcionais representadas por códigos de uma letra.

A busca utilizando o banco de dados ENZYME reportou ao todo 101 enzimas anotadas que reconheceram 140 transcritos diferentes de *L. (V.) braziliensis*. Destas, 87 enzimas reconheceram apenas um dos 957 transcritos diferencialmente expressos, sendo 50 transcritos mais expressos e 37 transcritos menos expressos na população resistente ao SbIII. A Tabela 12 relaciona esses transcritos; nela estão apresentadas a CDS, EC Number, descrição da enzima correspondente e o nível de expressão em relação à população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII.

Tabela 12: Anotação dos transcritos diferencialmente expressos, segundo o banco de dados ENZYME.

CDS	EC Number	Enzima	Situação
LbrM13_V2.1540	1.5.1.2	Pyrroline-5-carboxylate reductase	7,3 X mais expresso
LbrM27_V2.1450	6.1.1.19	Arginine--tRNA ligase	5,2 X mais expresso
LbrM33_V2.1960	2.7.7.7	DNA-directed DNA polymerase	4,6 X mais expresso
LbrM07_V2.0130	2.1.1.61	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	4,5 X mais expresso
LbrM35_V2.2820	6.3.2.17	Tetrahydrofolate synthase	4,2 X mais expresso
LbrM10_V2.0170	3.6.1.42	Guanosine-diphosphatase	4,0 X mais expresso
LbrM19_V2.0980	2.7.7.6	DNA-directed RNA polymerase	3,7 X mais expresso
LbrM35_V2.3890	3.6.1.13	ADP-ribose diphosphatase	3,7 X mais expresso
LbrM35_V2.4420	1.6.5.5	NADPH:quinone reductase	3,4 X mais expresso
LbrM32_V2.1460	3.5.1.88	Peptide deformylase	3,3 X mais expresso
LbrM24_V2.1790	2.7.1.123	Transferred entry: 2.7.11.17	3,2 X mais expresso
LbrM31_V2.0010	2.1.1.14	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	3,2 X mais expresso
LbrM29_V2.0910	3.5.4.3	Guanine deaminase	3,1 X mais expresso

<b>LbrM06_V2.0350</b>	6.3.1.2	Glutamate--ammonia ligase	3,1 X mais expresso
<b>LbrM31_V2.2750</b>	3.1.1.3	Triacylglycerol lipase	3,0 X mais expresso
<b>LbrM23_V2.0300</b>	1.5.1.3	Dihydrofolate reductase; 2.1.1.45 Thymidylate synthase; 1.5.1.33 Pteridine reductase	2,9 X mais expresso
<b>LbrM34_V2.5290</b>	3.6.3.-	Acting on acid anhydrides; catalyzing transmembrane movement of substances.	2,8 X mais expresso
<b>LbrM31_V2.1330</b>	3.5.1.14	Aminoacylase	2,7 X mais expresso
<b>LbrM26_V2.2640</b>	2.7.2.11	Glutamate 5-kinase	2,7 X mais expresso
<b>LbrM21_V2.0170</b>	5.99.1.2	DNA topoisomerase	2,7 X mais expresso
<b>LbrM17_V2.1490</b>	1.1.3.8	L-gulonolactone oxidase	2,7 X mais expresso
<b>LbrM27_V2.0600</b>	3.4.22.17	Transferred entry: 3.4.22.52 and 3.4.22.53	2,7 X mais expresso
<b>LbrM33_V2.0720</b>	1.3.1.71	Delta(24(24(1)))-sterol reductase	2,6 X mais expresso
<b>LbrM26_V2.0330</b>	3.4.11.-	Aminopeptidases.	2,6 X mais expresso
<b>LbrM23_V2.0290</b>	6.3.4.5	Argininosuccinate synthase	2,6 X mais expresso
<b>LbrM27_V2.1010</b>	1.3.99.10	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	2,5 X mais expresso
<b>LbrM35_V2.1950</b>	1.2.1.3	Aldehyde dehydrogenase (NAD(+))	2,4 X mais expresso
<b>LbrM09_V2.0350</b>	4.1.99.3	Deoxyribodipyrimidine photo-lyase	2,4 X mais expresso
<b>LbrM27_V2.2230</b>	1.17.4.1	Ribonucleoside-diphosphate reductase	2,4 X mais expresso
<b>LbrM18_V2.1520</b>	1.6.5.3	NADH dehydrogenase (ubiquinone)	2,3 X mais expresso
<b>LbrM26_V2.0840</b>	6.3.1.1	Aspartate--ammonia ligase	2,3 X mais expresso
<b>LbrM18_V2.0760</b>	2.3.3.1	Citrate (Si)-synthase	2,3 X mais expresso
<b>LbrM35_V2.2580</b>	2.6.1.5	Tyrosine transaminase	2,3 X mais expresso
<b>LbrM14_V2.1540</b>	5.5.1.4	Inositol-3-phosphate synthase	2,3 X mais expresso
<b>LbrM20_V2.3180</b>	2.7.1.20	Adenosine kinase	2,3 X mais expresso
<b>LbrM19_V2.0860</b>	3.4.11.18	Methionyl aminopeptidase	2,2 X mais expresso
<b>LbrM24_V2.2110</b>	1.1.1.100	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	2,2 X mais expresso
<b>LbrM18_V2.0570</b>	4.2.1.3	Aconitate hydratase	2,2 X mais expresso
<b>LbrM29_V2.0070</b>	6.1.1.2	Tryptophan--tRNA ligase	2,2 X mais expresso
<b>LbrM27_V2.0100</b>	1.14.-.-	Acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen.	2,2 X mais expresso
<b>LbrM24_V2.1910</b>	3.1.1.5	Lysophospholipase	2,2 X mais expresso
<b>LbrM33_V2.2680</b>	3.6.5.1	Heterotrimeric G-protein GTPase	2,2 X mais expresso
<b>LbrM16_V2.0750</b>	2.2.1.2	Transaldolase	2,1 X mais expresso
<b>LbrM06_V2.0930</b>	2.6.1.16	Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	2,1 X mais expresso
<b>LbrM35_V2.2870</b>	2.3.1.12	Dihydrolipoylysine-residue acetyltransferase	2,1 X mais expresso
<b>LbrM29_V2.2570</b>	2.7.7.19	Polynucleotide adenyllyltransferase	2,1 X mais expresso
<b>LbrM16_V2.0590</b>	3.5.2.3	Dihydroorotase	2,1 X mais expresso
<b>LbrM29_V2.2290</b>	2.7.11.24	Mitogen-activated protein kinase	2,1 X mais expresso
<b>LbrM24_V2.0790</b>	1.1.1.38	Malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)	2,0 X mais expresso
<b>LbrM35_V2.5670</b>	2.7.9.3	Selenide, water dikinase	2,0 X mais expresso
<b>LbrM13_V2.0680</b>	3.4.99.41	Transferred entry: 3.4.24.64	4,9 X menos expresso
<b>LbrM32_V2.3210</b>	2.7.4.6	Nucleoside-diphosphate kinase	3,8 X menos expresso
<b>LbrM35_V2.4430</b>	2.7.8.15	UDP-N-acetylglucosamine--dolichyl-phosphateN-acetylglucosaminophosphotransferase	3,0 X menos expresso
<b>LbrM01_V2.0550</b>	6.2.1.3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	2,9 X menos expresso
<b>LbrM13_V2.0050</b>	3.1.26.4	Ribonuclease H	2,9 X menos expresso
<b>LbrM28_V2.2890</b>	1.9.3.1	Cytochrome-c oxidase	2,8 X menos expresso
<b>LbrM22_V2.1430</b>	2.7.1.24	Dephospho-CoA kinase	2,7 X menos expresso
<b>LbrM05_V2.0980</b>	1.6.99.3	NADH dehydrogenase	2,7 X menos expresso
<b>LbrM31_V2.1840</b>	2.3.1.16	Acetyl-CoA C-acyltransferase	2,6 X menos expresso



<b>LbrM23_V2.1030</b>	3.4.11.1	Leucyl aminopeptidase	2,5 X menos expresso
<b>LbrM24_V2.2330</b>	1.14.19.1	Stearoyl-CoA 9-desaturase	2,5 X menos expresso
<b>LbrM26_V2.2150</b>	4.2.1.46	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	2,5 X menos expresso
<b>LbrM33_V2.3000</b>	2.3.1.41	Beta-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase I	2,5 X menos expresso
<b>LbrM06_V2.0620</b>	4.2.1.1	Carbonate dehydratase	2,4 X menos expresso
<b>LbrM35_V2.0300</b>	2.4.1.83	Dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase	2,4 X menos expresso
<b>LbrM30_V2.0220</b>	2.1.1.-	Methyltransferases.	2,4 X menos expresso
<b>LbrM14_V2.0650</b>	2.3.1.119	Icosanoyl-CoA synthase	2,4 X menos expresso
<b>LbrM32_V2.3750</b>	3.1.13.-	Exoribonucleases producing 5'-phosphomonoesters.	2,3 X menos expresso
<b>LbrM30_V2.3580</b>	1.14.14.-	With reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.	2,3 X menos expresso
<b>LbrM14_V2.1330</b>	4.2.1.11	Phosphopyruvate hydratase	2,3 X menos expresso
<b>LbrM33_V2.2810</b>	3.4.17.19	Carboxypeptidase Taq	2,3 X menos expresso
<b>LbrM30_V2.3120</b>	6.1.1.9	Valine--tRNA ligase	2,3 X menos expresso
<b>LbrM07_V2.0090</b>	2.1.1.13	Methionine synthase	2,2 X menos expresso
<b>LbrM05_V2.0940</b>	3.4.14.4	Dipeptidyl-peptidase III	2,2 X menos expresso
<b>LbrM06_V2.0720</b>	4.2.1.16	Transferred entry: 4.3.1.19	2,2 X menos expresso
<b>LbrM09_V2.0850</b>	3.4.21.83	Oligopeptidase B	2,2 X menos expresso
<b>LbrM19_V2.1320</b>	6.1.1.20	Phenylalanine--tRNA ligase	2,2 X menos expresso
<b>LbrM34_V2.4760</b>	3.5.4.6	AMP deaminase	2,2 X menos expresso
<b>LbrM33_V2.0520</b>	1.1.1.19	Glucuronate reductase	2,1 X menos expresso
<b>LbrM20_V2.2190</b>	3.6.3.1	Phospholipid-translocating ATPase	2,1 X menos expresso
<b>LbrM16_V2.0670</b>	4.2.99.18	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	2,1 X menos expresso
<b>LbrM30_V2.0690</b>	1.6.6.1	Transferred entry: 1.7.1.1	2,1 X menos expresso
<b>LbrM35_V2.4670</b>	3.5.1.1	Asparaginase	2,1 X menos expresso
<b>LbrM34_V2.2630</b>	1.3.-.-	Acting on the CH-CH group of donors.	2,1 X menos expresso
<b>LbrM13_V2.1480</b>	1.14.99.7	Squalene monooxygenase	2,0 X menos expresso
<b>LbrM18_V2.0220</b>	5.4.99.9	UDP-galactopyranose mutase	2,0 X menos expresso
<b>LbrM28_V2.0150</b>	2.7.1.33	Pantothenate kinase	2,0 X menos expresso

Além destas enzimas, outras 14 enzimas foram reconhecidas por mais de um transcrito. O número de transcritos reconhecidos por enzima variou de 2 a 14 transcritos diferencialmente expressos. Os transcritos correspondentes a cada enzima foram comparados e observou-se que onze das catorze enzimas foram reconhecidas por pelo menos um transcrito mais expresso e um transcrito menos expresso na população resistente ao SbIII. Três das catorze enzimas foram reconhecidas apenas por transcritos mais expressos na população resistente ao SbIII (EC Number: 3.4.25.1 – Proteasome endopeptidase complex; EC Number: 2.7.1.137 – Phosphatidylinositol 3-kinase; EC Number: 2.7.1.- –Phosphotransferases with an alcohol group as acceptor).

Uma segunda abordagem na anotação funcional dos transcritos foi a classificação destes em categorias funcionais de acordo com o banco de dados COG. O transcriptoma predito de *L. (V.) braziliensis* foi comparado com as

sequências protéicas ou domínios de 66 genomas anotados no COG utilizando o programa BLASTx. Os transcritos identificados que apresentaram um e-value de no mínimo  $10^{-4}$  foram selecionados e classificados segundo a categoria funcional de seus prováveis ortólogos. A Figura 22 mostra a distribuição de todos os transcritos identificados, dos transcritos mais expressos e dos transcritos menos expressos na população resistente de *L. (V.) braziliensis*, de acordo com as categorias funcionais anotadas no COG.

Comparando os transcritos de *L. (V.) braziliensis* com os dados dos 66 genomas anotados no COG, foram identificados ao todo 2.407 transcritos, dos quais 251 foram mais expressos na população resistente ao SbIII e 163 foram menos expressos nessa mesma população. Conforme pode ser visto na Figura 22, a maioria dos transcritos identificados apresenta apenas predições gerais de função (categoria R), enquanto que as categorias com menor número de transcritos identificados (Outras) representam 29 a 38% do total de transcritos identificados em cada população.

Comparando a distribuição dos transcritos mais expressos na população resistente ao SbIII com o total de transcritos identificados, observa-se no primeiro caso um discreto aumento na freqüência de transcritos associados ao metabolismo e transporte de aminoácidos (categoria E), transcrição (categoria K) e replicação, recombinação e reparo (categoria L), além de uma diminuição na freqüência das categorias tradução, estrutura ribossomal e biogênese (categoria J) e modificação pós-traducional, “turnover” protéico, chaperonas (categoria O).

Por outro lado, a comparação entre a distribuição dos transcritos menos expressos na população resistente ao SbIII e o total de transcritos identificados em *L. (V.) braziliensis*, indica no primeiro caso um aumento na freqüência de transcritos associados ao metabolismo de aminoácidos (categoria E) e metabolismo e transporte de lipídios (categoria I), além de uma diminuição na freqüência das categorias estrutura ribossomal e biogênese (categoria J), transcrição (categoria K), replicação, recombinação e reparo (categoria L) e mecanismos de transdução de sinal (categoria T). Os resultados dos transcritos mais e transcritos menos expressos na população resistente ao SbIII sugerem um papel importante dos mecanismos de armazenagem e processamento da informação no fenótipo de resistência a drogas em *Leishmania*.

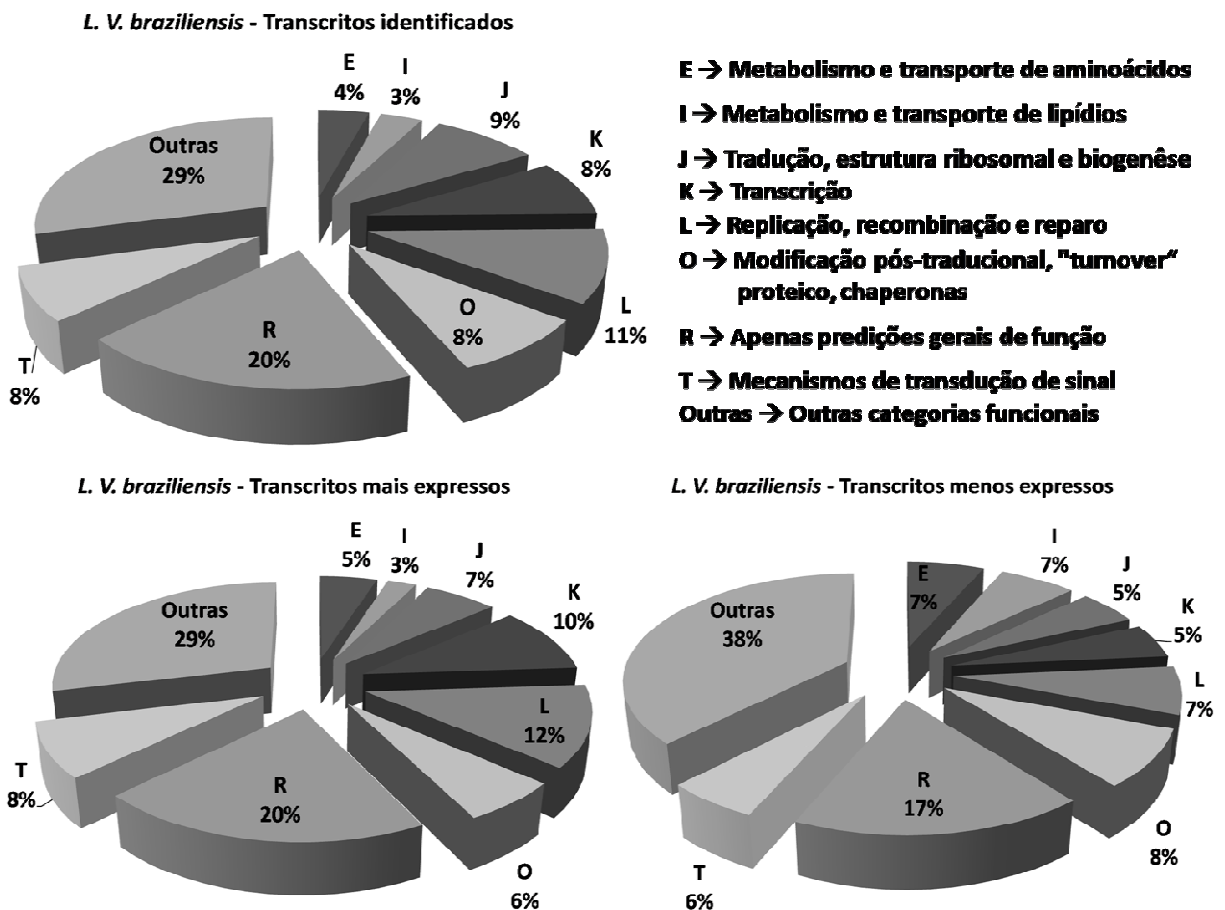


Figura 22: Distribuição dos transcritos identificados de *L. (V.) braziliensis*, segundo as categorias funcionais do banco de dados COG. Na Figura, os gráficos indicam o percentual de transcritos anotados em cada categoria no transcriptoma de *L. (V.) braziliensis* (acima); nos transcritos mais expressos (à esquerda) e menos expressos (à direita) na população resistente ao SbIII. As categorias funcionais são representadas por códigos de uma letra descritos na legenda. A Figura mostra apenas as categorias com maior número de transcritos identificados; a categoria "outras" agrupa todas as demais categorias definidas no COG.

### 5.8.3. Comparações com bancos de dados de alvos para drogas e com o genoma humano:

A anotação dos transcritos diferencialmente expressos identificados pelos microarranjos de cDNA é fundamental para estudos de novos alvos para a quimioterapia das leishmanioses. Uma análise complementar a essa foi realizada comparando-se esses transcritos identificados com bancos de dados de drogas já existentes. Essa análise fornece informações importantes sobre a fisiologia celular em resposta à pressão provocada por drogas. Foram comparadas as sequências de aminoácidos preditas dos 957 transcritos diferencialmente expressos identificados

pelos microarranjos de cDNA e 4.535 sequências de aminoácidos de alvos moleculares para drogas, depositadas no banco de dados “Drug\_Bank” (<http://www.drugbank.ca/> acessado em 03/01/2010). Foi utilizado o algoritmo BLASTp com suas configurações padrão; alinhamentos com e-value de no mínimo  $10^{-4}$  foram considerados significativos.

Dos 957 transcritos comparados com o banco de dados Drug\_Bank, 247 foram identificados com pelo menos um alvo para drogas. Esses 247 transcritos reconheceram um total de 191 alvos, sendo sete o número máximo de transcritos que reconheceram um mesmo alvo. A Tabela 16 relaciona os alvos moleculares para drogas reconhecidos com maior frequência pelos transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis*. Nela estão apresentados o código do alvo para drogas, conforme disponível no Drug\_Bank, o número de transcritos que reconheceram o alvo e a descrição do mesmo.

Tabela 13: Frequência e descrição dos alvos para drogas mais encontrados entre os transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis*.

Drug_Bank alvo N°	Frequência	Descrição
drugbank_target 4288	7	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6
drugbank_target 3303	5	Early endosome antigen 1
drugbank_target 5280	5	Kinesin heavy chain
drugbank_target 2963	4	Myosin-11
drugbank_target 3327	4	Chromatin remodelling complex ATPase chain I swi
drugbank_target 3046	3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 2
drugbank_target 314	3	System N amino acid transporter 1
drugbank_target 3202	3	Actin, alpha skeletal muscle
drugbank_target 3231	3	Death-associated protein kinase 1
drugbank_target 5310	3	Thermosome subunit alpha
drugbank_target 5454	3	Internalin-A
drugbank_target 5543	3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha subunit

Dos 247 transcritos identificados, 147 foram mais expressos e 100 foram menos expressos na população resistente ao SbIII. Cento e cinquenta e oito transcritos reconheceram um único alvo, enquanto 33 transcritos reconheceram mais de um. Dentre os 12 alvos identificados com maior frequência, três (Drugbank\_target| 3046, 5454 e 5543) foram reconhecidos apenas por transcritos mais expressos na população resistente ao SbIII; os demais 9 foram reconhecidos por transcritos mais e menos expressos na mesma população.

Cada um dos alvos está associado a uma ou mais drogas relacionadas no banco de dados Drug\_Bank. Assim, foram identificadas 293 drogas associadas aos 191 alvos reconhecidos pelos transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis*. Duzentos e três drogas foram associadas a apenas um dos alvos selecionados; as demais 90 drogas estão associadas a diferentes alvos que podem variar de 2 a 32. As drogas relacionadas no Drug\_Bank e selecionadas nessa análise incluem desde aminoácidos (L-histidina e L-glutamina etc.), coenzimas e vitaminas (Biotina, vitamina A, vitamina E etc.) e ácidos graxos (ácido linoléico) até drogas avaliadas experimentalmente na quimioterapia das leishmanioses como metotrexato, vimblastina e terbinafina e de outras doenças (tamoxifeno, ciclosporina, rifabutina e naftifina). A Tabela 17 relaciona as drogas identificadas com maior frequência entre os 191 alvos selecionados nesse estudo.

Tabela 14: Drogas identificadas com maior frequência entre os 191 alvos reconhecidos pelos transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis*.

Drug_Bank N°	Frequência	Nome genérico	Fórmula	Número de registro CAS
DB03431	32	Adenosine-5'-Diphosphate	C10H15N5O10P2	20398-34-9
DB04395	17	Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate Ester	C10H17N6O12P3	Not Available
DB01867	14	Ethylene Glycol	C2H6O2	107-21-1
DB04184	12	Acetate Ion	C2H3O2	Not Available
DB04315	10	Guanosine-5'-Diphosphate	C10H15N5O11P2	146-91-8
DB03684	8	2-Methyl-2,4-Pentanediol	C6H14O2	Not Available
DB00157	7	NADH	C21H29N7O14P2	606-68-8
DB01694	7	D-tartaric acid	C4H6O6	147-71-7
DB02010	7	Staurosporine	C28H26N4O3	62996-74-1
DB02482	7	Phosphonothreonine	C4H10NO6P	Not Available

Além das sequências depositadas no Drug\_Bank, os 957 transcritos diferencialmente expressos foram comparados com o proteoma predito humano. O objetivo foi identificar potenciais alvos para quimioterapia das leishmanioses com pouca similaridade com as proteínas humanas. Para isso, foram comparadas as sequências de aminoácidos preditas dos 957 transcritos diferencialmente expressos identificados pelos microarranjos de cDNA e 37.391 sequências de aminoácidos do proteoma predito de *Homo sapiens*, depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acessado em 03/01/2010). Foi utilizado o algoritmo

BLASTp com suas configurações padrão; alinhamentos com e-value de no mínimo  $10^{-4}$  foram considerados significativos.

Dos 957 transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis*, 463 foram identificados no proteoma predito humano, sendo 274 transcritos mais expressos e 189 transcritos menos expressos na população resistente ao SbIII. Foram identificados 167 transcritos que codificam proteínas hipotéticas (36% do total de transcritos identificados). Como o objetivo dessa análise é identificar dentre os transcritos diferencialmente expressos aqueles cujas proteínas apresentem pouca similaridade com proteínas humanas, os 494 transcritos de *L. (V.) braziliensis* restantes (não identificados utilizando BLASTp) foram selecionados e comparados com as sequências de aminoácidos disponíveis no banco de dados Drug\_Bank (conforme descrito anteriormente).

Ao todo foram identificados 15 transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis* sem similaridade com proteínas humanas (segundo os critérios especificados acima) e que possuem alvos moleculares para drogas descritas no banco de dados Drug\_Bank. Cada transcrito reconheceu um alvo diferente depositado no Drug\_Bank, porém é importante observar que mesmo alvos diferentes podem estar associados a uma mesma droga. Ao todo foram identificadas 29 drogas para as 15 proteínas codificadas pelos transcritos, das quais uma é utilizada como suplemento alimentar (DB00122 – Colina) enquanto outra é utilizada no tratamento de problemas respiratórios (DB01411 – Pranlukast). Um detalhe interessante é que esta última está associada a um transcrito que codifica uma proteína hipotética menos expressa na população resistente ao SbIII. As demais drogas não possuem indicação de uso disponibilizadas no Drug\_Bank. A Tabela 18 relaciona os 15 transcritos identificados nessa etapa, seus produtos e drogas associadas:

Tabela 15: Descrição das proteínas e drogas associadas aos transcritos diferencialmente expressos sem similaridade significativa com o proteoma humano e identificadas no banco de dados Drug\_Bank.

Transcrito	Descrição	Drogas
LbrM05_V2.1210	surface antigen like protein	Acetate Ion
LbrM06_V2.0620	carbonic anhydrase family protein, putative	Acetate Ion, Ethylene Glycol, Citric Acid
LbrM15_V2.0340	ecotin, putative	Beta-D-Glucose, B-Octylglucoside
LbrM18_V2.0220	UDP-galactopyranose mutase	Flavin-Adenine Dinucleotide, 4-Bromo-3-(5'-Carboxy-4'-Chloro-2'-Fluorophenyl)-1-Methyl-5-Trifluoromethyl-Pyrazol
LbrM20_V2.2970	aldose 1-epimerase-like protein	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane
LbrM23_V2.1820	hypothetical protein, conserved	1-Methyl-2-quinolone, 5-Aminoisoquinoline
LbrM26_V2.0300	ras-like small GTPases, putative	Guanosine-5'-Diphosphate
LbrM28_V2.1740	hydrolase, alpha/beta fold family, putative	N-Valeric Acid, Isobutyric Acid, Butanoic Acid, 2-Methylbutanoic Acid, Isovaleric Acid, Propanoic Acid, Benzoic Acid, Acetate Ion
LbrM31_V2.0010	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase, putative	(6s)-5,6,7,8-Tetrahydrofolate, 5-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolic Acid, 2-Amino-4-Mercapto-Butyric Acid
LbrM31_V2.2750	lipase, putative	Diundecyl Phosphatidyl Choline, Oleic Acid
LbrM32_V2.1280	hypothetical protein, conserved	Pranlukast
LbrM32_V2.1460	polypeptide deformylase-like protein, putative	Bb-3497
LbrM34_V2.1390	choline/ethanolamine kinase, putative	Choline
LbrM35_V2.6110	hypothetical protein, conserved	Riboflavin Monophosphate
LbrM35_V2.7010	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	2-Phosphoglyceric Acid, 3-Phosphoglyceric Acid

#### 5.8.4. Comparações com outras espécies de *Leishmania*:

Os resultados de microarranjos de cDNA dos 957 transcritos diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis* foram comparados entre as quatro espécies de *Leishmania* estudadas. O objetivo foi identificar transcritos mais ou menos expressos associados à resistência a drogas, discriminando-os de eventos que possivelmente ocorreram ao acaso. Transcritos diferencialmente expressos em diferentes espécies cultivadas sob as mesmas condições têm uma maior probabilidade de estarem associadas ao fenótipo de resistência a drogas. Por outro lado, transcritos mais expressos na população resistente ao SbIII de uma espécie, e

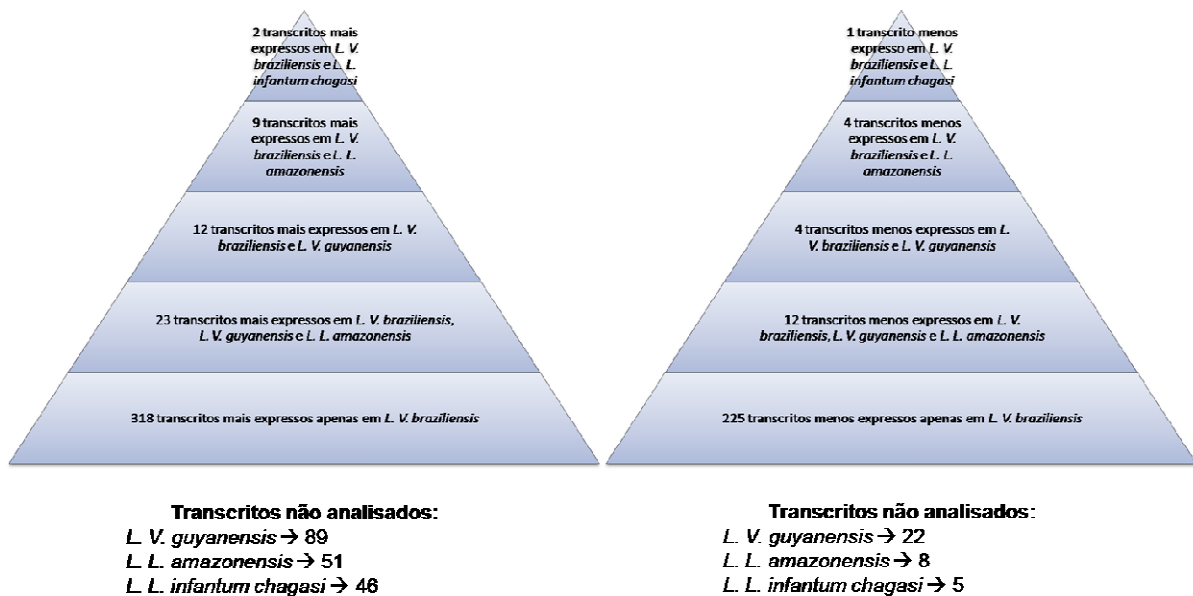
menos expressos na população resistente de uma outra espécie, têm uma maior probabilidade de terem ocorrido ao acaso.

Inicialmente, foram selecionados os 957 transcritos diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis* e o nível de expressão desses transcritos nas quatro espécies de *Leishmania* estudadas foi comparado. Os 560 transcritos mais expressos e os 397 transcritos menos expressos foram analisados separadamente. Dos 957 transcritos identificados, 347 apresentaram resultados discordantes (mais expressos na população selvagem de uma espécie e na população resistente de outra). Dos 610 transcritos restantes, 364 foram mais expressos nas populações resistentes de pelo menos uma espécie de *Leishmania*, enquanto 246 foram menos expressos nessas mesmas populações. Os resultados dessas comparações estão representados nas Figuras 23 e 24.

Dos 364 transcritos mais expressos, 318 apresentaram expressão genética diferencial apenas em *L. (V.) braziliensis*. Dos 46 transcritos restantes, metade (23) foram aumentados em *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; 12 transcritos foram aumentados em *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*; 9 transcritos foram aumentados em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e apenas 2 transcritos foram aumentados em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (LbrM32\_V2.1320 e LbrM31\_V2.1850, ambos proteínas hipotéticas). É importante observar que dos 364 transcritos, 89 não foram analisados em *L. (V.) guyanensis*, 51 não foram analisados em *L. (L.) amazonensis* e 46 não foram analisados em *L. (L.) infantum chagasi*.

Considerando apenas os 246 transcritos menos expressos em pelo menos uma espécie, 225 apresentaram expressão genética diferencial apenas em *L. (V.) braziliensis*. Dos 21 transcritos restantes, 12 foram menos expressos em *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; 4 transcritos foram menos expressos em *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*; 4 transcritos foram menos expressos em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e apenas 1 transcrito foi menos expresso em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (LbrM26\_V2.2440 – proteína hipotética). Dos 246 transcritos menos expressos, 22 não foram analisados em *L. (V.) guyanensis*, 8 não foram analisados em *L. (L.) amazonensis* e 5 não foram analisados em *L. (L.) infantum chagasi*.





### Transcritos mais expressos

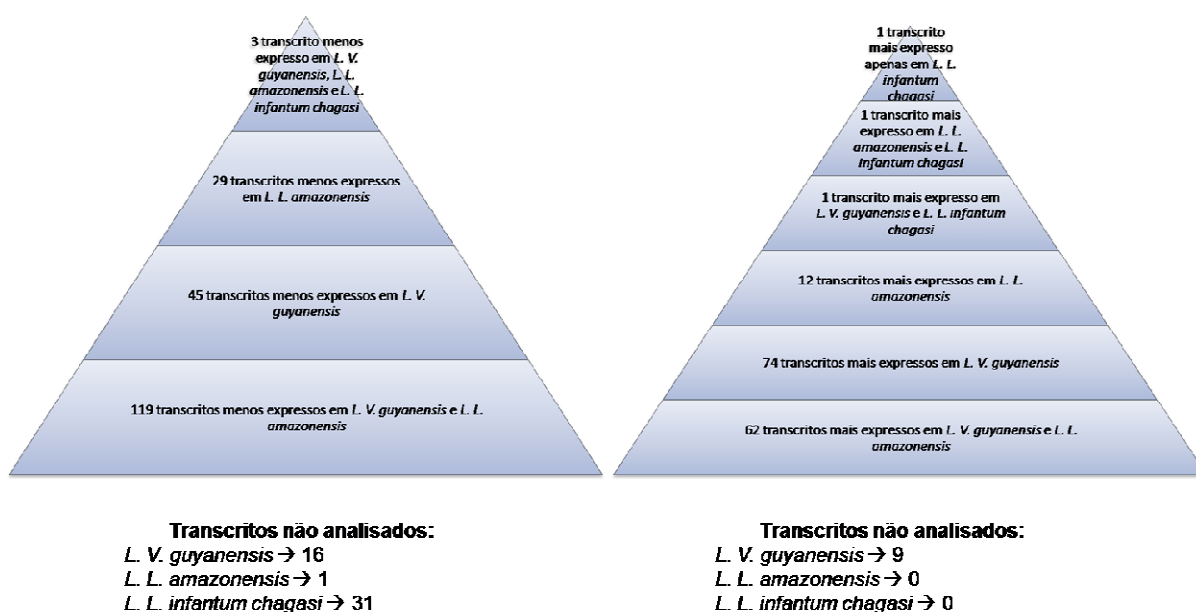
### Transcritos menos expressos

Figura 23: Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, comparados a outras três espécies de *Leishmania*. À esquerda estão representados os 364 transcritos mais expressos; à direita estão representados os 246 transcritos menos expressos. Na Figura, foram desconsiderados os transcritos com resultados discordantes (ver texto) entre diferentes espécies do parasito.

Conforme descrito anteriormente, 347 transcritos apresentaram resultados discordantes; destes, 196 transcritos foram mais expressos na população resistente ao SbIII de *L. (V.) braziliensis* enquanto 151 transcritos foram menos expressos nessa mesma população. Dos 196 transcritos mais expressos em *L. (V.) braziliensis*, 119 foram menos expressos em *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; 45 transcritos foram menos expressos em *L. (V.) guyanensis*; 29 transcritos foram menos expressos em *L. (L.) amazonensis* e apenas 3 transcritos foram menos expressos em *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (LbrM28\_V2.2690, LbrM33\_V2.1620 – ambas proteínas hipotéticas; e LbrM19\_V2.1110 – provável transportador ABC). Neste grupo, 16 transcritos não foram analisados em *L. (V.) guyanensis*, 1 não foi analisado em *L. (L.) amazonensis* e 31 transcritos não foram analisados em *L. (L.) infantum chagasi*.

Entre os 151 transcritos discordantes menos expressos em *L. (V.) braziliensis*, 62 foram mais expressos em *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; 74 transcritos foram mais expressos em *L. (V.) guyanensis*; 12 transcritos foram

mais expressos em *L. (L.) amazonensis*; 1 transcrito foi mais expresso em *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (LbrM15\_V2.1020 – proteína hipotética); 1 transcrito foi mais expresso em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (LbrM20\_V2.2190 – phospholipid-transporting ATPase-like protein) e 1 transcrito foi identificado mais expresso apenas em *L. (L.) infantum chagasi* (LbrM32\_V2.0830 – proteína hipotética). Neste grupo, apenas 9 transcritos não foram analisados em *L. (V.) guyanensis*. Os resultados dessas comparações estão sumarizados na Figura 24:



### Transcritos mais expressos

### Transcritos menos expressos

Figura 24: Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, comparados a outras três espécies de *Leishmania*. Na Figura, apenas os transcritos com resultados discordantes (ver texto) foram apresentados. À esquerda estão representados os 196 transcritos mais expressos em *L. (V.) braziliensis*; à direita estão representados os 151 transcritos menos expressos.

É importante observar que, para os transcritos não analisados em uma ou mais espécies, não se pode afirmar se estes estão ou não associados com o fenótipo de resistência a drogas, sendo necessários outros ensaios para confirmar esses resultados. Nenhum transcrito identificado foi mais expresso ou menos expresso nas quatro populações de *Leishmania* estudadas e apenas seis transcritos foram diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (sendo que três destes transcritos apresentaram resultados discordantes quanto à

população mais expressa). Considerando apenas os transcritos diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, foram identificados 23 transcritos mais expressos e 12 transcritos menos expressos nas populações resistentes das três espécies. A Tabela 19 relaciona esses transcritos, seus produtos e o nível de expressão em cada espécie de *Leishmania*:

Tabela 16: Transcritos diferencialmente expressos em populações resistentes ao SbIII de três espécies de *Leishmania*.

Transcritos mais expressos na população resistente ao SbIII		Nível de expressão		
Transcrito	Produto	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
LbrM27_V2.0610	calpain-like cysteine peptidase, putative	5,5	6,8	4,1
LbrM29_V2.1160	hypothetical protein, conserved	5,4	6,1	3,5
LbrM10_V2.0670	hypothetical protein, unknown function	5,2	2,6	2,8
LbrM27_V2.1210	hypothetical protein, conserved	4,7	3,1	2,8
LbrM20_V2.0560	hypothetical protein, conserved	4,6	3,3	2,0
LbrM22_V2.0100	hypothetical protein, conserved	3,8	4,6	2,5
LbrM09_V2.0080	RNA-binding protein 5, putative	3,5	4,9	2,9
LbrM28_V2.2380	hypothetical protein, conserved	3,4	2,2	2,3
LbrM32_V2.1580	hypothetical protein, conserved	3,3	2,1	2,5
LbrM33_V2.1970	transcription activator	3,2	2,1	2,1
LbrM23_V2.0300	pteridine reductase 1	2,9	5,0	2,6
LbrM34_V2.1390	choline/ethanolamine kinase, putative	2,8	4,6	2,1
LbrM31_V2.3660	sodium stibogluconate resistance protein, putative	2,8	3,1	2,2
LbrM32_V2.1470	hypothetical protein, conserved	2,7	4,6	2,8
LbrM27_V2.0780	hypothetical protein, unknown function	2,7	2,2	2,1
LbrM23_V2.0290	argininosuccinate synthase, putative	2,6	2,0	2,6
LbrM35_V2.3960	hypothetical protein, conserved	2,5	3,2	2,6
LbrM35_V2.5220	hypothetical protein, conserved	2,5	2,8	2,2
LbrM33_V2.0490	hypothetical protein, conserved	2,4	3,3	2,5
LbrM27_V2.1110	hypothetical protein, conserved	2,2	3,8	2,0
LbrM15_V2.0750	hypothetical protein, conserved	2,2	5,8	3,2
LbrM24_V2.1660	hypothetical protein, unknown function	2,0	3,0	2,8
LbrM34_V2.2970	ubiquitin-activating enzyme E1, putative	2,0	5,5	2,8

Transcritos menos expressos na população resistente ao SbIII		Nível de expressão		
Transcrito	Produto	L. (V.) <i>braziliensis</i>	L. (V.) <i>guyanensis</i>	L. (L.) <i>amazonensis</i>
LbrM27_V2.0930	hypothetical protein, conserved	-2,0	-3,1	-2,4
LbrM16_V2.0670	apurinic/aprimidinic endonuclease-redox protein	-2,1	-3,2	-2,4
LbrM20_V2.0120	hypothetical protein, conserved	-2,1	-3,5	-2,7
LbrM14_V2.0480	hypothetical protein, conserved	-2,2	-2,7	-2,4
LbrM30_V2.1390	hypothetical protein, conserved	-2,5	-2,6	-2,1
LbrM32_V2.0650	ATP-dependent RNA helicase-like protein, putative	-2,5	-7,3	-6,9
LbrM21_V2.1270	kinesin, putative	-2,5	-2,3	-2,5
LbrM30_V2.3810	hypothetical protein, conserved	-2,6	-2,3	-2,0
LbrM34_V2.1720	trypanin-like protein	-2,6	-2,8	-2,6
LbrM14_V2.1060	protein kinase, putative	-2,6	-2,1	-2,0
LbrM27_V2.2690	hypothetical protein, conserved	-3,2	-2,1	-2,1
LbrM35_V2.1580	hypothetical protein, conserved	-3,3	-3,4	-2,4

É interessante observar que a maioria dos transcritos diferencialmente expressos nas três espécies de *Leishmania* codifica proteínas hipotéticas. Quinze dos vinte e três transcritos mais expressos (aproximadamente 65%) e sete dos doze transcritos menos expressos (aproximadamente 58%) codificam proteínas hipotéticas. Esses percentuais, porém estão muito próximos dos percentuais de proteínas hipotéticas identificadas entre os 957 transcritos diferencialmente expressos (608 transcritos – aproximadamente 64%) e entre os 5.543 transcritos únicos identificados pelos microarranjos de cDNA em *L. (V.) braziliensis* (3.593 transcritos – aproximadamente 65%).

A análise dos transcritos diferencialmente expressos entre populações selvagens e resistentes ao SbIII em diferentes espécies de *Leishmania*, pode fornecer informações úteis acerca dos mecanismos moleculares de resistência a drogas comuns aos diferentes gêneros do parasito, bem como das particularidades de cada espécie ou mesmo de fenômenos de expressão gênica diferencial que ocorreram “ao acaso” nessas espécies.

#### **5.8.5. Análise comparativa entre os estudos genômicos e transcriptômicos de *L. (V.) braziliensis*:**

Uma análise comparativa foi realizada entre os resultados dos estudos genômicos e transcriptômicos dessas populações de *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII. O objetivo foi identificar mecanismos comuns de resistência ao SbIII detectados pelos microarranjos de DNA genômico e de cDNA. O pressuposto

básico dessa análise seria o de que tais mecanismos detectados por diferentes métodos teriam uma menor probabilidade de terem efeitos neutros no fenótipo de resistência, além de constituírem potenciais alvos para estudos de quimioterapia experimental em diferentes espécies do parasito.

Foram comparados as 252 CDS amplificadas ou deletadas, detectadas pelo método de CGH, e os 957 transcritos diferencialmente expressos detectados pelos microarranjos de cDNA. Essa comparação resultou na seleção de 74 genes identificados pelas duas técnicas. Destes, 13 genes apresentaram resultados contraditórios: 9 genes apresentaram deleção gênica na população resistente ao SbIII, detectada por CGH, e aumento na expressão gênica nessa mesma população, detectada pelos microarranjos de cDNA. Outros 4 genes apresentaram o resultado oposto, a análise do CGH indicou amplificação gênica enquanto os microarranjos de cDNA indicaram diminuição no nível de expressão na população resistente ao SbIII. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 20:

Tabela 17: Genes identificados pelos microarranjos de DNA genômico e de cDNA, porém com resultados contraditórios.

Gene	Produto	cDNA	CGH
<b>LbrM01_V2.0490</b>	hypothetical protein, unknown function	3,4 X mais expresso	3,6 X deletado
<b>LbrM04_V2.0890</b>	hypothetical protein	2,2 X mais expresso	2,1 X deletado
<b>LbrM06_V2.0780</b>	hypothetical protein, unknown function	2,1 X mais expresso	2,0 X deletado
<b>LbrM10_V2.0360</b>	hypothetical protein, conserved	2,8 X mais expresso	4,6 X deletado
<b>LbrM14_V2.0590</b>	hypothetical protein, conserved	2,6 X mais expresso	3,4 X deletado
<b>LbrM27_V2.1010</b>	isovaleryl-coA dehydrogenase, putative	2,5 X mais expresso	3,2 X deletado
<b>LbrM28_V2.2820</b>	hypothetical protein, conserved	2,8 X mais expresso	2,6 X deletado
<b>LbrM30_V2.2050</b>	hypothetical protein, conserved	2,5 X mais expresso	2,2 X deletado
<b>LbrM35_V2.2820</b>	folylpolyglutamate synthetase	4,2 X mais expresso	2,4 X deletado
<b>LbrM15_V2.0530</b>	hypothetical protein, conserved	6,1 X menos expresso	3,3 X amplificado
<b>LbrM22_V2.1500</b>	hypothetical protein, conserved	2,0 X menos expresso	4,3 X amplificado
<b>LbrM27_V2.2200</b>	d-lactate dehydrogenase-like protein	2,0 X menos expresso	2,6 X amplificado
<b>LbrM32_V2.0650</b>	ATP-dependent RNA helicase-like protein, putative	2,5 X menos expresso	2,7 X amplificado

Os demais 61 genes identificados pelas duas técnicas foram organizados em dois grupos: a) 46 genes foram amplificados de 2,0 a 20,7 X e apresentaram um aumento no nível de expressão de 2,2 a 11,5 X na população resistente ao SbIII. A grande maioria dos genes codifica proteínas hipotéticas (30 genes); outros genes incluem argininosuccinato sintase (que em *L. (V.) braziliensis* é um pseudogene –

LbrM23\_V2.0290), pteridina redutase 1 (LbrM23\_V2.0300) e o gene de resistência à terbinafina (LbrM23\_V2.0270) entre outros. b) 15 genes foram deletados de 2,0 a 4,2 X e tiveram seu nível de expressão diminuído de 2,3 a 4,9 X na população resistente ao SbIII. Oito genes (aproximadamente metade) codificam proteínas hipotéticas; os demais genes incluem uma provável fibrilarina (LbrM19\_V2.0410), nucleosídeo difosfato kinase b (LbrM32\_V2.3210), transportador de nucleosídeo 1 (LbrM15\_V2.1180) entre outros. É interessante destacar que o gene que codifica o fosfoglicano beta 1,3 galactosiltransferase 2 (LbrM21\_V2.0010) está amplificado e com expressão aumentada na população resistente ao SbIII; porém dois genes similares (LbrM02\_V2.0250 e LbrM02\_V2.0790 – phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase-like protein) foram deletados e apresentaram expressão diminuída na mesma população.

Foram selecionados os dados referentes à anotação funcional e as comparações com sequências depositadas no Drug\_Bank, proteoma humano e nas outras espécies de *Leishmania*. Dos 61 genes comparados, 10 foram identificados no banco de dados ENZYME e 20 genes foram identificados no COG. Vinte e quatro dos 61 genes selecionados foram identificados no proteoma predito humano. Comparações com o banco de dados Drug\_Bank permitiram a identificação de 24 drogas associadas a 14 genes distintos. Os resultados relativos a esses 14 genes estão sumarizados na Figura 25. Dos 14 genes com alvos identificados para drogas, somente um (LbrM06\_V2.0620 – carbonic anhydrase family protein, putative) não foi identificado no proteoma predito humano. Comparações com outras espécies de *Leishmania* permitiram a identificação de dois genes (LbrM23\_V2.0300 – pteridina redutase 1 e LbrM27\_V2.0610 – provável cisteína peptidase semelhante à calpaína) superexpressos e amplificados em três (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*) das quatro espécies de *Leishmania* estudadas.

Transcrito	Produto	cDNA <sup>a</sup>	CGP <sup>b</sup>	Função predita GO:	Processo predito GO:	Componente predito GO:	EC Número:	Classificação COG	Drug alvo N°	Drug Bank drogas N°	Identificado no proteoma humano?
LbrM06_V2.0620	carbonic anhydrase family protein, putative	-2,4	-2,1	zinc ion binding, carbonate dehydratase activity	carbon utilization	null	4.2.1.1	P	4397	DB01867; DB04184; DB04272	Não
LbrM12_V2.0750	surface antigen protein, putative	4,8	6,1	protein binding	null	null		S	5510	DB04184	Sim
LbrM15_V2.1180	nucleoside transporter 1, putative	-2,7	-2,0	nucleoside transmembrane transporter activity	transport	membrane			2222	DB00197	Sim
LbrM20_V2.1540	ATP-dependent RNA helicase, putative	7,7	10,1	RNA binding, ATP binding, helicase activity, ATP-dependent helicase activity, nucleic acid binding	null	nucleus		LKJ	4288	DB01694	Sim
LbrM20_V2.3180	adenosine kinase-like protein	2,3	2,1	adenosine kinase activity	purine ribonucleoside salvage	null	2.7.1.20	G	3434	DB02416; DB03166; DB03909	Sim
LbrM23_V2.0290	argininosuccinate synthase, putative	2,6	12,4	argininosuccinate synthase activity, ATP binding	arginine biosynthetic process	null	6.3.4.5	E	865	DB00128; DB00155	Sim
LbrM23_V2.0300	pteridine reductase 1	2,9	17,3	binding, catalytic activity, oxidoreductase activity	metabolic process	null	1.5.1.3; 2.1.1.45; 1.5.1.33	IQR	2675	DB01867; DB02338; DB02532; DB03461; DB04400	Sim
LbrM27_V2.0610	calpain-like cysteine peptidase, putative	5,5	2,6	structural molecule activity, calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	cell adhesion, proteolysis	actin cytoskeleton, intracellular		L	5601	DB04276	Sim
LbrM27_V2.2230	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	2,4	2,1	transition metal ion binding, oxidoreductase activity, ribonucleoside-diphosphate reductase activity	deoxyribonucleoside diphosphate metabolic process	null	1.17.4.1	F	5489	DB04077	Sim
LbrM29_V2.0760	peroxisomal targeting receptor, putative	4,2	2,0	null	null	null		R	5543	DB04184	Sim
LbrM29_V2.2130	protein kinase, putative	2,3	3,0	protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity, protein tyrosine kinase activity, ATP binding	protein amino acid phosphorylation	null	2.7.1.37	RTKL	3321	DB02518; DB02733	Sim
LbrM30_V2.3120	valyl-tRNA synthetase, putative	-2,3	-2,5	ATP binding, nucleotide binding, valine-tRNA ligase activity, aminoacyl-tRNA ligase activity	aminoacylation, tRNA aminoacylation for protein translation	cytoplasm	6.1.1.9	J	246	DB00161	Sim
LbrM32_V2.3210	nucleoside diphosphate kinase b	-3,8	-2,1	ATP binding, nucleoside diphosphate kinase activity	CTP biosynthetic process, UTP biosynthetic process, GTP biosynthetic process	null	2.7.4.6	F	5626	DB04315	Sim
LbrM35_V2.6820	histidine secretory acid phosphatase, putative	2,7	2,3	acid phosphatase activity	null	null			1859	DB02944; DB03390; DB03577; DB03965	Sim

Figura 25: Anotação estrutural e funcional de 14 genes selecionados com base nos resultados de microarranjos de DNA genômico e cDNA, além de comparações com o banco de dados Drug\_Bank.

## 5.9. Montagem de um banco de dados de resistência a drogas em *Leishmania*:

Neste trabalho, ferramentas de biologia celular, biologia molecular e de bioinformática foram aplicadas em diferentes populações de *Leishmania* com o objetivo de identificar potenciais alvos para a quimioterapia das leishmanioses. Durante sua execução podem ser observados três momentos distintos: 1) indução de resistência a drogas e caracterização fenotípica das populações de *Leishmania* spp. selvagens e resistentes ao SbIII; 2) identificação e anotação dos genes amplificados, deletados ou diferencialmente expressos na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII; 3) comparações entre sequências de potenciais alvos para a quimioterapia em *L. (V.) braziliensis* com dados de outras espécies e com bancos de alvos para drogas.

No primeiro momento foram selecionadas 16 populações a partir de 4 espécies de *Leishmania*. De cada uma das quatro espécies foram selecionadas: uma população selvagem (WTS); uma população com resistência ao SbIII induzida *in vitro* (SbR); uma população com resistência ao SbIII induzida *in vitro* e posteriormente cultivada na ausência da droga (SbR-rev); e uma população com resistência induzida *in vitro* à AMB (AMB-R). Durante todo o processo de indução de resistência foram realizadas periodicamente curvas de tolerância ao SbIII e AMB nas populações WTS, SbR e AMBR. Ao final do processo, foram realizadas curvas de crescimento e tolerância a quatro diferentes drogas (tartarato potássico de antimônio, anfotericina B, miltefosina e paromomicina) nas populações WTS e SbR. Além disso, curvas de tolerância ao SbIII foram realizadas nas quatro populações SbR-rev. Cada ensaio foi realizado em triplicata e os resultados apresentados correspondem à média de 2 a 4 ensaios independentes. Por fim, as populações WTS e SbR foram submetidas a ensaios de infectividade em camundongos C57BL/6 nocaute para IFN- $\gamma$  (IFN-KO) e a população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII (Lb-SbR) foi submetida ao ensaio de estabilidade do fenótipo *in vivo*.

No segundo momento, as populações WTS e SbR de cada uma das quatro espécies de *Leishmania* foram utilizadas em ensaios com microarranjos de DNA de dois tipos: CGH, empregando amostras de DNA genômico, e microarranjos de cDNA. Cada microarranjo é formado por 13.311 oligonucleotídeos distintos, gerando um volume de aproximadamente 213.000 perfis de hibridização. Esses perfis foram comparados entre as populações SbR e WTS de cada espécie, porém devido à



variabilidade interespecífica das quatro espécies de *Leishmania* e da ausência do genoma de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, as sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos microarranjos foram agrupados em 12.146 contigs. Cada contig foi comparado com o genoma completo (Wholegenome) e as sequências codificantes (CDS) de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*; além do banco de dados não redundante (NR) do NCBI. Foram identificados no genoma de *L. (V.) braziliensis* 7.534 contigs; esses contigs foram selecionados e os resultados dos microarranjos de DNA genômico e cDNA nas populações selvagem e resistente ao SbIII foram comparados. Dados como cromossomo, localização, nível de expressão e descrição do produto foram extraídos para análise. Foi ainda realizada a anotação funcional dos potenciais alvos para estudos de quimioterapia e resistência a drogas, utilizando para tal os bancos de dados ENZYME e COG.

Em uma última etapa, as 252 CDS amplificadas ou deletadas em *L. (V.) braziliensis* e os 957 transcritos diferencialmente expressos foram selecionados e comparados com diferentes conjuntos de dados: 1) o perfil de hibridização das CDS selecionadas foi comparado entre as quatro espécies de *Leishmania* estudadas; 2) as sequências de aminoácidos dos transcritos selecionados foram comparadas com 4.535 sequências de aminoácidos alvos para drogas, depositadas no banco de dados Drug\_Bank e 37.391 sequências de aminoácidos do proteoma predito humano; 3) os níveis de expressão gênica dos transcritos selecionados foram comparados entre as quatro espécies de *Leishmania* e com as 252 CDS amplificadas ou deletadas em *L. (V.) braziliensis*, identificadas pelos ensaios de CGH.

Como pode ser observado, foi produzido um volume enorme dados experimentais e de resultados de análises computacionais. Como a análise manual desse volume de informação é impossível, o desenvolvimento de um banco de dados modelado adequadamente aos modelos biológico e experimental utilizados no projeto se tornou uma parte fundamental do trabalho desenvolvido. Tão fundamental que a sua inexistência inviabilizaria a integração das inúmeras camadas de informação e a conseqüente interpretação acurada dos fenômenos estudados.

Nesse contexto durante o desenvolvimento do presente trabalho foi idealizado um banco de dados relacional de potenciais alvos para estudos de quimioterapia e resistência a drogas em *Leishmania*. Para tanto utilizamos o pacote MySQL de código fonte livre [http://www.mysql.com/?bydis\\_dis\\_index=1](http://www.mysql.com/?bydis_dis_index=1) como sistema de

gerenciamento de banco de dados. A primeira etapa da montagem do banco de dados (provisoriamente denominado *Leish\_resistance*) consistiu na construção de um modelo conceitual apropriado. A partir deste ponto, o preparo dos dados e sua carga foram feitas alinhadas ao modelo construído. Assim, avaliação da integridade relacional e semântica desse banco foi feita por meio de buscas específicas. A primeira versão do banco de dados está sendo avaliada e foi construída de acordo com o modelo conceitual apresentado na Figura 26:

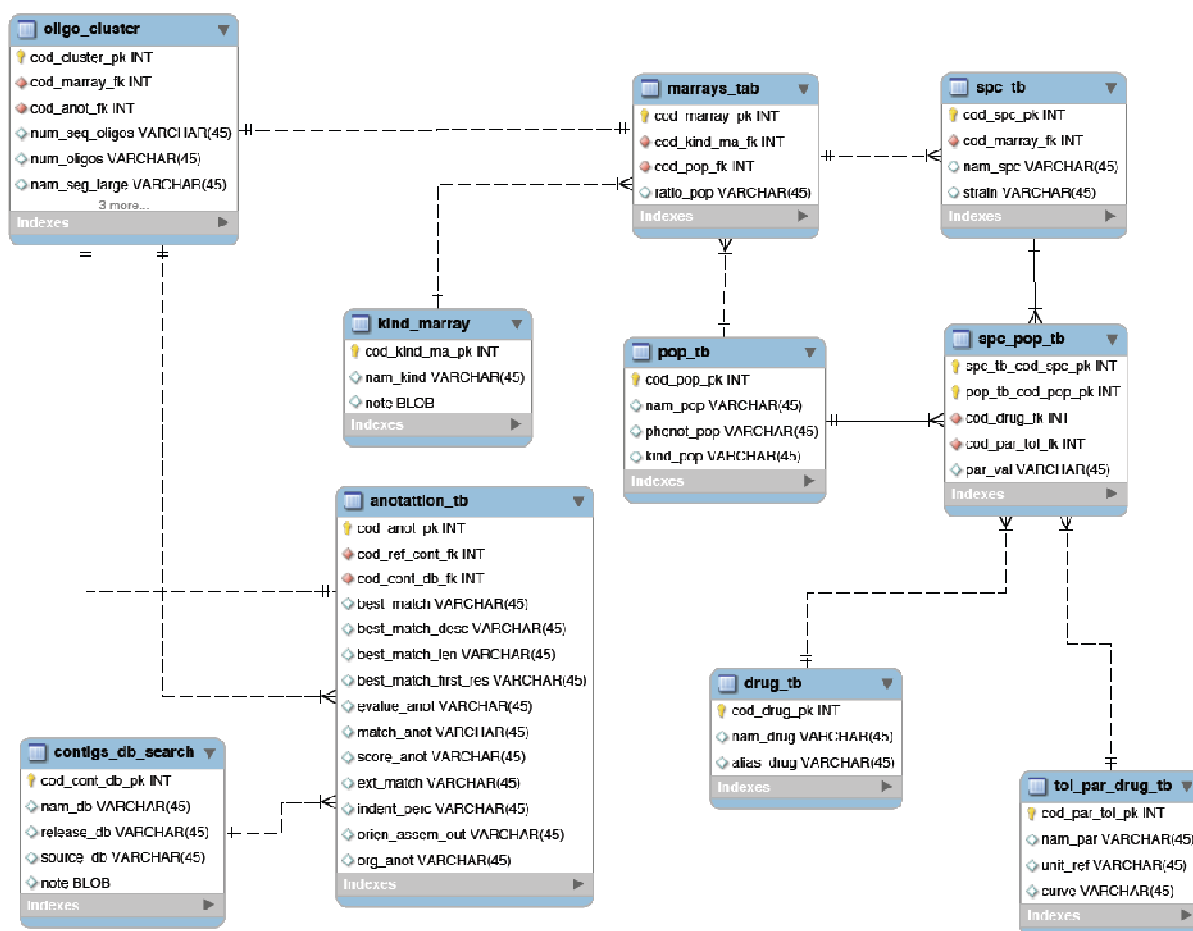


Figura 26: Modelo conceitual do banco de dados.

Conforme pode ser visto na Figura, a estrutura básica do banco de dados é formada por 10 tabelas relacionadas. Cada tabela é composta por um conjunto de dados, conforme descrição a seguir:

**spc\_tb (specie table)**: contém as informações básicas das quatro espécies de *Leishmania* estudadas, denominação da espécie e da cepa, para cada resultado de microarranjo analisado;

**pop\_tb (population table):** refere-se às 16 populações utilizadas neste trabalho, a denominação que receberam e o fenótipo básico (selvagem ou induzida *in vitro*);

**drug\_tb (drug table):** lista as drogas utilizadas neste trabalho e suas respectivas abreviaturas;

**tol\_par\_drug\_tb (tolerance parameters to drugs table):** lista os parâmetros utilizados na análise do fenótipo (IC50, coeficiente de resistência etc.) e suas respectivas unidades de medida (mg/mL, µg/mL, µM etc.);

**spc\_pop\_table (specie population table):** contém um valor correspondente à tolerância a determinada droga, para cada variável descrita nas tabelas acima. Ou seja, a tabela possui um resultado para cada parâmetro especificado na tabela tol\_par\_drug\_tb, de uma droga especificada na tabela drug\_tb, para uma população listada na tabela pop\_tb, pertencente a uma espécie presente na tabela spc\_tb;

**kind\_marray (kind of microarray):** especifica o tipo de microarranjo utilizado em determinado experimento (microarranjo de DNA genômico ou de cDNA) e alguma informação complementar relativo a estes;

**marrays\_tab (microarrays table):** contém os dados referentes aos resultados de microarranjos, segundo o tipo de microarranjo (especificado na tabela kind\_marray) e a população (especificado na tabela pop\_tb);

**oligo\_cluster (oligonucleotide cluster):** contém, para cada resultado de microarray (tabela marrays\_tab) e de anotação (tabela anotattion\_tb), os dados referentes ao agrupamento dos oligonucleotídeos em contigs. Informações como nome do contig, número de oligonucleotídeos agrupados, número de sequências reconhecidas pelo contig, nome do maior oligonucleotídeo, sequência consenso e alinhamento das sequências (links) estão carregadas nessa tabela;

**contigs\_db\_search (contigs database search):** contém as informações referentes aos bancos de dados e genomas comparados com os contigs. O nome dos bancos, versão, fonte e outras observações estão carregadas nessa tabela;

**anotattion\_table (anotation table):** contém todas as informações referentes às comparações entre os contigs listados na tabela oligos\_cluster e os bancos de dados e genomas listados na tabela contigs\_db\_search. A CDS (ou código gi) referente ao melhor resultado de cada comparação, a descrição do respectivo produto, e-value, tamanho, coordenadas entre outras informações, estão carregadas nessa tabela.

## 6. DISCUSSÃO

A ocorrência de cepas de *Leishmania* resistentes a drogas é um problema crescente em todo o mundo. Embora sejam conhecidos diversos mecanismos de resistência a drogas em *Leishmania*, poucos foram os avanços no sentido de desenvolver novas estratégias para a quimioterapia. Isso se dá, ao menos em parte, devido à diversidade genética dos parasitos do gênero *Leishmania*, e das diferentes ferramentas moleculares utilizadas na análise desses parasitos. Também é importante enfatizar que existem poucos estudos nessa área realizados com espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. A proposta deste trabalho então é analisar, utilizando diferentes ferramentas de biologia molecular, populações selvagens e com resistência induzida *in vitro* ao SbIII de quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Essa análise está focada na identificação de alvos racionais para o desenvolvimento de novas drogas, baseando-se na informação disponível em bancos de dados de domínio público bem como produzidos em nosso laboratório.

As drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses consistem em compostos baseados em antimoniais pentavalentes (SbV), como o Glucantime® e Pentostam®. No entanto, acredita-se que a forma ativa da droga é a forma trivalente (SbIII) do metal e que a redução de SbV para SbIII pode ocorrer tanto na célula hospedeira (Serenó *et al.* 1998) quanto no parasito (Shaked-Mishan *et al.* 2001). Diferente do SbV, o SbIII é ativo tanto sobre formas promastigotas quanto amastigotas, o que facilita seu uso em protocolos de indução de resistência *in vitro*. As quatro espécies de *Leishmania* utilizadas nesse trabalho (*L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*) foram escolhidas para estudo devido a sua distribuição geográfica (todas são endêmicas no Brasil), variedade de subgênero (duas espécies do subgênero *Viannia* e duas do subgênero *Leishmania*) e diversidade de síndromes clínicas que as mesmas acarretam (leishmaniose cutânea, muco-cutânea e visceral). Assim, o estudo dessas populações selvagens e resistentes aos antimoniais poderá auxiliar na compreensão das bases moleculares da resistência a estas drogas e no desenvolvimento de novos alvos para a quimioterapia.

A primeira etapa deste trabalho foi obter e caracterizar fenotipicamente as populações de *Leishmania* selvagens e resistentes ao SbIII. Devido à utilização de um grande número de populações de *Leishmania* com diferentes perfis de crescimento e tolerância a drogas, foi necessário determinar um ensaio prático para avaliar o desenvolvimento dessas culturas. O método escolhido foi o colorimétrico,

empregando o corante de viabilidade celular azul de Alamar<sup>®</sup>. Este método apresenta entre outras vantagens a rapidez e precisão na determinação do desenvolvimento celular, a possibilidade de avaliar um grande número de amostras por ensaio (empregando placas de 96 poços) e a possibilidade de acompanhar o fenômeno biológico por um período prolongado, uma vez que o azul de Alamar<sup>®</sup> não é tóxico para a célula. Devido às suas vantagens, o azul de Alamar<sup>®</sup> tem sido amplamente utilizado em estudos de citotoxicidade em parasitos (Buckner *et al.*, 1996; Aronov *et al.*, 1999; Mikus & Steverding, 2000; Fumarola *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2005; Shimony & Jaffe, 2008).

Inicialmente, procurou-se estabelecer um protocolo de cultivo comum às quatro espécies do parasito, considerando o crescimento relativo e as necessidades nutricionais de cada população. Diversos autores demonstraram que, em diferentes espécies de *Leishmania*, variações nas condições de cultivo podem interferir significativamente no crescimento (Limoncu *et al.*, 1997) e no fenótipo de resistência a drogas (Moreira *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2001). Nas condições de cultivo descritas nesse trabalho, observou-se claramente uma distinção entre parasitos do subgênero *Leishmania* e do subgênero *Viannia*. Populações pertencentes ao subgênero *Leishmania* cresceram a uma taxa cerca de 50% mais rápido e apresentaram uma tolerância ao SbIII de 1,9 a 3,7 X maior que as populações do subgênero *Viannia*. Isso pode ser conseqüência de uma maior taxa de multiplicação celular e do metabolismo geral da célula.

Analisando as curvas de crescimento dos parasitos (Figura 4) logo após um repique, observa-se um período inicial de adaptação dos parasitos às novas condições de cultivo, seguido de um momento de crescimento exponencial da curva, que representa a fase de intensa multiplicação celular dos parasitos cultivados *in vitro*. Essa fase é ideal para a determinação das curvas de tolerância a drogas. O terceiro momento apresentado nas curvas corresponde à fase estacionária do cultivo celular, porém no ensaio empregando o azul de Alamar<sup>®</sup> é necessário enfatizar algumas questões: o azul de Alamar<sup>®</sup> ao ser adicionado à cultura encontra-se em um estado oxidado e a avaliação do desenvolvimento dessa cultura é feita indiretamente por meio do percentual de redução do corante. A redução ocorre no interior de células vivas e é proporcional à sua quantidade. Portanto se uma cultura entra em fase estacionária, ela reduz significativamente a multiplicação celular, sendo observado um perfil linear na curva de crescimento. O percentual de azul de

Alamar® reduzido aumentará até sua completa redução, tornando-se constante a partir deste ponto.

Curiosamente, *L. (V.) braziliensis* apresentou um perfil de crescimento diferente das demais espécies. Esta população apresentou um crescimento acelerado nas primeiras 24 horas de cultivo, seguida de uma redução nessa taxa de crescimento nas 24 horas seguintes. Embora esse resultado não fosse esperado, as curvas de crescimento foram repetidas e apresentaram resultados semelhantes. Da mesma forma, analisando as curvas de tolerância ao SbIII, verifica-se uma susceptibilidade maior da população de *L. (V.) guyanensis* à droga, em relação às demais populações. Essa alta sensibilidade do parasito à droga pode ser constatada não somente pela análise do IC50, mas também pelo coeficiente de decaimento da curva correspondente. As curvas de tolerância a drogas foram construídas a partir de um modelo de regressão conhecido como dose-resposta sigmoidal, que tem sido amplamente utilizado em ensaios de tolerância a drogas (Decuypere *et al.*, 2005; Seifert & Croft, 2006). Os ensaios com *L. (V.) guyanensis* apresentaram em média valores de “p” muito abaixo da curva sigmoidal padrão ( $p = -1$ ) e dos resultados observados para *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (-8,1, -3,4 e -8,2 respectivamente – dados não mostrados). Valores baixos de “p” indicam que o crescimento das culturas cai significativamente a partir de alterações mínimas na concentração da droga. Dessa forma, para construir um protocolo de indução de resistência a drogas comum às quatro espécies, foi necessário considerar não apenas a concentração inicial da droga adicionada à cultura, mas o tempo necessário para a adaptação de *L. (V.) guyanensis* a uma nova condição de cultivo.

O processo de indução de resistência ao SbIII foi conduzido ao longo de 18 meses por cultivo na presença de concentrações gradativamente maiores da droga. Embora o protocolo de indução de resistência tenha sido o mesmo para as quatro espécies, cada uma apresentou graus diferentes de tolerância ao SbIII. Os coeficientes de resistência das diferentes populações induzidas variaram de 4 a 20 vezes mais resistentes, comparadas às suas respectivas populações selvagens. Os coeficientes de resistência das populações pertencentes ao subgênero *Viannia* (19 e 20 vezes) foram maiores que os de populações do subgênero *Leishmania* (4 a 6 vezes). Porém é importante destacar que o IC50 das populações *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* resistentes ao SbIII são aproximadamente iguais (1,6  $\mu$ M, 1,7  $\mu$ M e 1,4  $\mu$ M, respectivamente). Portanto a

maior diferença está na tolerância das populações selvagens. O IC50 da população induzida de *L. (V.) braziliensis* foi de 3,0 µM; essa foi a única população a apresentar uma tolerância ao SbIII próxima da concentração máxima da droga administrada às culturas (4,0 µM). Concentrações maiores que 4 µM, o SbIII precipita no meio de cultura.

Outro resultado interessante diz respeito à estabilidade do fenótipo de resistência ao SbIII. As populações de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) infantum chagasi* resistentes ao SbIII mantiveram o fenótipo de resistência (1,6 µM e 1,4 µM, respectivamente) mesmo após 37 passagens de cultivo na ausência da droga. Porém o IC50 das populações resistentes de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foi reduzido à metade (1,5 µM e 0,8 µM, respectivamente). Esse fenótipo de resistência ao SbIII das 4 espécies de *Leishmania* permaneceu estável por mais 10 passagens na ausência de drogas, totalizando portanto 47 passagens na ausência do SbIII. Esses resultados podem estar associados a diferentes mecanismos de resistência pré-transcricionais (amplificação e deleção gênicas) ou pós-transcricionais (expressão gênica diferencial) nas diferentes espécies de *Leishmania* (Beverley, 1991; Guimond *et al.*, 2003; Ubeda *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram descritos em populações de *L. (L.) tarentolae* resistentes ao SbIII (Haimeur *et al.*, 2000). Essas populações foram mantidas por 30 a 100 passagens na ausência da droga, tendo sido observado uma diminuição de 5 a 10 vezes nos níveis de resistência.

Neste trabalho, nenhuma das populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII apresentou resistência cruzada à anfotericina B ou ao miltefosina. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a ausência de resistência cruzada entre antimoniais e anfotericina B (Sundar *et al.* 2000; Sereno *et al.* 2000; Thakur *et al.* 2008) bem como entre antimoniais e miltefosina (Seifert *et al.*, 2003). A ausência de resistência cruzada sugere a existência de mecanismos distintos de resistência a essas drogas, e que o uso conjunto de antimoniais e anfotericina B ou miltefosina pode ser uma alternativa na prevenção do surgimento de resistência. Nesse sentido, estudos de interação entre o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e miltefosina mostraram sinergismo *in vitro*, porém não correlacionado com o efeito *in vivo* (Seifert & Croft, 2006). Diferente dos antimoniais, os mecanismos de resistência à anfotericina B e ao miltefosina envolvem, pelo menos em algumas espécies de *Leishmania*, alterações na fluidez da membrana, nos ácidos graxos e no metabolismo de esteróis (Mbongo *et al.*, 1998; Al-Mohammed *et al.*, 2005;



Rakotomanga *et al.*, 2005). Vale ressaltar que, a superexpressão de transportadores ABC têm sido amplamente estudada em populações de *Leishmania* resistentes a múltiplas drogas (Sauvage *et al.*, 2009), inclusive miltefosina (Perez-Victoria *et al.*, 2001).

Nossos resultados mostram que as populações de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* resistentes ao SbIII foram também resistentes à paromomicina. A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que induz uma redução no potencial de membrana e inibição da síntese protéica. Esse mecanismo de ação encontra-se diminuído em populações resistentes à paromomicina, comparado com populações selvagens (Jhingran *et al.*, 2009). Estudos sugerem que a glicólise, síntese protéica e produção de tripanotiona são potenciais alvos para o SbIII em *Leishmania* (Wyllie *et al.*, 2004). Assim, nossos resultados sugerem que os mecanismos de resistência à paromomicina e ao SbIII podem ser similares em três das quatro espécies de *Leishmania* analisadas. *L. (V.) guyanensis* pode apresentar um mecanismo de resistência a drogas distinto das demais, uma vez que não apresentou resistência cruzada a paromomicina.

Os ensaios de avaliação da infectividade e estabilidade do fenótipo *in vivo* mostraram uma drástica diminuição na infectividade das populações resistentes ao SbIII de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Dessa forma, o fenótipo de resistência a drogas pode ser associado a uma diminuição na infectividade dessas populações. Este fenômeno foi previamente observado em populações de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) mexicana* resistentes à anfotericina B (Mbongo *et al.*, 1998; Al-Mohammed *et al.*, 2005), *L. (L.) mexicana* resistente à glibenclamida (Garcia *et al.*, 2000), *L. (V.) guyanensis* resistente ao Glucantime<sup>®</sup> (Gazola *et al.*, 2001) e *L. (L.) donovani* resistente à sitamaquina (Bories *et al.*, 2008).

Diversos estudos demonstraram que, quando um patógeno adquire resistência a uma droga, ele freqüentemente paga um preço em termos de redução na sua virulência ou capacidade de replicação (Lenski, 1998; Geretti, 2005). Este conceito é conhecido na literatura como “fitness cost”. Mutações que conferem resistência a drogas em patógenos comumente acarretam em uma perda adaptativa, também definida como “proficiência” (Natera *et al.*, 2007). Esses mutantes resistentes podem desse modo ser substituídos por formas selvagens se a pressão da droga for removida (Walliker *et al.*, 2005). Em *Plasmodium chabaudi*, um mutante resistente à pirimetamina cresce mais lentamente em camundongos do que seu progenitor sensível. Entretanto após passagens na ausência da droga, os parasitos

resistentes crescem mais rápido, sugerindo a ocorrência de mutações compensatórias (de Roode *et al.*, 2004). Mutações compensatórias também estão presentes em outros parasitos resistentes a drogas, como *P. falciparum* resistente à cloroquina (Hayward *et al.*, 2005) e *Toxoplasma gondii* resistente à dinitroanilina (Ma *et al.*, 2008). Em *Leishmania*, diversas modificações fisiológicas estão associadas com resistência a drogas e podem servir como marcadores de proficiência nesses parasitos (Natera *et al.*, 2007). Diversos trabalhos demonstram uma diminuição na expressão de importantes fatores de virulência em populações de *Leishmania* resistentes a drogas. Em uma população de *L. (L.) mexicana* resistente à glibenclamida foi observada uma redução na infectividade e nas atividades de fosfatase ácida e piruvato quinase (Garcia *et al.*, 2000). Alterações na fluidez da membrana, metabolismo de lipídios e na expressão de lipofosfolípidos foram observadas em populações de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) donovani* resistentes à pentamidina (Basselin & Robert-Gero, 1998). Além disso, mudança no padrão de reconhecimento de lectinas está associada com uma redução na infectividade em populações de *L. (V.) guyanensis* resistentes ao Glucantime<sup>®</sup> (Gazola *et al.*, 2001). Na prática, a proficiência ou “fitness cost” poderia ser utilizada como uma estratégia no combate às Leishmanioses. Parasitos resistentes a drogas comumente apresentam menor adaptabilidade comparados aos tipos selvagens. Se a pressão seletiva com determinada droga for removida (com a introdução de outra droga, por exemplo) os parasitos sensíveis podem crescer e eliminando os resistentes. Entretanto essa hipótese precisaria ser investigada cuidadosamente uma vez que mutações compensatórias poderiam eventualmente restaurar a adaptabilidade das populações resistentes.

É importante destacar que, além da indução de resistência ao SbIII, neste trabalho buscou-se induzir resistência *in vitro* à anfotericina B, metotrexato e paromomicina em populações derivadas das mesmas quatro espécies de *Leishmania* estudadas. Essas populações resistentes poderiam futuramente ser utilizadas em estudos visando compreender melhor os mecanismos de resistência a diferentes drogas em determinada espécie de *Leishmania* ou entre diferentes espécies. Logo no início do trabalho os resultados obtidos com o metotrexato e paromomicina não se mostraram promissores e por esse motivo foram descontinuados. Por outro lado, os processos de indução de resistência ao SbIII e à anfotericina B foram eficientes.

É importante destacar que os processos de seleção de resistência ao SbIII e anfotericina B foram distintos. A primeira diferença é que não foi observada nas

populações selvagens qualquer correlação entre tolerância à anfotericina B e subgênero de *Leishmania*. Pelo contrário, as populações das quatro espécies de *Leishmania* estudadas apresentaram praticamente o mesmo valor de IC50 para anfotericina B (0,1 µg/ml). O perfil das curvas de tolerância à anfotericina B é semelhante nas quatro populações selvagens. Com relação à indução de resistência a anfotericina B, trabalhos anteriores relatam o isolamento de populações de *Leishmania* resistentes através do cultivo na presença de concentrações gradualmente maiores da droga (Mbongo *et al.*, 1998; Al-Mohammed *et al.*, 2005). Em nosso estudo, a seleção de parasitos resistentes só foi possível pelo uso de altas concentrações da droga (inicialmente o IC90) seguida de vários repiques sem anfotericina B, para a recuperação das culturas. Utilizando esse protocolo, as populações selecionadas foram apenas 2 a 3 vezes mais resistentes à anfotericina B do que seus respectivos pares selvagens; porém apresentaram uma maior tolerância a variações na concentração da droga (representada pela significativa mudança no coeficiente de decaimento – “p”).

Populações de *Leishmania* resistentes a drogas leishmanicidas como Glucantime® (Arana *et al.*, 1998), anfotericina B (Mbongo *et al.*, 1998), SbIII (Haimeur *et al.*, 2000), miltefosina (Seifert *et al.*, 2003) e sitamaquina (Bories *et al.*, 2008) foram previamente obtidas *in vitro* utilizando a metodologia de concentração crescente de droga similar ao nosso estudo para obtenção de resistência ao SbIII. A análise dessas populações resistentes tem levado os autores a propor modelos para a resistência. Entre os mecanismos sugeridos para resistência ao SbIII estão a diminuição no acúmulo da droga (Brochu *et al.*, 2003), aumento nos níveis de tripanotona (Haimeur *et al.*, 2000) e amplificação do gene do transportador ABC *PgpA* (El Fadili *et al.* 2005). Entretanto existem relativamente poucos estudos de resistência a drogas em espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. A primeira etapa desse trabalho foi necessariamente longa e bem sucedida, uma vez que foi possível o isolamento de populações resistentes ao SbIII e à anfotericina B das quatro espécies de *Leishmania* estudadas. Diferenças significativas entre as quatro espécies de *Leishmania* foram observadas no coeficiente de resistência, estabilidade do fenótipo de resistência, resistência cruzada e na avaliação do fenótipo *in vivo*. Assim, a análise genômica e transcricômica destas amostras de *Leishmania* resistentes ao SbIII poderá fornecer dados importantes sobre a resistência dessas populações aos antimoniais e de possíveis alvos para a

quimioterapia. Os estudos moleculares realizados neste trabalho e suas perspectivas serão discutidos a seguir.

A segunda parte desse trabalho consistiu na análise genômica e transcriptômica de quatro espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII enfatizando a análise da espécie *L. (L.) braziliensis*. As análises genômicas e transcriptômicas dessas populações foram realizadas a partir de dados de microarranjos de DNA e consistiram basicamente em: montagem e identificação dos oligonucleotídeos utilizados, identificação dos produtos de expressão diferencial, busca de padrões correlacionáveis com resistência a drogas e organização dos dados. Os microarranjos de DNA têm sido extensivamente utilizados em *Leishmania* no estudo de padrões de expressão gênica diferencial durante o ciclo de vida do parasito (Saxena *et al.*, 2003; Akopyants *et al.*, 2004; Duncan *et al.*, 2004; McNicoll *et al.*, 2006; Leifso *et al.*, 2007; Srividya *et al.*, 2007; El Fadili *et al.*, 2008), análises comparativas entre *L. major* e *L. infantum* (Rochette *et al.*, 2008) bem como em análises dos mecanismos de resistência a drogas (Guimond *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2007; Ubeda *et al.*, 2008). Devido ao grande volume de informações produzidas pelos microarranjos de DNA, este trabalho procurou destacar as modificações moleculares detectadas em *L. (V.) braziliensis* e a partir destas, correlacioná-las com as demais espécies de *Leishmania*. Porém vale ressaltar que todos os dados produzidos em relação às quatro espécies estão devidamente armazenados em um banco de dados para posterior análise.

Os microarranjos de DNA consistem em uma tecnologia de análise molecular em larga escala em que centenas a milhares de genes são representados por oligonucleotídeos dispostos em lâminas de vidro em um arranjo pré-determinado, denominado “biochip”. Cada oligonucleotídeo é sintetizado a partir de seqüências conhecidas de DNA e hibridizado com amostras de cDNA ou gDNA marcadas com corantes específicos e com troca de corantes (dye-swap). Neste trabalho os microarranjos de DNA foram empregados em duas abordagens distintas: 1) para o estudo genômico dos parasitos, foi utilizada uma metodologia de análise denominada CGH (*Comparative Genomic Hybridization*). Nela, a hibridização do “biochip” ocorre com fragmentos de DNA genômico das amostras em análise. A técnica de CGH permite observar ampliações ou deleções gênicas associadas a determinado processo biológico. 2) para a análise transcriptômica o “biochip” é hibridizado com amostras de cDNA marcadas, permitindo uma visão global da

expressão de genes e indicando aqueles diferencialmente expressos em determinadas condições.

O primeiro desafio nessa etapa do estudo foi identificar corretamente os genes reconhecidos pelos oligonucleotídeos nas diferentes espécies de *Leishmania* em estudo. É importante observar que, em todos os ensaios de microarranjos de DNA genômico ou cDNA das quatro espécies de *Leishmania*, as amostras foram hibridizadas com as mesmas seqüências de oligonucleotídeos, sintetizadas tendo como referência o genoma de *L. (L.) major* e poucas seqüências específicas de *L. (L.) tarentolae* e *L. (L.) infantum chagasi*. Portanto, antes da análise das populações selvagens e resistentes a drogas, foi necessário identificar quais genes poderiam hibridizar com os oligonucleotídeos em cada espécie de *Leishmania*. Essa identificação foi realizada em duas etapas: 1) os oligonucleotídeos foram recuperados a partir dos dados de hibridização com os microarranjos e aqueles com seqüências similares foram agrupados em seqüências consenso (contigs). Essa etapa visou reduzir a ocorrência de dados redundantes ou pouco significativos (como dois oligonucleotídeos que reconhecem um mesmo produto ou produtos contendo pequenos polimorfismos que conferem especificidades distintas a cada oligonucleotídeo). 2) foram comparadas as seqüências consenso dos oligonucleotídeos com o genoma de cada espécie estudada. Dessa forma foi possível a identificação dos genes de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis* que hibridizam com os oligonucleotídeos no microarranjo. Porém, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* ainda não possuem genoma publicado, limitando nosso poder de análise nessas espécies. Nesse caso, as seqüências consenso foram comparadas com os três genomas publicados de *Leishmania* (*L. (L.) major*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*). Para a análise de resistência a drogas, foram considerados apenas os oligonucleotídeos que reconhecem produtos conservados nas três espécies, pressupondo que estes provavelmente também são conservados em *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

Diferentes critérios de exclusão de seqüências foram aplicados durante a montagem das seqüências consenso e identificação dos contigs. O primeiro desses critérios foi a seleção apenas dos oligonucleotídeos desenhados a partir do genoma de nuclear de *L. (L.) major*. Essa seleção foi necessária porque, conforme dito anteriormente, alguns oligonucleotídeos foram sintetizados a partir de seqüências de maxi-círculos, bem como seqüências específicas de *L. L tarentolae* e *L. (L.) infantum chagasi*. Tais oligonucleotídeos necessitam de uma abordagem diferente de análise

e por esse motivo foram retirados para uma análise posterior. Um segundo critério aplicado foi a extensão mínima de 60 nucleotídeos de alinhamento entre os oligonucleotídeos e o genoma nuclear de *L. (L.) major*, aumentando assim a especificidade das seqüências a serem analisadas. Desse modo, 63 oligonucleotídeos foram excluídos durante a fase de montagem das seqüências consenso. Por último, as comparações das seqüências consenso com as seqüências genômicas de *Leishmania* e com o banco de dados “NR” serviram de base para a definição de quais contigs seriam analisados em cada etapa da pesquisa. É importante destacar que todas as seqüências consenso foram identificadas no genoma nuclear de *L. (L.) major*, porém nem todas correspondem a CDS anotadas no genoma. Vale lembrar ainda que, neste trabalho, serão analisadas apenas as seqüências consenso identificadas em *L. (V.) braziliensis*; as demais seqüências estão armazenadas em um banco de dados e será objeto de estudos futuros.

Ao todo foram obtidas 12.146 seqüências consenso distintas, das quais 11.446 hibridizam com CDS de *L. (L.) major*, 10.919 hibridizam com CDS de *L. (L.) infantum chagasi* e 7.534 hibridizam com CDS de *L. (V.) braziliensis*. Dados recentes do genoma dessas três espécies, publicados no “TriTrypDB” versão 2.0 (<http://www.tritrypdb.org>) porém, mostram um total de 8.408 CDS anotadas no genoma de *L. (L.) major*, 8.216 no genoma de *L. (L.) infantum chagasi* e 8.310 CDS anotadas no genoma de *L. (V.) braziliensis*. Essa discrepância se dá em função de três fatores: 1) algumas seqüências consenso, embora distintas, reconhecem uma mesma CDS. Tais seqüências foram ao longo deste trabalho tratadas como duplicações em termos de resultado. Por exemplo, das 11.446 seqüências consenso identificadas no genoma de *L. (L.) major*, 8.094 reconhecem CDS distintas. Em *L. (V.) braziliensis* esse total foi de 5.804 seqüências, as demais são duplicações. 2) uma seqüência consenso pode reconhecer duas ou mais CDS distintas. Situações desse tipo precisam ser analisadas individualmente, pois CDS distintas podem representar genes duplicados, divergentes ou não, ou ainda representar genes distintos com um ou mais motivos em comum. 3) Nem todas as CDS anotadas no genoma foram reconhecidas pelas seqüências consenso. Para verificar essa possibilidade seria necessário analisar todos os resultados (seqüências identificadas) de cada uma das comparações feitas por BLAST, o que não é objetivo deste trabalho.

Em *Leishmania*, o fenótipo de resistência a drogas têm sido freqüentemente associado a eventos de amplificação e/ou deleção gênica (Beverley, 1991; Borst & Ouellette, 1995; Ubeda *et al.*, 2008). Uma explicação para isso está no fato de *Leishmania* apresentar pouca regulação ao nível de iniciação da transcrição (Clayton, 2002). No entanto é importante observar que nem todas as alterações genéticas detectadas nestes parasitos resistentes estão associadas ao fenótipo de resistência a drogas. De fato, muitas das amplificações observadas em parasitos resistentes envolvem moléculas de DNA de função desconhecida e que não estão associadas a nenhum fenótipo. É razoável pensar que os eventos de amplificação e deleção genética ocorram ao acaso e, dessa forma, algumas das alterações observadas tenham um efeito fenotípico “neutro” no que diz respeito à resistência ao SbIII, outras representam mutações compensatórias e somente uma pequena porção destas esteja de fato associada à resistência a drogas (Beverley, 1991; Ponte-Sucre, 2003; Natera *et al.*, 2007; Ubeda *et al.*, 2008).

Em nosso trabalho, foram identificadas 252 CDS cujo número de cópias se encontra alterado (amplificado ou deletado) na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII. O estabelecimento de uma correlação entre essas CDS e o fenótipo de resistência a drogas poderia ser realizado empregando técnicas de deleção ou superexpressão dos respectivos genes alterados. Porém essas técnicas em geral são caras, demandam bastante tempo e podem em muitos casos produzir resultados insatisfatórios. Dessa forma, estudos *in silico* estabelecendo critérios de seleção das alterações genéticas e buscando padrões moleculares podem direcionar a análise para aqueles genes mais provavelmente associados ao fenótipo em estudo. Nesse contexto, uma estratégia inicial seria selecionar as CDS mais amplificadas ou deletadas (partindo do pressuposto de que as mesmas teriam maior implicação na mudança do fenótipo) e paralelamente buscar um padrão cromossômico de mudança.

A maioria das CDS alteradas codifica proteínas hipotéticas, sendo necessária a caracterização molecular desses produtos para uma maior compreensão do seu papel no fenótipo de resistência a drogas. É notório que, entre as CDS amplificadas com maior número de cópias, encontram-se diversos genes possivelmente associados ao fenótipo de resistência a drogas que foram previamente estudados por outros autores. Estes genes incluem: a) genes localizados na região H e associados à resistência a diferentes drogas em *Leishmania*. Podemos citar os genes, pteridina redutase, argininosuccinato sintase,

proteína de resistência à Terbinafina, proteína de resistência a múltiplas drogas (Nare *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009; Guimond *et al.*, 2003; Drummelsmith *et al.*, 2003; Gourley *et al.*, 2001; El Fadili *et al.*, 2009; Marchini *et al.*, 2003; Ellenberger & Beverley, 1989); b) transportadores ABC também associados ao fenótipo de resistência, p-glicoproteína E (Gamarro *et al.*, 1994) e a proteína de resistência a múltiplas drogas já mencionada; c) genes associados à diferenciação celular e proficiência, porém não está claro seu envolvimento com resistência a drogas, fosfoglicano-beta-1,3-galactosiltransferase 2, antígeno de superfície, proteína associada ao citoesqueleto e proteína associada à calmodulina (Butcher *et al.*, 1996; Basselin & Robert-Gero, 1998; Melville *et al.*, 1998; Dobson *et al.*, 2006; Ouakad *et al.*, 2007; Rochette *et al.*, 2008). Entre as CDS identificadas nesse trabalho cujo número de cópias na população de *Leishmania* resistente ao SbIII é pelo menos 4 vezes menor que o da população selvagem, não foram encontrados estudos prévios associando as mesmas ao fenótipo de resistência a drogas.

Nossos resultados sugerem que os eventos de amplificação ou de deleção de genes ocorreram ao acaso nas populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII. As CDS alteradas estão amplamente distribuídas em todos os cromossomos do parasito e a ocorrência de CDS adjacentes amplificadas está limitada aos genes da região H e outras poucas regiões. Um padrão comumente encontrado nas CDS alteradas é a presença de trilhas polipirimidina flanqueando essas seqüências. Essas repetições de citosina e timina provavelmente estão associadas à estabilidade do mRNA, “trans-splicing” e tradução (Curotto de Lafaille *et al.*, 1992; Orlando *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008; David *et al.*, 2010). Porém deve-se ressaltar que a presença dessas repetições é comum mesmo entre CDS inalteradas nos parasitos resistentes, tendo assim baixa correlação com o fenótipo de resistência. Por outro lado, a distribuição das trilhas polipirimidina poderia justificar as amplificações ao acaso e conseqüentemente a seleção das mutações de efeito vantajoso ou neutro para o parasito.

A amplificação da região H na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII é outra questão importante. Diversos autores demonstraram que amplificações dessa região estão associadas ao fenótipo de resistência a diferentes drogas em *Leishmania*, comumente originando moléculas de DNA extracromossomal lineares ou circulares (Beverley, 1991; Grondin *et al.*, 1993; Olmo *et al.*, 1995; Grondin *et al.*, 1998; Kündig *et al.*, 1999; Mukherjee *et al.*, 2007). Por outro lado, Dias e colaboradores (2007) não observaram tais amplificações em populações de *L. (V.)*



*braziliensis* selecionadas pelo fenótipo de resistência a diferentes drogas. Os autores sugerem que a organização de seqüências repetitivas intergênicas pode estar associada à ausência de amplificações da região H nesta espécie. Neste trabalho foi observada a amplificação de 11 CDS localizadas em uma região de aproximadamente 44 kb e que contém genes da região H de *Leishmania*. É importante observar que nas CDS amplificadas inclui-se um pseudogene de *L. (V.) braziliensis* (argininosuccinato sintase), e que das quatro espécies de *Leishmania* estudadas, somente *L. (V.) braziliensis* apresentou essa região amplificada. Assim, embora a metodologia empregada não permita determinar a natureza das amplificações, se foram originadas moléculas extracromossomais lineares ou circulares, nossos resultados reforçam a idéia de que a resistência a drogas em *Leishmania* pode ser mediada por amplificações genéticas ao acaso e que populações distintas do parasito podem apresentar diferentes mecanismos de resistência. Dessa forma, a busca por novos alvos para a quimioterapia das leishmanioses, baseada na identificação de CDS com maior número de cópias, diferiu significativamente da análise de CDS e produtos da expressão gênica comuns a diferentes espécies.

A análise de expressão gênica diferencial permitiu a identificação de 957 transcritos diferencialmente expressos nas populações de *L. (V.) braziliensis* selvagens e resistentes ao SbIII. Logo no início da análise, foi necessária a exclusão de quatro grupos de transcritos: 1) transcritos sem diferença de expressão; 2) transcritos não analisados (grupo NA) e que, portanto podem ser diferencialmente expressos ou não; 3) transcritos mais ou menos expressos em uma das populações e reconhecidos por mais de uma seqüência consenso (nesse caso somente um dos resultados foi considerado); 4) transcritos reconhecidos por mais de uma seqüência consenso e que sugerem aumento de expressão nas duas populações. Este último grupo pode representar um problema para a análise de microarranjos de DNA, pois os oligonucleotídeos hibridizam com distintas regiões do transcrito e que podem apresentar diferentes afinidades pela molécula, falseando assim os resultados.

Assim como as CDS identificadas pelo CGH, os transcritos diferencialmente expressos identificados pelos microarranjos de cDNA estão amplamente distribuídos no genoma do parasito e a grande maioria apresenta um pequeno, porém significativo aumento no nível de expressão (até 3 X). Inicialmente foram selecionados todos os transcritos com o nível de expressão pelo menos cinco vezes maior em uma das populações de *L. (V.) braziliensis*. Esse alto ponto de corte

restringiria a análise a apenas 65 transcritos, facilitando um estudo mais detalhado dos mesmos. Porém após algumas comparações com os demais resultados, verificou-se uma baixa correlação entre os transcritos selecionados e os dados obtidos de CGH, bem como entre os transcritos identificados em *L. (V.) braziliensis* e nas outras três espécies de *Leishmania* estudadas. Dessa forma, assumindo que transcritos com uma diferença de expressão de pelo menos duas vezes podem condicionar uma diferença fenotípica significativa, e que transcritos diferencialmente expressos em várias espécies de *Leishmania* são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas, independentemente do nível de expressão, optamos neste trabalho por analisar todos os transcritos com um aumento na expressão de pelo menos duas vezes.

A anotação funcional dos 957 transcritos diferencialmente expressos teve por objetivo principal a identificação de mecanismos, enzimas ou vias metabólicas que possam ser utilizadas estrategicamente na quimioterapia das leishmanioses. Nesse contexto, um dado importante obtido a partir das comparações com o banco de dados ENZYME foi a identificação de transcritos cujo aumento de expressão foi observado em populações distintas e que, no entanto foram reconhecidos por uma mesma enzima do banco de dados. É importante observar que seqüências consenso que reconhecem um mesmo transcrito foram tratadas como dados duplicados e desconsiderados; porém essa análise foi baseada na localização genômica dos transcritos correspondentes. Assim, transcritos originados de CDS distintas foram tratados como dados independentes, mesmo se codificassem um mesmo produto. A análise com o banco de dados ENZYME auxiliou na identificação desses produtos, limitando o estudo a transcritos que codificam enzimas diferentes.

Das três grandes categorias funcionais definidas no COG: 1) processamento e armazenamento de informação, 2) metabolismo e 3) processos celulares e sinalização, as duas primeiras apresentaram maiores diferenças nas freqüências dos transcritos diferencialmente expressos na população resistente de *L. (V.) braziliensis*. A organização dos transcritos em categorias funcionais baseadas no COG sugere um aumento na expressão de transcritos associados aos mecanismos genéticos de transcrição, replicação, recombinação e reparo; bem como uma diminuição na expressão de transcritos associados ao metabolismo de lipídios. Essas vias metabólicas têm sido alvo de alguns estudos recentes de quimioterapia e resistência a drogas e precisam ser mais bem investigadas (Gallego *et al.*, 2005; Rakotomanga *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2007; Datta *et al.*, 2008; Sauvage *et al.*,

2009). Um aumento na frequência de transcritos associados ao metabolismo e transporte de aminoácidos foi observado tanto entre os transcritos mais expressos quanto entre os menos expressos, comparando com a distribuição geral dos transcritos identificados em *L. (V.) braziliensis*. Esse resultado pode indicar mudanças no metabolismo de aminoácidos específicos. Embora a maioria dos mecanismos de resistência a drogas previamente identificados em *Leishmania* estejam associados principalmente a proteínas citoplasmáticas e associadas à membrana (conforme revisado por Croft *et al.*, 2006 e Ashutosh *et al.*, 2007), nossos resultados enfatizam a contribuição das proteínas nucleares para o fenótipo de resistência a drogas e sugerem um deslocamento da atividade biológica no sentido de reduzir as modificações pós-traducionais e aumentar os mecanismos de replicação, recombinação e transcrição nas populações estudadas.

As comparações com os bancos de dados de alvos para drogas e com o proteoma predito humano tiveram por objetivo identificar entre os transcritos diferencialmente expressos, produtos que alternativamente poderiam ser utilizados na quimioterapia experimental das leishmanioses, associados ou não às drogas já empregadas. É importante observar que o banco de dados mencionado, Drug\_Bank, relaciona seqüências alvo para diferentes moléculas: aminoácidos, coenzimas, vitaminas, ácidos graxos e drogas utilizadas na quimioterapia de diversas doenças. Muitas dessas moléculas são essenciais para o homem enquanto outras podem ser tão tóxicas ao hospedeiro humano quanto ao parasito. Assim, o estudo de proteínas com potencial uso na quimioterapia deve estar associado a uma análise de similaridade entre tais proteínas no parasito e no homem. Pensando nisso, foram comparadas as seqüências de aminoácidos correspondentes aos transcritos diferencialmente expressos e o proteoma predito humano. Foram identificadas 494 transcritos diferencialmente expressos cujas proteínas apresentaram pouca ou nenhuma similaridade com proteínas humanas, 15 destas com seqüências alvo identificadas no banco de dados Drug\_Bank. Embora algumas dessas 15 proteínas estejam associadas à infectividade e virulência de *Leishmania* spp. (Kleczka *et al.*, 2007; Eschenlauer *et al.*, 2009; Shakarian *et al.*, 2010), não é do nosso conhecimento a existência de estudos prévios de quimioterapia ou resistência a drogas envolvendo tais proteínas.

Considerando o nível de expressão, observa-se uma correlação relativamente baixa entre os transcritos diferencialmente expressos de *L. (V.) braziliensis* com as outras três espécies de *Leishmania* estudadas. Dos 957

transcritos selecionados de *L. (V.) braziliensis*, 347 (36%) apresentaram aumento de expressão significativo na população resistente de uma espécie e na população selvagem de outra. Esse resultado sugere que tais transcritos possuam efeito fenotípico neutro, embora alguns transcritos possam estar associados a mecanismos específicos de determinadas espécies de *Leishmania*. Além disso, 543 transcritos (57%) apresentaram expressão genética diferencial apenas em *L. (V.) braziliensis* e apenas 67 transcritos (7%) foram mais ou menos expressos na população resistente de mais de uma espécie. Este último grupo é de particular interesse, pois, numa perspectiva otimista, pode conter alvos racionais para a quimioterapia das leishmanioses independente da espécie de *Leishmania*.

É importante observar que, salvo poucas exceções, os 67 transcritos mencionados acima não correspondem aos transcritos com maior nível de expressão (5X) anteriormente selecionados. Este dado reforça a idéia de que os transcritos com maior nível de expressão gênica diferencial não necessariamente são os melhores alvos para estudos de quimioterapia e resistência a drogas em *Leishmania*. Nos transcritos diferencialmente expressos em três das quatro espécies estudadas, o nível de expressão variou de 2 a 7 vezes entre populações selvagens e resistentes ao SbIII. Entre os produtos de expressão encontram-se cisteíno-peptidases (identificadas como importantes fatores de virulência – Bryson *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009), proteínas associadas à transcrição e processamento do RNA, quinases e proteínas associadas à resistência a diferentes drogas, previamente estudadas: pteridina redutase, proteína de resistência ao estibogluconato de sódio e argininosuccinato sintase (Nare *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009; Guimond *et al.*, 2003; Drummel-Smith *et al.*, 2003; El Fadili *et al.*, 2009). Um dado interessante observado foi a diminuição na expressão de uma apurina/apirimidina endonuclease-proteína redox, também conhecida como AP endonuclease (LbrM16\_V2.0670), em *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Tabela 19). AP endonucleases são enzimas associadas a mecanismos de reparo do DNA, assim como as 5'-3' exonucleases (LbrM06\_V2.0240), deletadas nestas mesmas populações resistentes, conforme observado na análise do CGH (Tabela 7). Entretanto, a enzima de reparo por excisão de nucleotídeo causado pelo dano da luz ultra-violeta (UV) denominada "RAD-23-like protein" (LbrM30\_V2.3340) (Tabela 11) apresentou maior nível de expressão (10,7 x) na população de *L. braziliensis* resistente ao SbIII. Embora se tratem de enzimas diferentes e identificadas por diferentes métodos, nossos

resultados sugerem que não somente um aumento na replicação e transcrição, mas também alterações no sistema de reparo como diminuição de algumas enzimas e aumento de outras são mecanismos importantes no desenvolvimento de resistência nessas populações de *Leishmania*.

Em relação aos dois tipos de amostras utilizadas nos microarranjos de DNA (DNA genômico e cDNA), é importante ressaltar que a resistência a drogas está freqüentemente associada a eventos de amplificação gênica em *Leishmania* (Berverley, 1991; Borst & Ouellette, 1995), embora modulação do RNA sem aumento no número de cópias e outros mecanismos sejam também conhecidos (Guimond *et al.*, 2003; Drummel-Smith *et al.*, 2003; Ubeda *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram-se mais valiosos empregando amostras de cDNA do que DNA genômico, isso porque permitiram a identificação de um número maior de potenciais alvos para estudos de quimioterapia e resistência a drogas. Ubeda e colaboradores (2008) fizeram observação semelhante ao utilizar as duas técnicas de microarranjos no estudo de resistência de *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* ao metotrexato. Os autores relatam ainda em seus ensaios uma boa correlação entre os padrões de expressão gênica e o CGH. Nossos resultados, porém mostraram que pouco mais de 24% das 252 CDS alteradas tinham correlação com as mudanças na expressão gênica. Pouco mais de 5 % das CDS apresentaram resultados aparentemente contraditórios se comparados aos resultados da análise transcriptômica (como CDS amplificadas e com redução no nível de expressão, por exemplo). Desse modo é possível que diversas moléculas de DNA amplificadas produzam mRNAs instáveis ou imaturos que portanto são incapazes de produzir um efeito fenotípico significativo. Por outro lado os genes identificados pelos dois métodos constituem potenciais alvos para drogas, porém vale ainda ressaltar a importância de se verificar a anotação desses genes a fim de selecionar os melhores alvos para novos estudos. Um exemplo dessa importância é o gene da argininosuccinato sintase, que embora tenha sido identificado nos microarranjos de DNA genômico e de cDNA em mais de uma espécie de *Leishmania*, é um pseudogene em *L. (V.) braziliensis* (Dias *et al.*, 2007).

Por último deve-se destacar a importância da construção do banco de dados que foi realizada nesta tese. O desenvolvimento de bancos de dados voltados à informação biológica trouxe a possibilidade de integrar, realizar buscas e análises de dados biológicos vindos de diferentes fontes que, de outro modo, poderiam ser perdidos (revisado por Timmers *et al.*, 2009). Continuamente novos bancos de dados têm sido produzidos com o objetivo de integrar dados e facilitar diferentes

estudos envolvendo parasitos como *Leishmania*. Se considerarmos apenas os trabalhos recentes com *Leishmania*, observamos que novos bancos de dados foram construídos incluindo desde anotação genômica estrutural e funcional (Aslett *et al.*, 2010; Aurrecochea *et al.*, 2010), vias metabólicas (Doyle *et al.*, 2009), microsátélites (Fakhar *et al.*, 2008) até filogenia e pós-genômica (Dávila *et al.*, 2008). Nosso banco de dados tem por objetivo integrar dados genômicos e pós-genômicos, preditivos e experimentais de diversas fontes, relacionados à quimioterapia e aos mecanismos moleculares de resistência a drogas em *Leishmania*. Conforme apresentado no item “resultados”, o volume de dados produzido e utilizado nesse trabalho torna impossível sua análise sem a devida organização dos mesmos em tabelas relacionais. Também é importante observar que os resultados apresentados nesse trabalho estão apenas aqueles extraídos de *L. (V.) braziliensis*, porém os dados relativos às demais espécies estão armazenados e serão analisados futuramente. Outros projetos, teses e dissertações estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório e que serão depositados no banco de dados, trazendo assim importantes contribuições nesse campo de pesquisa.

## 7. CONCLUSÕES

- A heterogeneidade genética e as diferentes condições de cultivo são elementos fundamentais na observação e análise do fenótipo de resistência a drogas em laboratório. Todas as populações estudadas foram cultivadas *in vitro* sob as mesmas condições e exibiram diferenças significativas tanto na taxa de crescimento quanto na tolerância ao SbIII;
- Neste estudo foram isoladas populações das quatro espécies de *Leishmania* 4 a 20 vezes mais resistentes ao SbIII que seus respectivos pares sensíveis;
- O fenótipo de resistência ao SbIII permaneceu estável mesmo após 37 ou 47 passagens na ausência da droga. No entanto populações de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* tiveram seu coeficiente de resistência reduzido à metade após este período sem droga;
- Não foi observada resistência cruzada entre o SbIII e a anfotericina B ou a miltefosina em nenhuma das populações estudadas. Por outro lado, foi observada a ocorrência de resistência cruzada entre SbIII e paromomicina em populações de três das quatro espécies estudadas (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*);
- As populações *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; resistentes ao SbIII apresentaram uma drástica diminuição na infectividade, apresentado lesão muito pequena comparada aos respectivos pares sensíveis;
- A população resistente de *L. (V.) braziliensis* manteve o fenótipo de resistência estável mesmo após uma passagem por camundongos;
- Neste trabalho foram isoladas também populações de *Leishmania* spp. 2 a 3 vezes mais resistentes à anfotericina B comparado com seus respectivos pares sensíveis;
- As CDS alteradas podem ser organizadas em três grupos: genes associados à resistência a drogas, genes associados à proficiência e genes cuja correlação com o fenótipo de resistência a drogas não está esclarecido;
- Não foram identificados padrões cromossômicos ou genômicos associados ao fenótipo de resistência a drogas, sugerindo a ocorrência de mutações ao acaso;
- Foi observada a amplificação de genes associados à região H em *L. (V.) braziliensis* e os produtos amplificados incluem um pseudogene

- (argininosuccinato sintase); também foram observadas ampliações de regiões dos cromossomos 17, 20 e 31;
- A maioria dos transcritos diferencialmente expressos codifica proteínas hipotéticas e têm um nível de expressão de até 3 X. Não foi observado correlação entre os transcritos diferencialmente expressos e a localização cromossômica;
  - Entre os transcritos com maior nível de expressão encontram-se aqueles que codificam proteínas quinases e fosfatases, proteínas associadas à membrana, replicação e reparo;
  - De um modo geral, a anotação funcional sugere um aumento na expressão de transcritos associados à replicação e à transcrição do DNA e uma diminuição na expressão de transcritos associados ao metabolismo de lipídios e carboidratos e ao transporte de proteínas;
  - Foi observada uma baixa correlação entre os resultados de CGH e de expressão genética diferencial, bem como entre os genes identificados em *L. (V.) braziliensis* e nas outras três espécies de *Leishmania* estudadas;
  - Foi observada a deleção da 5'-3' exonuclease, e a diminuição na expressão da enzima apurina/apirimidina endonuclease-proteína redox (AP endonuclease) em *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Por outro lado, a enzima de reparo por excisão de nucleotídeo causado pelo dano da luz ultra-violeta (UV) denominada "RAD-23-like protein" apresentou maior nível de expressão na população de *L. braziliensis* resistente ao SbIII;
  - Foram identificados 247 transcritos diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis* com pelo menos um alvo para drogas; destes, 15 transcritos possuem pouca ou nenhuma similaridade com proteínas humanas e somente um desses 15 foi selecionado por CGH e expressão diferencial (LbrM06\_V2.0620 – carbonic anhydrase family protein, putative);
  - O desenvolvimento de um banco de dados voltado para resistência a drogas em *Leishmania* permitiu a integração dos diferentes resultados: fenotípicos, genômicos e transcriptômicos, facilitando a busca e análise dos resultados desse trabalho.



### **Conclusão final:**

Com base nos resultados obtidos acreditamos que, uma vez submetidos à pressão por drogas, parasitos do gênero *Leishmania* podem aumentar os processos de replicação e transcrição do DNA e reduzir alguns mecanismos de reparo. Dessa forma são produzidas novas moléculas de DNA e de RNA contendo mutações ao acaso e que são gradualmente selecionadas de acordo com a pressão seletiva da droga. Em *L. (V.) braziliensis*, a resistência ao SbIII parece estar mais associada à modulação do RNA do que aos eventos de amplificação gênica, o que poderia explicar a redução no coeficiente de resistência após cultivo na ausência de drogas. Vários genes alterados estão associados a alterações na proficiência do parasito, provavelmente provocando uma drástica redução na infectividade dos parasitos resistentes ao SbIII. A baixa correlação entre os genes selecionados nas diferentes espécies de *Leishmania* explica as diferenças fenotípicas entre as populações das quatro espécies, enquanto a amplificação e superexpressão de transportadores ABC explicam em parte a resistência cruzada com paromomicina. A estratégia empregada na análise dos dados pode ser crucial na pesquisa de novos alvos para drogas. A partir da análise integrada de todos esses fatores fenotípicos, genômicos e transcriptômicos, é possível estabelecer novas estratégias de pesquisa básica e aplicada, dessa forma contribuindo para o entendimento da resistência de *Leishmania* aos antimoniais e para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das leishmanioses.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Artigo publicado:

Parasitol Res  
DOI 10.1007/s00436-010-1852-8

SHORT COMMUNICATION

## Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species

Daniel B. Liarte · Silvane M. F. Murta

Received: 17 November 2009 / Accepted: 18 March 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** In the present study, we selected in vitro populations of *Leishmania Viannia guyanensis*, *L.V. braziliensis*, *L. Leishmania amazonensis* and *L.L. infantum chagasi* that were resistant to potassium antimony tartrate (SbIII). The resistance index of these populations varied from 4- to 20-fold higher than that of their wild-type counterparts. To evaluate the stability of the resistance phenotype, these four resistant populations were passaged 37 to 47 times in a culture medium without SbIII. No change was observed in the resistance indexes of *L.V. guyanensis* (19-fold) and *L.L. infantum chagasi* (4-fold). In contrast, a decrease in the resistance index was observed for *L.V. braziliensis* (from 20- to 10-fold) and *L.L. amazonensis* (from 6- to 3-fold). None of the antimony-resistant populations exhibited cross-resistance to amphotericin B and miltefosine. However, the resistant populations of *L.V. braziliensis*, *L.L. amazonensis* and *L.L. infantum chagasi* were also resistant to paromomycin. A drastic reduction was observed in the infectivity in mice for the resistant *L.V. guyanensis*, *L.L. amazonensis* and *L.V. braziliensis* populations. The SbIII-resistant phenotype of *L.V. braziliensis* was stable after one passage in mice. Although the protocol of induction was the same, the SbIII-resistant populations showed different degrees of tolerance, stability, infectivity in mice and cross-resistance to antileishmanial drugs, depending on the *Leishmania* species.

#### Abbreviations

SbIII potassium antimony tartrate  
WTS wild-type susceptible

SbR	SbIII-resistant
Lg	<i>L.V. guyanensis</i>
Lb	<i>L.V. braziliensis</i>
La	<i>L.L. amazonensis</i>
Lc	<i>L.L. infantum chagasi</i>

#### Introduction

Leishmaniasis refers to a spectrum of diseases caused by different species of protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. An estimated 12 million people are infected with *Leishmania* parasites and an additional 350 million people are at risk worldwide (CDC 2009). At least 21 *Leishmania* species infect humans, and the diseases that they cause can be categorized into three types: visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis (Marsden 1986). Although the host genetic variability, immune response and environmental factors may influence the outcome of infections, the main factor for clinical presentation is the species of the infecting parasite (Lipoldova and Demant 2006). For example, the New World parasite *L. Leishmania infantum chagasi* (Shaw 2006) is the causative agent of visceral leishmaniasis, whereas *L.L. amazonensis* and *L. Viannia guyanensis* cause cutaneous leishmaniasis and *L.V. braziliensis* causes cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.

The first-line treatment for all forms of leishmaniasis is the administration of pentavalent antimonials (SbV) such as meglumine antimoniate (Glucantime®) or sodium stibogluconate (Pentostam®). In India, however, more than 60% of the patients with visceral leishmaniasis do not respond to treatment with SbV owing to acquired resistance. In these cases, the drug of choice is amphotericin B, a polyene antifungal drug (Lira et al. 1998; Sundar 2001). Recently,

D. B. Liarte · S. M. F. Murta (✉)  
Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular,  
Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR/Fiocruz,  
Av. Augusto de Lima 1715, Caixa Postal 1743,  
CEP 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil  
e-mail: silvane@cpqrr.fiocruz.br

new potential therapies have been introduced for visceral leishmaniasis, such as amphotericin B liposome formulation, paromomycin and miltefosine (Croft et al. 2006).

The mechanisms of action of antimony are not fully elucidated. It is known that SbV acts on the amastigote form, inhibiting enzyme activity and the oxidative pathway of fatty acids (Herwaldt 1999). It is generally agreed that trivalent antimony (SbIII) is the active form of the drug against *Leishmania* amastigote and promastigote forms (Brochu et al. 2003). Studies suggest that SbIII causes disturbances in the thiol redox potential of the parasite, leading to cell death (Wyllie et al. 2004). Amphotericin B, the most powerful leishmanicidal drug commercially available, acts by preferentially binding to sterols (ergosterol or episterol) in the plasma membrane of the parasite (Berman et al. 1992). Owing to its high toxicity, new formulations (liposomal and colloidal dispersion) of amphotericin B have been developed; however, they are expensive and impractical for routine use (Davidson et al. 1991).

Drug resistance is one of the major clinical problems in the treatment of diseases ranging from bacterial and parasitic infections to cancer. Several mechanisms of drug resistance have been identified in Old World *Leishmania* species (Croft et al. 2006). In New World pathogenic *Leishmania* species, the response to antimony chemotherapy is considerably variable (Moreira et al. 1998; Romero et al. 2001); however, their mechanisms of drug resistance have not been extensively analyzed. In this present work, we have selected populations of four New World *Leishmania* species resistant to potassium antimony tartrate (SbIII) to serve as a model for the study of the mechanisms of drug resistance in this protozoan.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

SbIII, amphotericin B and paromomycin were supplied by Sigma (Saint Louis, MO, USA). Miltefosine was kindly provided by Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira (UFMG/Brazil). AlamarBlue was purchased from Biosource (Camarillo, CA, USA). All media reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

### *Leishmania* populations and culture

The promastigote forms of four *Leishmania* species were used: *L.V. guyanensis* (IUMB/BR/85/M9945), *L.V. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), *L.L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) and *L.L. infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). Parasites were grown at 27°C in M199 medium supplemented with 40 mM HEPES pH 7.4, 1 µg/ml biotin,

5 µg/ml hemin, 2 µg/ml bioppterin, 2 mM L-glutamine, 500 U penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. All experiments were performed with parasites in the logarithmic phase of growth. The SbIII-resistant populations, named *L.V. guyanensis* (LgSbR), *L.V. braziliensis* (LbSbR), *L.L. amazonensis* (LaSbR) and *L.L. infantum chagasi* (LcSbR), were obtained from wild-type susceptible *L.V. guyanensis* (LgWTS), *L.V. braziliensis* (LbWTS), *L.L. amazonensis* (LaWTS) and *L.L. infantum chagasi* (LcWTS) by continuous stepwise drug pressure with SbIII as described below.

### Selection of populations of *Leishmania* spp. resistant to SbIII by in vitro drug pressure

Parasite selection was carried out in 25-cm<sup>2</sup> culture flasks in a final volume of 5 ml of M199 medium. Initially, curves of tolerance to SbIII were determined for all *Leishmania* species. Parasites were initially exposed to 0.1 µM SbIII. This value corresponds to the IC<sub>50</sub> (50% growth inhibitory concentration) of *L.V. guyanensis*, the species more susceptible to SbIII. A stepwise increase in drug concentration was undertaken only when the drug-exposed cultures had a growth rate similar to those of the wild-type cultures. This increase was continued until the maximum concentration allowing parasite growth was reached. The maximum SbIII concentration used in our experiments was 4 µM because at concentrations higher than 4 µM the drug precipitates in the medium. The wild-type *Leishmania* species were cultured in M199 medium without any drug.

### In vitro susceptibility to antileishmanial drugs

The in vitro susceptibility of the four SbIII-resistant populations to the drugs SbIII, miltefosine, amphotericin B and paromomycin was determined by measuring the IC<sub>50</sub>. The IC<sub>50</sub> was determined using a colorimetric AlamarBlue™ dye reduction assay, as described by Shimony and Jaffe (2008) with modifications. Briefly, the promastigote forms of *Leishmania* spp. were seeded into 96-well plates in triplicate at a density of 5 × 10<sup>5</sup> cells/ml in 180 µl M199 medium containing a range of drug concentrations. The cultures were then incubated for 24 hours at 25°C. After this period, 20 µl of AlamarBlue was added to each well (to a final concentration of 10%). The plates were reincubated for additional 18–24 hours at 25°C. After this period, the plates were then read on a Spectramax 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) using wavelengths of 570 and 600 nm and the percentage of reduction of AlamarBlue was determined. Complete medium was used as negative control and the parasites without any drug were set as positive controls. The measure of fluorescence of AlamarBlue must be made before

of complete reduction of AlamarBlue (24 hours); otherwise, after this period, the measurements become overestimated. In addition, long incubation periods favor the decrease in the AlamarBlue fluorescence. Growth inhibition was determined by the percentage of growth reduction compared to that of untreated control parasites. Three independent experiments were performed in triplicate.

#### Stability of resistance to SbIII in vitro

The SbIII-resistant populations of *L.V. guyanensis* (LgSbR), *L.V. braziliensis* (LbSbR), *L.L. amazonensis* (LaSbR) and *L.L. infantum chagasi* (LcSbR) were cultured in the absence of SbIII for 50 subcultures. After 37 and 47 consecutive subcultures, the IC<sub>50</sub> of these subpopulations [revertant parasites (SbRrev)] was determined to monitor the sensitivity to SbIII.

#### Infectivity of *L.V. guyanensis*, *L.V. braziliensis*, *L.L. amazonensis* and *L.L. infantum chagasi* populations in interferon- $\gamma$ knockout C57BL/6 mice

These mice were provided by the Laboratório de Imunopatologia (CPqRR/Fiocruz/MG) and were kept under standard conditions with experimental isolation barriers at the animal house of CPqRR. The infectivity of the SbIII-susceptible and SbIII-resistant populations of *Leishmania* spp. was determined by infection with  $1 \times 10^7$  metacyclic promastigotes from the sixth day of the stationary phase. *L.V. guyanensis*, *L.V. braziliensis* and *L.L. amazonensis* populations were inoculated into the footpads of interferon- $\gamma$  knockout (IFN- $\gamma$  KO) C57BL/6 mice, and the lesion growth was then measured as described previously (Cunningham et al. 2001). Two different experiments were performed using four mice per population. *L.L. infantum chagasi* parasites were inoculated intraperitoneally in IFN- $\gamma$  KO C57BL/6 mice. After 20, 40 and 60 days of infection, groups of six animals infected with LcWTS or LcSbR populations (two animals for each of the selected day) were sacrificed. The liver and spleen were excised from these mice, macerated in saline solution and cultured in tubes containing 5 ml of M199 medium. The tubes were incubated at 28°C for 60 days and examined microscopically for the presence of parasites. This experiment was repeated twice using six mice per group.

#### Stability of the drug resistance phenotype of LbSbR populations in vivo

The IC<sub>50</sub> of SbIII was determined after one in vivo passage of susceptible and resistant *L. braziliensis* parasites in mice. Parasites recovered from lesions at the 45th day after infection were subcultured twice in drug-free M199

medium. Subsequently, they were subjected to SbIII susceptibility studies with the colorimetric AlamarBlue™ dye reduction assay.

#### Statistical analysis

Data were analyzed by Student's *t* test performed using INSTAT software (GraphPad, San Diego, CA, USA). A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

#### Selection of SbIII-resistant populations from *Leishmania* spp. by in vitro drug pressure

First, the growth curves and susceptibilities to SbIII were determined for each *Leishmania* species. Parasites from the *Viannia* (IC<sub>50</sub> 0.09–0.15  $\mu$ M) sub-genus were more susceptible to SbIII than those from the *Leishmania* (IC<sub>50</sub> 0.28–0.33  $\mu$ M) sub-genus (Table 1). The first drug treatment was at 0.1  $\mu$ M SbIII corresponding to the IC<sub>50</sub> of *L.V. guyanensis*, the species more susceptible to SbIII. This concentration was maintained for all four *Leishmania* species until the growth of the SbIII-treated promastigotes was equivalent to that of the untreated wild-type populations. Further drug pressure with increasing concentrations of SbIII, which varied from 0.1 to 4  $\mu$ M, was undertaken until the maximum concentration allowing parasite growth was reached. The resistant parasites were selected over an 18-month period using this protocol. As indicated in Table 1, after drug selection, the IC<sub>50</sub> of resistant *Leishmania* populations varied from 1.4 to 3.04  $\mu$ M. The resistance indexes of LgSbR and LbSbR populations for SbIII were 19- and 20-fold, respectively. Conversely, LaSbR and LcSbR exhibited lower resistance indexes of 6- and 4-fold, respectively. Parasites from the *Viannia* sub-genus showed higher resistance indexes than those from the *Leishmania* sub-genus. All four resistant populations were maintained for an additional period of 4 months in a medium containing SbIII. The index of resistance of each line was the same, showing that the drug resistance phenotype was stabilized.

#### Stability of resistance to SbIII in vitro

The stability of the resistance phenotype was evaluated after 37 passages of the resistant parasites in the culture medium in the absence of SbIII (Table 1). These subpopulations were denominated as SbRrev. No change was observed in the resistance indexes of *L.V. guyanensis* (19-fold) and *L.L. infantum chagasi* (4-fold). In contrast, a

**Table 1** Sensitivity to SbIII of WTS and SbR populations from four New World *Leishmania* species

Species	IC <sub>50</sub> ± CI (µM)			Resistance index	Resistance index revertant
	WTS	SbR	SbR <sub>rev</sub>		
<i>L.V. braziliensis</i>	0.15±0.15	3.04±0.13 <sup>a</sup>	1.52±0.18 <sup>b</sup>	20	10
<i>L.V. guyanensis</i>	0.09±0.04	1.64±0.14 <sup>a</sup>	1.65±0.11	19	19
<i>L.L. amazonensis</i>	0.28±0.15	1.71±0.11 <sup>a</sup>	0.84±0.22 <sup>b</sup>	6	3
<i>L.L. chagasi</i>	0.33±0.09	1.40±0.04 <sup>a</sup>	1.37±0.11	4	4

IC<sub>50</sub> is the concentration (µM) of SbIII that decreases the rate of cell growth by 50%. The means ± CI (confidence interval) of three independent experiments in triplicate are given. The resistance index is the ratio of IC<sub>50</sub> for SbIII-resistant (SbR) and wild-type (WTS) lines and the resistance index for revertant parasites (SbR<sub>rev</sub>—parasites cultured by 37 passages without SbIII) is the ratio of IC<sub>50</sub> for SbR<sub>rev</sub> and WTS lines.

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> for each SbR line differs significantly between its wild-type counterpart WTS ( $p < 0.0001$ ).

<sup>b</sup>IC<sub>50</sub> for LbSbR<sub>rev</sub> and LaSbR<sub>rev</sub> lines differ significantly between IC<sub>50</sub> for LbSbR and LaSbR lines showing  $p < 0.0001$  and  $p < 0.002$ , respectively.

decrease in the resistance index was observed for *L.V. braziliensis* (from 20- to 10-fold) and *L.L. amazonensis* (from 6- to 3-fold). These four subpopulations were all grown for 10 more passages in the absence of the drug, but the remaining resistance was stable (data not shown).

#### Cross-resistance studies

The in vitro susceptibility of the wild-type (WTS) and antimony-resistant (SbR) populations of the four *Leishmania* species to amphotericin B, miltefosine and paromomycin is reported in Fig. 1. The IC<sub>50</sub> for each drug was determined using the colorimetric AlamarBlue™ dye reduction assay, as described in the “Materials and methods” section. The numbers above each bar indicate the index of resistance: ratio of IC<sub>50</sub> for SbR population to that for the WTS population for each drug. Only indexes of resistance ≥2-fold were considered significant. All SbR populations were slightly more susceptible to miltefosine than WTS populations, but this difference was not significant (Fig. 1b). None of the SbR populations exhibited cross-resistance to amphotericin B or miltefosine (Fig. 1a and b). On the other hand, the resistant *L.V. braziliensis*, *L.L. amazonensis* and *L.L. infantum chagasi* populations were also resistant to paromomycin compared to their wild-type counterparts, showing indexes of resistance of 2-, 4- and 5-fold, respectively (Fig. 1c). No cross-resistance to paromomycin was observed in the antimony-resistant *L.V. guyanensis* population.

#### Infectivity and in vivo stability of resistance to SbIII

The ability of the drug-susceptible (WTS) and drug-resistant (SbR) populations of *L.V. guyanensis*, *L.V. braziliensis* and *L.L. amazonensis* to induce disease in a mouse infection model was investigated. Infective metacyclic promastigotes from each population were inoculated into IFN-γ C57BL/6 KO mice, and lesion formation was followed over time. All susceptible populations (LgWTS, LbWTS and LaWTS) were

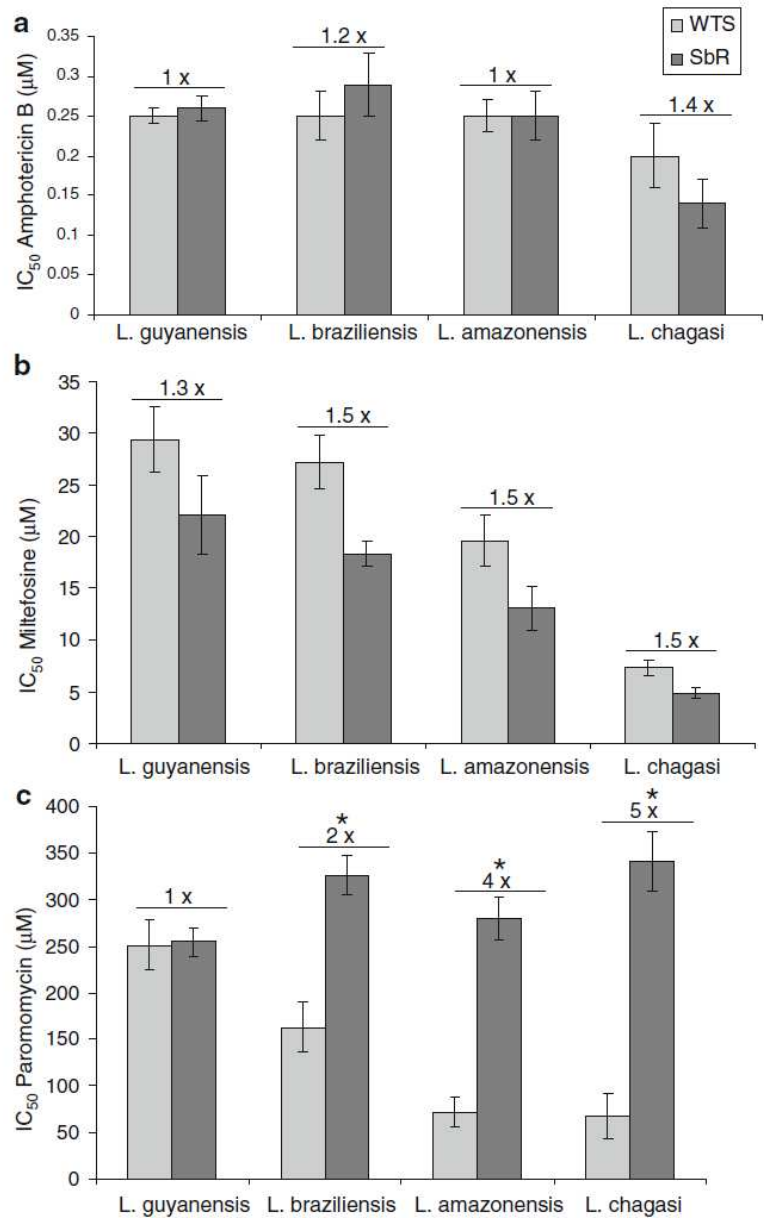
highly infective (Fig. 2). These parasites yielded lesions that appeared after 12 days and rapidly progressed. Owing to the large size of the lesions, the mice inoculated with these drug-susceptible populations were euthanized at the 50th day after infection. Susceptible *L.V. guyanensis* (LgWTS) produced bigger lesions than *L.V. braziliensis* and *L.L. amazonensis*. Although the parasites were inoculated only into the footpads of mice, nodules and lesions were also observed in the tails of mice infected with the LgWTS population (data not shown). A drastic reduction was observed in the infectivity of the drug-resistant populations of *L.V. guyanensis* and *L.L. amazonensis* in mice (Fig. 2). These parasites produced very small lesions after 40 days, and the lesions did not progress. LbSbR parasites produced bigger lesions than LgSbR and LaSbR. Lesions in mice infected with LbSbR parasites appeared after 37 days, progressed more slowly and peaked at a lower thickness (2.1 vs. 4.5 mm) than lesions produced by LbWTS parasites (Fig. 2).

The infectivity of the drug-susceptible and drug-resistant populations of *L.L. infantum chagasi* was determined by the infection of metacyclic promastigotes in the IFN-γ KO C57BL/6 mice by the intraperitoneal route. After 20, 40 and 60 days of infection, six mice from each group (LcWTS and LcSbR) were sacrificed. The liver and spleen from each animal were cultured in M199 medium and examined microscopically for the presence of parasites. On the 30th and 60th days after incubation, all cultures analyzed were negative, showing that both drug-susceptible and drug-resistant populations lost the infectivity. This could be because of the continuous passages in culture. Further studies to confirm this hypothesis are now being performed using a hamster model for in vivo infection evaluation.

In order to test the in vivo stability of the resistance phenotype, SbIII-resistant and SbIII-susceptible *L.V. braziliensis* parasites were recovered from lesions at the 45th day after infection. These parasites were subcultured twice in drug-free M199 medium and then subjected to SbIII susceptibility assays. The IC<sub>50</sub> (2.84±0.14 µM) values of

**Fig. 1** In vitro susceptibility of the wild-type (WTS) (light gray) and antimony-resistant (SbR) (dark gray) populations of four *Leishmania* species to antileishmanial drugs: amphotericin B (a), miltefosine (b), and paromomycin (c). The  $IC_{50}$  for each drug ( $\mu M$ ) was determined by measuring the 50% inhibitory concentration with the colorimetric AlamarBlue™ dye reduction assay. The data are the average and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate.

\* $IC_{50}$  for SbR populations differ significantly from each WTS population tested ( $p < 0.0005$ ). The numbers above each bar indicate the mean index of resistance. Differences were considered significant when the resistance index was  $\geq 2$ -fold

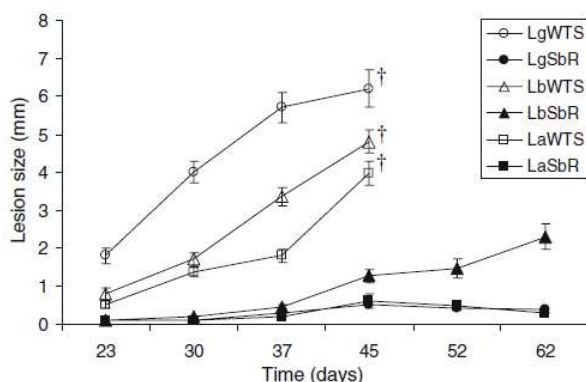


resistant parasites recovered from mice (LbSbR M1P2) were similar to those of resistant parasites maintained in M199 medium in the presence of SbIII ( $3.04 \pm 0.12 \mu M$ ). This result shows that the resistant phenotype of LbSbR remained stable after one passage in mice.

## Discussion

The first-line treatment for leishmaniasis consists of pentavalent antimony Sb(V)-containing drugs such as

Pentostam and Glucantime. However, the active form of the drug is the trivalent form (SbIII) of the metal. The reduction of SbV to SbIII may take place either in the host macrophage (Sereno et al. 1998) or in the parasite *Leishmania* (Shaked-Mishan et al. 2001). Since SbIII is highly active against *Leishmania* and SbV is active only when used against amastigote forms, in the present study, we used potassium antimony tartrate (SbIII) to select the LgSbR, LbSbR, LaSbR and LcSbR populations in vitro. The selection of these resistant populations took place over an approximate period of 18 months by continuous



**Fig. 2** Pathology induced in IFN- $\gamma$  KO C57BL/6 mice by wild-type susceptible and SbIII-resistant populations. Mice were injected with  $1 \times 10^7$  metacyclic promastigotes (from the sixth day of the stationary phase) in the footpad, and the increase in footpad thickness caused by lesion progression was determined. The average and standard deviation of two experiments are shown. †Mice inoculated with LgWTS, LbWTS and LaWTS were euthanized at the 50th day after infection

stepwise drug pressure. The resistance indexes of these populations varied from 4- to 20-fold higher resistance than their wild-type counterparts. The resistance indexes of *Leishmania* species from the *Viannia* sub-genus (19- and 20-fold) were higher than those of the species from the *Leishmania* sub-genus (4- and 6-fold). In our study, the maximum  $IC_{50}$  reached was 3  $\mu$ M SbIII for *L.V. braziliensis*. Although the protocol of induction was the same, each *Leishmania* species analyzed showed different degrees of tolerance to SbIII.

*Leishmania* populations resistant to antileishmanial drugs such as Glucantime (Arana et al. 1998), amphotericin B (Mbongo et al. 1998), SbIII (Haimeur et al. 2000), miltefosine (Seifert et al. 2003) and sitamaquine (Bories et al. 2008) have been previously obtained in vitro using a methodology similar to ours. The analyses of these resistant populations led the authors to propose models for resistance. Resistance to SbIII has been correlated to decreased antimony due to either reduced uptake or increased efflux (Brochu et al. 2003; Dey et al. 1994). Recently, a *Leishmania* aquaglyceroporin (AQP1) has been demonstrated to mediate the uptake of SbIII (Gourbal et al. 2004). Down-regulation of AQP1 has been reported in several *Leishmania* species resistant to antimonials (Marquis et al. 2005) and antimony-resistant clinical isolates from Nepal (Decuypere et al. 2005). The role of the ABC transporter, MRPA, in conferring antimony resistance by sequestration of metal-thiol conjugates has also been reported in *Leishmania* species selected for resistance to SbIII, SbV or AsIII (Ouellette et al. 2004; El Fadili et al. 2005). Other mechanisms suggested for resistance to SbIII includes increased levels of total thiols (cysteine, glutathione and trypanothione) (Haimeur et al. 2000; Ouellette et al. 2004).

Further studies are underway to determine the resistance mechanisms in SbIII-resistant *Leishmania* populations obtained in this study.

The SbIII resistance phenotypes of LgSbR and LcSbR were stable for 37 passages in the absence of the drug, whereas the indexes of resistance in LbSbR and LaSbR decreased 2-fold. No further decrease in resistance was observed in parasites grown for more than 47 passages, thus demonstrating the stability of the SbIII resistance phenotype. These data suggest that some modifications are stable and others are lost during the reversion process. Similar results have been described in *L. tarentolae* resistant to SbIII (Haimeur et al. 2000). In parasite populations grown in the absence of SbIII for 30 or 100 passages, resistance levels decreased by 5- to 10-fold but were still several-fold higher than wild-type cells.

In this study, none of the SbIII-resistant populations exhibited cross-resistance to miltefosine or amphotericin B, showing that these drugs are metabolized differently and that the mechanisms of drug resistance are distinct. These data are in agreement with those from previous studies showing that parasites resistant to antimonials do not exhibit cross-resistance to amphotericin B (Sundar et al. 2000; Sereno et al. 2000; Thakur et al. 2008). In addition, an *L. donovani* line resistant to miltefosine did not exhibit cross-resistance to antimony (Seifert et al. 2003). Interestingly, our data showed that the SbIII-resistant populations of *L.V. braziliensis*, *L.L. amazonensis* and *L.L. infantum chagasi* were also resistant to paromomycin. Paromomycin, an aminoglycoside antibiotic, induces a reduction in the membrane potential and inhibition of protein synthesis. This mechanism has been shown to be less pronounced in a paromomycin-resistant line than in the wild type (Jhingran et al. 2009). Glycolysis, protein biosynthesis and trypanothione have all been suggested as targets for SbIII in *Leishmania* (Wyllie et al. 2004). We hypothesized that the mechanisms of resistance to paromomycin and SbIII are similar for three of the four *Leishmania* species analyzed.

A drastic decrease in infectivity was observed for the drug-resistant populations of *L.V. guyanensis*, *L.L. amazonensis* and *L.V. braziliensis*. In diverse model systems, when a pathogen acquires drug resistance, it often pays a price in terms of reduced ability to replicate and cause disease (Lenski 1998; Geretti 2005). Several studies have shown that mutations that render pathogens resistant to drug treatment are likely to result in a loss of fitness, also defined as “proficiency” (Natera et al. 2007). Such mutants could therefore be outgrown by sensitive forms if the drug pressure were removed (Walliker et al. 2005). In *Plasmodium chabaudi*, a pyrimethamine-resistant mutant has been found to grow more slowly in mice than its drug-sensitive progenitor. However, after passage in the absence of the

drug, it grew faster, suggesting the occurrence of compensatory mutations (de Roode et al. 2004). Compensatory mutations are also known to be present in other drug-resistant parasites, e.g. chloroquine-resistant *P. falciparum* (Hayward et al. 2005) and dinitroaniline-resistant *Toxoplasma gondii* (Ma et al. 2008). In *Leishmania*, several changes in physiological parameters are associated with drug resistance and might serve as markers for parasite proficiency (reviewed by Natera et al. 2007). Several authors reported a decreased expression of important virulent factors of drug-resistant *Leishmania* parasites. A decreased activity of acid phosphatase, pyruvate kinase and infectivity was reported in glibenclamide-resistant *L. mexicana* (García et al. 2000). Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism and lipoposphoglycan expression were observed in pentamidine-resistant *L. amazonensis* and *L. donovani* (Basselin and Robert-Gero 1998). In addition, loss of reactivity to lectins is associated with a decreased infectivity in glucantime-resistant *L. guyanensis* (Gazola et al. 2001). In *Leishmania*, virulence is used as the foremost marker for proficiency (Natera et al. 2007). In our study, the drug resistance has been associated with a decrease in the infectivity of SbIII-resistant *Leishmania* populations. This phenomenon was previously observed on amphotericin B-resistant *L. donovani* and *L. mexicana* (Mbongo et al. 1998; Al-Mohammed et al. 2005), glibenclamide-resistant *L. mexicana* (García et al. 2000), glucantime-resistant *L. guyanensis* (Gazola et al. 2001) and sitamaquine-resistant *L. donovani* (Bories et al. 2008). Fitness cost might be used as a strategy to fight against the leishmaniasis. Drug-resistant *Leishmania* parasites are likely to be less fit than the wild type, suggesting that they might disappear by reducing the volume of drug pressure with antimonials. However, this hypothesis should be carefully investigated once compensatory mutation could to arise and restore the fitness.

The occurrence of drug-resistant *Leishmania* strains is a growing problem all over the world. Although several mechanisms of drug resistance are known, there are few studies of drug resistance in New World *Leishmania* species (García et al. 2000; Gazola et al. 2001; Anacleto et al. 2003). The antimony-resistant *Leishmania* populations obtained in this study may help our understanding of the molecular basis of drug resistance in different species of this parasite and also provide information on drug targets for chemotherapy.

**Acknowledgements** The authors wish to thank Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira (UFMG/Brazil) for providing the miltefosine. This investigation received financial support from the following agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

## References

- Al-Mohammed HI, Chance ML, Bates PA (2005) Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(8):3274–3280
- Anacleto C, Abdo MC, Ferreira AV, Murta SM, Romanha AJ, Fernandes AP, Moreira ES (2003) Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell line. *Parasitol Res* 90(2):110–118
- Arana FE, Pérez-Victoria JM, Repetto Y, Morello A, Castanys S, Gamarro F (1998) Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* 56:1201–1208
- Basselin M, Robert-Gero M (1998) Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipoposphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol Res* 84(1):78–83
- Berman JD, Ksionski G, Chapman WL, Waits VB, Hanson WL (1992) Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1978–1980
- Bories C, Cojean S, Huteau F, Loiseau PM (2008) Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biomed Pharmacother* 62:164–167
- Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M (2003) Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3073–3079
- Centers for Disease Control and Prevention (2009) Available from: [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm). Reviewed November 14
- Croft SL (2001) Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6(11):899–905
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19:111–126
- Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM (2001) Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science* 292:285–287
- Davidson RN, Croft SL, Scott A, Maini M, Moody AH, Bryceson AD (1991) Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet* 337:1061–1062
- de Roode JC, Culleton R, Bell AS, Read AF (2004) Competitive release of drug resistance following drug treatment of mixed *Plasmodium chabaudi* infections. *Malar J* 14:33
- Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De Doncker S, Laurent T, Khanal B, Chappuis F, Dujardin JC (2005) Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 49(11):4616–4621
- Dey S, Papadopoulou B, Haimeur A, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP, Ouellette M (1994) High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 67(1):49–57
- El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulou B, Légaré D, Ouellette M (2005) Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1988–1993
- García N, Figarella K, Mendoza-León A, Ponte-Sucre A (2000) Changes in the infectivity, pyruvate kinase activity, acid phosphatase activity and P-glycoprotein expression in glibenclamide-resistant *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 86(11):899–904
- Gazola KC, Ferreira AV, Anacleto C, Michalick MS, Andrade AF, Moreira ES (2001) Cell surface carbohydrates and *in vivo*



- infectivity of glucantime-sensitive and resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell lines. *Parasitol Res* 87(11):935–940
- Geretti AM (2005) The clinical significance of viral fitness. *J HIV Ther* 10(1):6–10
- Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R (2004) Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279(30):31010–31017
- Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopoulou B, Ouellette M (2000) Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 108:131–135
- Hayward R, Saliba KJ, Kirk K (2005) pfindr1 mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 55:1285–1295
- Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191–1199
- Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R (2009) Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 164:111–117
- Lenski RE (1998) Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Int Microbiol* 1(4):265–270
- Lipoldova M, Demant P (2006) Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet* 7:294–305
- Lira R, Mendez S, Carrera L, Jaffe C, Neva F, Sacks D (1998) *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. *Exp Parasitol* 89:331–342
- Ma C, Tran J, Li C, Ganesan L, Wood D, Morrissette N (2008) Secondary mutations correct fitness defects in *Toxoplasma gondii* with dinitroaniline resistance mutations. *Genetics* 180(2):845–856
- Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M (2005) Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 57(6):1690–1699
- Marsden PD (1986) Mucosal leishmaniasis ('espundia' Escome!, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:859–876
- Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M (1998) Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 42:352–357
- Moreira ES, Anacleto C, Petrillo-Peixoto ML (1998) Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitol Res* 84:720–726
- Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, Ponte-Sucré A (2007) *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents* 29(6):637–642
- Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 7(4–5):257–266
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO (2001) Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65:456–465
- Seifert K, Matu S, Javier Pérez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL (2003) Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 22:380–387
- Sereno D, Cavaleira M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouassii A, Lemesre JL (1998) Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3097–3102
- Sereno D, Holzmüller P, Lemesre JL (2000) Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Trop* 74:25–31
- Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D (2001) Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 276:3971–3976
- Shaw JJ (2006) Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:577–579
- Shimony O, Jaffe CL (2008) Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. *J Microbiol Methods* 75(2):196–200
- Sundar S (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6:849–854
- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Shama S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW (2000) Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31:1104–1107
- Thakur CP, Thakur S, Narayan S, Sinha A (2008) Comparison of treatment regimens of kala-azar based on culture & sensitivity of amastigotes to sodium antimony gluconate. *Indian J Med Res* 127:582–588
- Walliker D, Hunt P, Babiker H (2005) Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Trop* 94:251–259, Review
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH (2004) Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279:39925–39932

## 8.2. Perspectivas:

- Caracterizar fenotipicamente e identificar genes e transcritos diferencialmente expressos nas populações de *Leishmania* spp. resistentes à anfotericina B;
- Agrupar os genes identificados em *L. (V.) braziliensis* que codificam proteínas hipotéticas e realizar novas buscas por padrões moleculares associados com eventos de amplificação e deleção gênica ou com o fenótipo de resistência a drogas;
- Avaliar o nível de expressão de alguns genes e proteínas utilizando técnicas de PCR quantitativo em tempo real e “western blot”;
- Avaliar a eficácia *in vitro* e *in vivo* do SbIII associado às drogas que atuam sobre genes diferencialmente expressos em *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII;
- Analisar os dados produzidos nessa tese relativos às populações de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* selvagens e resistentes ao SbIII;
- Aperfeiçoar o banco de dados relacional de potenciais alvos para estudos de quimioterapia e resistência a drogas em *Leishmania*. O banco de dados irá conter dados fenotípicos, genômicos, transcriptômicos e proteômicos; com predições *in silico* e dados experimentais. As próximas etapas desse banco de dados serão:
  - Carregar os dados relativos à anotação funcional dos genes reconhecidos por cada contig, bem como as comparações feitas com bancos de dados específicos para estudos de resistência a drogas (como os bancos de dados de alvos para drogas e o genoma humano);
  - Incluir dados relativos à pesquisa experimental dos genes estudados (como os resultados de PCR quantitativo e western blot);
  - Incluir dados relativos ao proteoma das populações selvagens e resistentes a drogas;
  - Implementar uma interface gráfica que facilite as buscas e visualização dos resultados.

### 8.3. Distribuição das categorias funcionais definidas no COG:

#### INFORMATION STORAGE AND PROCESSING

- [J] Translation, ribosomal structure and biogenesis
- [A] RNA processing and modification
- [K] Transcription
- [L] Replication, recombination and repair
- [B] Chromatin structure and dynamics

#### CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING

- [D] Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- [Y] Nuclear structure
- [V] Defense mechanisms
- [T] Signal transduction mechanisms
- [M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- [N] Cell motility
- [Z] Cytoskeleton
- [W] Extracellular structures
- [U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- [O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperones

#### METABOLISM

- [C] Energy production and conversion
- [G] Carbohydrate transport and metabolism
- [E] Amino acid transport and metabolism
- [F] Nucleotide transport and metabolism
- [H] Coenzyme transport and metabolism
- [I] Lipid transport and metabolism
- [P] Inorganic ion transport and metabolism
- [Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

#### POORLY CHARACTERIZED

- [R] General function prediction only
- [S] Function unknown

## 9. REFERÊNCIAS

Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodriguez F, *et al.* Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 1994 Aug; 88(4):371-8.

Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Khamesipour A, Mirhendi H, Alimohammadian MH, Rassi Y, Arandian MH, Jafari R, Abdoli H, Shareghi N, Ghanei M, Jalali-Zand N. Dynamics of *Leishmania* infection rates in *Rhombomys opimus* (Rodentia: Gerbillinae) population of an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Bull Soc Pathol Exot* 2010; [Epub ahead of print].

Akkafa F, Dilmeç F, Alpua Z. Identification of *Leishmania* parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region, Sanliurfa province, in Turkey. *Parasitol Res* 2008 Aug; 103(3):583-6.

Akopyants NS, Matlib RS, Bukanova EN, Smeds MR, Brownstein BH, Stormo GD, Beverley SM. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2004 Jul; 136(1):71-86.

Al-Mohammed HI, Chance ML, Bates PA. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Aug; 49(8):3274-80.

Alonso G, Guevara P, Ramirez JL. Trypanosomatidae codon usage and GC distribution, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1992; 87: 517–523.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-3402.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(2):266-74.

Anacleto C, Abdo MCB, Ferreira AVB, Murta SMF, Romanha AJ, Fernandes AP, Moreira ESA. Structural and functional analysis of an amplification containing a *Pgp A* gene in a glucantime-resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell line. *Parasitol Res* 2003; 90:110-118.

Arana FE, Pérez-Victoria JM, Repetto Y, Morello A, Castanys S, Gamarro F. Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* 1998 Nov 1; 56(9):1201-8.

Arana BA, Roca M, Rizzo NR, Mendoza CE, Kroeger A. Evaluation of a standardized leishmanin skin test in Guatemala. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(4):394-6.

Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 1996; 2(2):145-6.

Aronov AM, Suresh S, Buckner FS, Van Voorhis WC, Verlinde CL, Opperdoes FR, Hol WG, Gelb MH. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(8):4273-8.

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

Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, Depledge DP, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gardner MJ, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Hertz-Fowler C, Houston R, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Logan FJ, Miller JA, Mitra S, Myler PJ, Nayak V, Pennington C, Phan I, Pinney DF, Ramasamy G, Rogers MB, Roos DS, Ross C, Sivam D, Smith DF, Srinivasamoorthy G, Stoeckert CJ Jr, Subramanian S, Thibodeau R, Tivey A, Treatman C, Velarde G, Wang H. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* 2010 Jan; 38(Database issue):D457-62.

Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer ET, Li W, Miller JA, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Roos DS, Ross C, Srinivasamoorthy G, Stoeckert CJ Jr, Thibodeau R, Treatman C, Wang H. EuPathDB: a portal to eukaryotic pathogen databases. *Nucleic Acids Res* 2010 Jan; 38(Database issue):D415-9.

Bailey TL & Elkan C. "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers". Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology; (28-36), AAAI Press, 1994.

Bailey TL & Gribskov M. "Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches". *Bioinformatics* 1998; 14(48-54).

Bangs JD, Ransom DA, Nimick M, Christie G, Hooper NM. *In vitro* cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Mol Biochem Parasitol* 2001 Apr 25; 114(1):111-7.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007; 64:1-109.

Basselin M, Robert-Gero M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol Res* 1998; 84(1):78-83.

Basselin M, Lawrence F, Robert-Gero M. Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. *Parasitol Res* 1997; 83(5):413-8.

Bastien P, Blaineau C, Britto C. The complete chromosomal organization of the reference strain of the *Leishmania* genome project, *L. major* "Friedlin". *Parasitol Today*. 1998; 14: 301-303.

Berhe N, Hailu A, Abraham Y, Tadesse Y, Breivik K, Abebe Y. Inter-current and nosocomial infections among visceral leishmaniasis patients in Ethiopia: an observational study. *Acta Trop* 2001; 80(2):87-95.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1985 Jun; 27(6):916-20.

Berman JD, Ksionski G, Chapman WL, Waits VB, Hanson WL. Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(9):1978-80.

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

Berman J, Bryceson ADM, Croft S, Engel J, Gutteridge WE, Karbwang J, Sindermann H, Soto J, Sundar S, Urbina JA. Miltefosine: issues to be addressed in the future. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006; 100: 41–44.

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

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

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

Bories C, Cojean S, Huteau F, Loiseau PM. Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biomed Pharmacother* 2008 Mar; 62(3):164-7.

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

Brajtburg J & Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol Rev* 1996 Oct; 9(4):512-31.

Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, Wincker P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 1998 Nov 5; 222(1):107-17.

Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10):3073-9.

Bryceson ADM, Chulay JD, May HO, Mugambii M, Were JB, Muigai R, Chungu C, Gachihi G, Meme J, Anabwani G, Bhatt SM. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. I. Clinical and immunological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:700–704.

Bryson K, Besteiro S, McGachy HA, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J. Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response. *Infect Immun* 2009 Jul; 77(7):2971-8.

Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(11):2592-7.

Butcher BA, Turco SJ, Hilty BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL. Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *J Biol Chem* 1996 Aug 23; 271(34):20573-9.

Centers for Disease Control and Prevention (2009) Available from: [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm). Reviewed November 14.



Chakraborty AK, Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Apr 29; 152(2):605-11.

Chamaillé L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet JP. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors* 2010 Apr 8; 3:31.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov; 5(11):873-82.

Chen PP. The Entity-Relationship Model-Toward a Unified View of Data. *ACM Transactions on Database Systems*. 1976; 1(1).

Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:221–225.

Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 2002; 32:490–495.

Clayton CE. Developmental regulation without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 2002; 21:881–888.

Codd, E. F. A relational model of data for larged shared data banks. *Comm. ACM* 13, 6 (June 1970), 377-387.

Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 2008 Dec; 24(12):2959-63.

Costa JML. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1998; 31(4): 401-403.

CRLeish-IPEC/FIOCRUZ. Protocolos de técnicas diagnósticas das leishmanioses, 2004. 74 p.

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

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

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 1987 Aug 15; 36(16):2633-6.

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

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 2004; 14:1188-1190.

Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science* 2001; 292(5515):285-7.

Curotto de Lafaille MA, Laban A, Wirth DF. Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 Apr 1; 89(7):2703-7.

Dantas-Torres F & Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2006; 48(3):151-156.

Datta AK, Datta R, Sen B. Antiparasitic chemotherapy: tinkering with the purine salvage pathway. *Adv Exp Med Biol* 2008; 625:116-32.

David M, Gabdank I, Ben-David M, Zilka A, Orr I, Barash D, Shapira M. Preferential translation of Hsp83 in *Leishmania* requires a thermosensitive polypyrimidine-rich element in the 3' UTR and involves scanning of the 5' UTR. *RNA* 2010 Feb; 16(2):364-74.

Davidson RN, Croft SL, Scott A, Maini M, Moody AH, Bryceson AD. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet*. 1991; 337(8749): 1061-2.

Dávila AM, Mendes PN, Wagner G, Tschoeke DA, Cuadrat RR, Liberman F, Matos L, Satake T, Ocaña KA, Triana O, Cruz SM, Jucá HC, Cury JC, Silva FN, Geronimo GA, Ruiz M, Ruback E, Silva FP Jr, Probst CM, Grisard EC, Krieger MA, Goldenberg S, Cavalcanti MC, Moraes MO, Campos ML, Mattoso M. ProtozoaDB: dynamic visualization and exploration of protozoan genomes. *Nucleic Acids Res* 2008 Jan; 36 (Database issue):D547-52.

de Roode JC, Culleton R, Bell AS, Read AF. Competitive release of drug resistance following drug treatment of mixed *Plasmodium chabaudi* infections. *Malar J* 2004; 14:33.

Deane LM, Deane MP. [Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara.] *Hospital (Rio J)*. 1954; 45(6): 703-7.

Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De Doncker S, Laurent T, Khanal B, Chappuis F, Dujardin JC. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 (11):4616–4621.

de Boer, M. & Davidson, R. N. Treatment options for visceral leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 4, 187–197 (2006).

de Oliveira-Silva F, de Moraes-Teixeira E, Rabello A. Antileishmanial activity of azithromycin against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2008 May; 78(5):745-9.

Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J*. 2004; 381(2): 405-12.

Desjeux P. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clin Dermatol* 1999 May-Jun; 17(3):317-25.

Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg* 2009 Aug; 11(8):728-30.

Dias FC, Ruiz JC, Lopes WC, Squina FM, Renzi A, Cruz AK, Tosi LR. Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania (Viannia) braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance. *Parasitol Res* 2007 Aug; 101(3):667-76.

Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, Sanchez J, Schuster B, Grogl M. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2001 Dec; 65(6):685-9.

Dobson DE, Scholtes LD, Myler PJ, Turco SJ, Beverley SM. Genomic organization and expression of the expanded SCG/L/R gene family of *Leishmania major*: Internal clusters and telomeric localization of SCGs mediating species-specific LPG modifications. *Mol Biochem Parasitol* 2006 Apr; 146(2):231-41.

Doyle MA, MacRae JI, De Souza DP, Saunders EC, McConville MJ, Liki VA. LeishCyc: a biochemical pathways database for *Leishmania major*. *BMC Syst Biol* 2009 Jun 5; 3:57.

Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics*. 2003; 2(3): 146-55.

Duncan RC, Salotra P, Goyal N, Akopyants NS, Beverley SM, Nakhasi HL. The application of gene expression microarray technology to kinetoplastid research. *Curr Mol Med*. 2004; 4(6): 611-21. Review.

Durand R, Paul M, Pratlong F, Rivollet D, Dubreuil-Lemaire ML, Houin R, Astier A, Deniau M. *Leishmania infantum*: lack of parasite resistance to amphotericin B in a

clinically resistant visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Aug; 42(8):2141-3.

El Fadili K, Drummelsmith J, Roy G, Jardim A, Ouellette M. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. *Exp Parasitol* 2009 Sep; 123(1):51-7.

El Fadili K, Imbeault M, Messier N, Roy G, Gourbal B, Bergeron M, Tremblay MJ, Légaré D, Ouellette M. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-leishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(2): 526-33.

El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulou B, Légaré D, Ouellette M. Role of the ABC Transporter MRPA (*PgpA*) in Antimony Resistance in *Leishmania infantum* Axenic and Intracellular Amastigotes. *Ant Agents Chem* 2005; 49(5):1988-1993.

El-Tabakh, M. Y., Ouzzani, M., and Aref, W. G. (2007). Bdbms - a database management system for biological data. In [DBL 2007], pages 196–206.

Ellenberger TE, Beverley SM. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1989 Sep 5; 264(25):15094-103.

el-On J, Halevy S, Grunwald MH, *et al.* Topical treatment of OldWorld cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27:227–31.

Eschenlauer SC, Faria MS, Morrison LS, Bland N, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Coombs GH, Lima AP, Mottram JC. Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cell Microbiol* 2009 Jan; 11(1):106-20.

Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(6):1872-5.

Esfandiarpour I, Alavi A. Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2002; 41(8): 521-524.

Eue I, Zeising R, Arndt D. Alkylphosphocolineinduced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *J Cancer Res. Clin. Oncol*. 1995; 12: 350 - 356.

Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe CD, Kemp SJ, Noyes HA. An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for *Leishmania donovani* complex, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. *Parasitology* 2008 Apr; 135(5):567-74.

Fernandes AP, Carvalho FA, Tavares CA, Santiago HC, Castro GA, Tafuri WL, Ferreira LA, Gazzinelli RT. Combined interleukin-12 and topical chemotherapy for established Leishmaniasis drastically reduces tissue parasitism and relapses in susceptible mice. *J Infect Dis* 2001 Jun 1; 183(11):1646-52.

Costa Filho AV, Lucas IC, Sampaio RN. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008 Jul-Aug; 41(4):424-7.

Fischer C, Voss A, Engel J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*. 2001; 190: 85-87.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res Microbiol* 2004 May; 155(4):224-30.

Gallego C, Estévez AM, Fárez E, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowska D. Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol* 2005 Jun; 141(2):191-7.

Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 2010 May 11; 169(3-4):327-34.

Gamarro F, Chiquero MJ, Amador MV, Légaré D, Ouellette M, Castanys S. P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* 1994 Jun 1; 47(11):1939-47.

Garaizar J, Brena S, Bikandi J, Rementeria A, Pontón J. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6(7): 987-98. Review.

García N, Figarella K, Mendoza-León A, Ponte-Sucre A. Changes in the infectivity, pyruvate kinase activity, acid phosphatase activity and P-glycoprotein expression in glibenclamide-resistant *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 2000 Nov; 86(11):899-904.

Gasser Jr RA, Magill AJ, Oster CN, Franke ED, Grögl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clinical of Infectious Diseases*. 1994; 18: 83 – 90.

Gazola KCP, Ferreira AVB, Anacleto C, Michalick MSM, Andrade AFB, Moreira ESA. Cell surface carbohydrates and *in vivo* infectivity of glucantime-sensitive and resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell lines. *Parasitol Res* 2001; 87:935-940.

Geretti AM. The clinical significance of viral fitness. *J HIV Ther* 2005; 10(1):6–10.

Gobert GN, Moertel LP, McManus DP. Microarrays: new tools to unravel parasite transcriptomes. *Parasitology*. 2005; 131(Pt 4): 439-48. Review.

Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RC, Cardoso JE, de Oliveira-Silva F, Maciel FC, Rabello A, Ferreira LA. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop* 2005 Feb; 93(2):161-7.

Gontijo B, de Carvalho Mde L. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003 Jan-Feb; 36(1):71-80.

Gontijo CMF; Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004; 7(3): 338-49.

Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem*. 2004; 279(30): 31010-7.

Gourley DG, Schüttelkopf AW, Leonard GA, Luba J, Hardy LW, Beverley SM, Hunter WN. Pteridine reductase mechanism correlates pterin metabolism with drug resistance in trypanosomatid parasites. *Nat Struct Biol* 2001 Jun; 8(6):521-5.

Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 1992 Dec; 86(6):613-20.

Grondin K, Papadopoulou B, Ouellette M. Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 1993 Apr 25; 21(8):1895-901.

Grondin K, Kündig C, Roy G, Ouellette M. Linear amplicons as precursors of amplified circles in methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Res* 1998 Jul 15; 26(14):3372-8.

Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, El Fadili A, Peytavi R, Briand G, Richard D, Messier N, Papadopoulou B, Corbeil J, Bergeron MG, Legare D, Ouellette M. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(20): 5886-96.

Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopoulou B, Ouellette M. Amplification of the ABC transporter gene *Pgpa* and increased trypanothione levels in potassium



antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108:131–135.

Haseloff RF, Krause E, Blasig IE. Proteomics of brain endothelium: Separation of protein by two-dimensional gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Methods Mol Med*. 2003; 89: 465-78.

Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q, Fallah E, Motazedian MH, Sadjjadi SM, Sarkari B. First Report of Natural Infection in Cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009 Jun 3. [Epub ahead of print].

Hayward R, Saliba KJ, Kirk K. *pfmdr1* mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2005; 55:1285–1295.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999; 354:1191-9.

Hochhuth C, Vehmeyer K, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. *Cell Immunol*. 1992; 141: 161 – 168.

Huang X, Madan A. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research*. 1999; 9: 868 - 877.

Ivens, A.C. *et al.*, 2005. The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science* 309, 436–442.

Jha, T. K. *et al.* Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *BMJ* **316**, 1200–1205 (1998).

Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 164:111–117.

Kaminsky R. Miltefosine zentaris. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002; 3: 550 - 554.

Kandpal M, Fouce RB, Pal A, Guru PY, Tekwani BL. Kinetics and molecular characteristics of arginine transport by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1995 May; 71(2):193-201.

Kandpal M, Tekwani BL, Chauhan PM, Bhaduri AP. Correlation between inhibition of growth and arginine transport of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro* by diamidines. *Life Sci* 1996; 59(7):75-80.

Kleczka B, Lamerz AC, van Zandbergen G, Wenzel A, Gerardy-Schahn R, Wiese M, Routier FH. Targeted gene deletion of *Leishmania major* UDP-galactopyranose mutase leads to attenuated virulence. *J Biol Chem* 2007 Apr 6; 282(14):10498-505.

Krolewiecki A, Leon S, Scott P, Abraham D. Activity of azithromycin against *Leishmania major* *in vitro* and *in vivo*. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Sep; 67(3):273-7.

Kündig C, Leblanc E, Papadopoulou B, Ouellette M. Role of the locus and of the resistance gene on gene amplification frequency in methotrexate resistant *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Res* 1999 Sep 15; 27(18):3653-9.

Laison R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In Peters W & Killick-Knedrick R Ed. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press, London, v.1 p.1-120, 1987.

Lainson R. New World leishmaniasis In: The Wellcome History of Tropical Diseases. In Cox FEG (Ed.) v. 4 p. 218, 229, 1996.

Lainson, R., Shaw, J.J., Ryan, L., Silveira, F.T., Fraiha, H., 1983. Leishmaniasis in Brazil. XIX: Visceral leishmaniasis in the Amazon region, and the presence of *L. longipalpis* on the island of Marajó, Para State. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 77, 323-330.

LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 1993; 7: 996–1007.

Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol*. 2007; 152(1): 35-46.

Lenski RE. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Int Microbiol* 1998; 1(4):265–270.

Lima AK, Elias CG, Souza JE, Santos AL, Dutra PM. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. *Parasitology* 2009 Sep; 136(10):1179-91.

Limoncu ME, Balcioglu IC, Yereli K, Ozbel Y, Ozbilgin A. A new experimental *in vitro* culture medium for cultivation of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 1997 Sep; 35(9):2430-1.

Lipoldova, M. & Demant, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat. Rev. Genet.* 2006; 7: 294–305.

Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis*. 1999; 180(2): 564-7.

Lobsiger L, Müller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, Gottstein B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol* 2010 May 11; 169(3-4):408-14.

Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2000 Nov; 111(1):1-14.

Ma C, Tran J, Li C, Ganesan L, Wood D, Morrissette N. Secondary mutations correct fitness defects in *Toxoplasma gondii* with dinitroaniline resistance mutations. *Genetics* 2008; 180(2):845–856.

Maarouf M, Adeline MT, Solignac M, Vautrin D, Robert-Gero M. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite* 1998 Jun; 5(2):167-73.

Maarouf M, Lawrence F, Brown S, Robert-Gero M. Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol Res* 1997; 83(2):198-202.

Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res* 1997 May 1; 232(2):339-48.

Maniatis TM, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor University Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1982.

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

Marsden PD, Sampaio RNR, Carvalho EM, Veiga JPT, Costa JLM, Llanos-Cuentas EA 1985. High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 34(4): 710-713.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ('espundia' Escamel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986; 80: 859-76.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 1992; 63: 82-104.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica*. 1994; 10(2): 359-75.

Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(2): 352-7.

McNicoll F, Drummel-Smith J, Müller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, Papadopoulou B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2006; 6(12): 3567-81.

Melville SE, Leech V, Gerrard CS, Tait A, Blackwell JM. The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol Biochem Parasitol*. 1998; 94: 155–173.

Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors* 2010 Apr 8; 3:34.

Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int*. 2000; 48(3): 265-9.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 2006. Editora do Ministério da Saúde. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 2007; 14(10):1153-69.

Mohebali M, Fotouhi A, Hooshmand B, Zarei Z, Akhoundi B, Rahnema A, Razaghian AR, Kabir MJ, Nadim A. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. *Acta Trop* 2007 Jul; 103(1):33-40.

Momeni AZ & Aminjavaheri M. Treatment of non-healing cases of cutaneous leishmaniasis. Successful treatment using a combination of meglumine antimoniate plus allopurinol. *E.J.D.* 2003; 13: 40–43.

Moreira ESA, Soares RMA, Petrillo-Peixoto ML. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitol Res* 1995; 81:291-295.

Moreira W, Leblanc E, Ouellette M. The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite *Leishmania*. *Free Radic Biol Med* 2009 Feb 1; 46(3):367-75.

Moreira ESA, Anacleto C, Petrillo-Peixoto ML. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitol Res* 1998; 84:720-726.

Moshfe A, Mohebbi M, Edrissian G, Zarei Z, Akhoundi B, Kazemi B, Jamshidi S, Mahmoodi M. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta Trop* 2009 Nov; 112(2):101-5.

Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, Madhubala R. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 2007 Feb; 59(2):204-11.

Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93(19): 10383-7.

Mullen AB, Carter KC, Baillie AJ. Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 Oct; 41(10):2089-92.

Mural RJ. ARTEMIS: a tool for displaying and annotating DNA sequence. *Brief Bioinform*. 2000; 1(2): 199-200.

Murray HW. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 2001 Oct; 82(5):249-67.

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

Mussi SV, Fernandes AP, Ferreira LA. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol Res* 2007 May; 100(6):1221-6.

Nare B, Garraway LA, Vickers TJ, Beverley SM. PTR1-dependent synthesis of tetrahydrobiopterin contributes to oxidant susceptibility in the trypanosomatid protozoan parasite *Leishmania major*. *Curr Genet* 2009 Jun; 55(3):287-99.

Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, Ponte-Sucre A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(6):637–642.

Neal RA, Croft SL, Nelson DJ. Anti-leishmanial effect of allopurinol ribonucleoside and the related compounds, allopurinol, thiopurinol, thiopurinol ribonucleoside, and of formycin B, sinefungin and the lepidine WR6026. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79(1):122-8.

Neal RA, Allen S, McCoy N, Olliaro P, Croft SL. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother* 1995 May; 35(5):577-84.

Nguyen C, Kasinathan G, Leal-Cortijo I, Musso-Buendia A, Kaiser M, Brun R, Ruiz-Pérez LM, Johansson NG, González-Pacanowska D, Gilbert IH. Deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase as a potential antiparasitic drug target. *J Med Chem*. 2005; 48(19): 5942-54.

Olliaro PL, Bryceson A. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today*. 1993; 9: 323-328.

Oliva G, Gradoni L, Ciaramella P, De Luna R, Cortese L, Orsini S, Davidson RN, Persechino A. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother* 1995 Dec; 36(6):1013-9.

Olmo A, Arrebola R, Bernier V, González-Pacanowska D, Ruiz-Pérez LM. Co-existence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 1995 Aug 11;23(15):2856-64.

Orlando TC, Mayer MG, Campbell DA, Sturm NR, Floeter-Winter LM. RNA polymerase I promoter and splice acceptor site recognition affect gene expression in non-pathogenic *Leishmania* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007 Nov; 102(7):891-4.

Ouakad M, Bahi-Jaber N, Chenik M, Dellagi K, Louzir H. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in *Leishmania major* developmental stages. *Parasitol Res* 2007 Jul; 101(2):473-7.

Ouellette M, Papadopolou B 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol Today* 9: 150-153.

Ouellette M, Borst P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol.* 1991; 142(6): 737-46. Review.

Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat.* 2004; 7(4-5): 257-66. Review.

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

Ouellette M, Hetteema E, Wüst D, Fase-Fowler F, Borst P. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. *EMBO J.* 1991; 10(4): 1009-16.

Paris C, Loiseau PM, Bories C, Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Mar; 48(3):852-9.



Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007; 39(7): 839-47.

Perez-Victoria JM, Perez-Victoria JF, Parodi-Talice A, Jimenez IA, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2468–2474.

Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter, a novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* 2003; 278:49965–49971.

Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003; 2(1): 14.

Portaria Interministerial N° 1.426 de 11 de Julho de 2008

Prosdocimi F, Cerqueira GC, Binneck E, Silva AF, Reis AN, Junqueira ACM, Santos ACF, Nhani-júnior A, Wust CI, Camargo-filho F, Kessedjian JL, Petretski JH, Camargo IP, Ferreira RGM, Lima RP, Pereira RM, Jardim S, Sampaio VS, Folgueras-flatschart AV. Bioinformática: Manual do Usuário. *Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento.* 2003; 29: 18-31.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2009 Dec; 136(14):1915-34.

Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Apr; 51(4):1425-30.

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

Requena JM, Soto M, Quijada L, Alonso C. Genes and chromosomes of *Leishmania infantum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(6): 859-862.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65(3):111-25.

Roberts TG, Sturm NR, Yee BK, Yu MC, Hartshorne T, Agabian N, Campbell DA. Three small nucleolar RNAs identified from the spliced leader-associated RNA locus in kinetoplastid protozoans. *Mol Cell Biol* 1998 Aug; 18(8):4409-17.

Rocha RAA, Sampaio RN, Guerra M, Magalhães A, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD 1980. Apparent Glucantime failure in five patients with mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83: 131-139.

Rochette A, Raymond F, Ubeda JM, Smith M, Messier N, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulou B. Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics*. 2008; 9:255.

Rogers PD, Barker KS. Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(11): 3412-7.

Romero GA, Lessa HA, Orge MG, Macêdo VO, Marsden PD. Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two year follow-up. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998 Nov-Dec; 31(6):511-6.

Romero GA, Vinitius De Farias Guerra M, Gomes Paes M, de Oliveira Macêdo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis* 2001 May 1; 32(9):1304-12.

Roy G, Kündig C, Olivier M, Papadopoulou B, Ouellette M. Adaptation of *Leishmania* cells to in vitro culture results in a more efficient reduction and transport of biopterin. *Exp Parasitol* 2001 Mar; 97(3):161-8.

Rutherford K, Parkhill J, *et al.* Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000; 16(10): 944-5.

Sadeghian G, Nilfroushzadeh MA, Iraj F. Efficacy of local heat therapy by radiofrequency in the treatment of cutaneous leishmaniasis, compared with intralesional injection of meglumine antimoniate. *Clin Exp Dermatol* 2007 Jul; 32(4):371-4.

Saha AK, Mukherjee T, Bhaduri A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1986 Jun; 19(3):195-200.

Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol* 2009 Oct; 167(2):81-94.

Saxena A, Worthey EA, Yan S, Leland A, Stuart KD, Myler PJ. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol Biochem Parasitol* 2003 Jun; 129(1):103-14.

Scheinfeld NS, Tutrone WD, Torres O, Weinberg JM. Macrolides in dermatology. *Dis Mon* 2004; 50: 350–368.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270(5235): 467-70.

Schneider TD, Stephens RM. Sequence Logos: A New Way to Display Consensus Sequences. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6097-6100.

Schraner C, Hasse B, Hasse U, Baumann D, Faeh A, Burg G, Grimm F, Mathis A, Weber R, Günthard HF. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin Infect Dis* 2005 Jun 15; 40(12):120-4.

Seifert K, Croft SL. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jan; 50(1):73-9.

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

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Dec; 42(12):3097-102.

Sereno D, Holzmüller P, Lemesre JL. Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Trop* 2000 Jan 5; 74(1):25-31.

Shakarian AM, McGugan GC, Joshi MB, Stromberg M, Bowers L, Ganim C, Barowski J, Dwyer DM. Identification, characterization, and expression of a unique secretory lipase from the human pathogen *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* 2010 Mar 27.

Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2001; 276(6): 3971-6.

Sherwood JA, Gachihi GS, Muigai RK, Skillman DR, Mugo M, Rashid JR, Wasunna KM, Were JB, Kasili SK, Mbugua JM, *et al.* Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1994 Dec; 19(6):1034-9.

Shimony O, Jaffe CL. Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. *J Microbiol Methods* 2008 Oct; 75(2):196-200.

Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001 Apr; 96(3):285-91.

Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella Mdel C, Riarte A, Krolewiecki AJ. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007 Nov-Dec; 40(6):627-30.

Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C, Engel J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.*, in press, 2003.

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

Singh N, Almeida R, Kothari H, Kumar P, Mandal G, Chatterjee M, Venkatachalam S, Govind MK, Mandal SK, Sundar S. Differential gene expression analysis in antimony-unresponsive Indian kala azar (visceral leishmaniasis) clinical isolates by DNA microarray. *Parasitology* 2007 Jun; 134(Pt 6):777-87.

Smith M, Blanchette M, Papadopoulou B. Improving the prediction of mRNA extremities in the parasitic protozoan *Leishmania*. *BMC Bioinformatics* 2008 Mar 20; 9:158.

Soto J, Toledo JT. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*. 2007; 7: 7-7.

Soto M, Requena JM, Morales G, Alonso C. The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent Nterminal domain. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1219: 533535.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(9): 1266-72.

Srividya G, Duncan R, Sharma P, Raju BV, Nakhasi HL, Salotra P. Transcriptome analysis during the process of in vitro differentiation of *Leishmania donovani* using genomic microarrays. *Parasitology* 2007 Oct; 134(Pt 11):1527-39.

Stiles JK , Hicok PI, Shah PH, Meade JC. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999; 93: 781-807.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1104–1107.

Sundar, S. *et al*. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2571–2581 (2007).

Sundar, S., 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Intern Health* 6, 849–854.

Tanaka AK, Valero VB, Takahashi HK, Straus AH. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* growth and infectivity by aureobasidin A. *J Antimicrob Chemother* 2007 Mar; 59(3):487-92.

Tanyuksel M, Bas AL, Araz E, Aybay C. Determination of intracellular efficacies of azithromycin against *Leishmania major* infection in human neutrophils *in vitro*. *Cell Biochem Funct* 2003 Mar; 21(1):93-6.

Thakur CP, Thakur S, Narayan S, Sinha A. Comparison of treatment regimens of kala-azar based on culture & sensitivity of amastigotes to sodium antimony gluconate. *Indian J Med Res* 2008 Jun; 127(6):582-8.

Thakur CP. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (=paromomycin)-antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 86: 615-616.

Timmers LF, Pauli I, Barcellos GB, Rocha KB, Caceres RA, de Azevedo WF Jr, Soares MB. Genomic databases and the search of protein targets for protozoan parasites. *Curr Drug Targets* 2009 Mar; 10(3):240-5.

Tiphine M, Letscher V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transplant Infect Dis.* 1999; 1: 273-283.

Tracy JW, Webster Júnior LT. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários: malária. In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003. cap.40 p.803-822.

Turgay N, Delibag SB, Erdogan DD, Ozbel Y. Cellular immune response of patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa. *Turkiye Parazitol Derg* 2006; 30(1):7-10.

Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* 2008; 9(7):R115.

Ullman, B., 1995. Multidrug resistance and P-glicoprotein in parasitic protozoa. *J Bioenerg Biomemb* 27, 77-84.

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

Van den Ijssel P, Tijssen M, Chin SF, Eijk P, Carvalho B, Hopmans E, Holstege H, Bangarusamy DK, Jonkers J, Meijer GA, Caldas C, Ylstra B. Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(22): e192.

Van Voorhis WC. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs* 1990 Aug; 40(2):176-202.

Vehmeier K, Scheurich P, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine-mediated enhancement of T-cell responses to interleukin 2. *Cell Immunol.* 1991; 137: 232–238.

Victoir K, Dujardin JC. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends Parasitol* 2002 Feb; 18(2):81-5.

Walliker D, Hunt P, Babiker H. Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Trop* 2005; 94:251–259, Review.

Wasunna MK, Rashid JR, Mbui J, Kirigi G, Kinoti D, Lodenyo H, Felton JM, Sabin AJ, Albert MJ, Horton J. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2005 Nov; 73(5):871-6.

Werneck GL, Rodrigues L, Santos MV, Araújo IB, Moura LS, Lima SS, Gomes RB, Maguire JH, Costa CH. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop* 2002 Jul; 83(1):13-8.

WHO. Organização Mundial da Saúde. <http://www.who.int/leishmaniasis/> acessado em 03/01/2010.

Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, Aznar C, Liegeard P, Hontebeyrie M, Noireau F, Morel CM, Brenière SF. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serology and parasitological diagnosis. *Parasitology.* 1997; 114: 367-373.



Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2004; 279(38): 39925-32.

Yardley V, Croft SL. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 Apr; 41(4):752-6.

Zeiner G, Sturm N, Cambell D. The *Leishmania tarentolae* splice leader contains determinants for association with polysomes. *J Biol Chem*. 2003; 278: 38269–38275.

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. *J Biol Chem*. 2004; 279(36): 37445-51.