

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

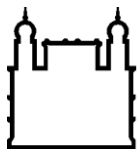
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Leishmania braziliensis* E *Leishmania guyanensis* E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA AO  
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA NO BRASIL**

**DAVI COE TORRES**

**Rio de Janeiro**

**2009**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**DAVI COE TORRES**

Caracterização molecular de isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* e sua associação com a resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina no Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador (es):** Dra. Elisa Cupolillo

Dr. Alberto M. R. Dávila

**Rio de Janeiro**

**2009**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

T693

Torres, Davi Coe.

Caracterização molecular de isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* e sua associação com a resposta terapêutica ao antimoníato de meglumina no Brasil / Davi Coe Torres. – Rio de Janeiro, 2009.

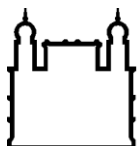
xx, 140 f. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 118-139

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Marcador molecular. 3. Resposta Terapêutica. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**AUTOR: DAVI COE TORRES**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania braziliensis* E *Leishmania guyanensis* E SUA ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA NO BRASIL**

**ORIENTADOR (ES): Dra. Elisa Cupolillo**

**Dr. Alberto M. R. Dávila**

**Aprovada em: 15/04/2009**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Milton Ozório Moraes (Presidente)**

**Dra. Yara Maria Traub-Cseko (Membro)**

**Prof. Dr. Paulo Cesar Cotrim (Membro)**

**Dr. Marcelo Alves Ferreira (1º Suplente)**

**Dr. Marcelo Ribeiro Alves (2º Suplente)**

A meus pais, José Ramalho e  
Waldiza, e a minha irmã, Ana  
Carolina.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Alberto M. R. Dávila e Dra. Elisa Cupolillo, pelo seu apoio e paciência imprescindíveis para a realização deste trabalho. Os seus ensinamentos e conselhos me auxiliaram e me ajudarão na minha formação como futuro pesquisador.

Ao Dr. Jean-Claude Dujardin, por ter me aceito em seu laboratório no Instituut voor Tropische Geneeskunde no qual foi realizado parte do meu projeto de mestrado. Seu apoio e orientação foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Milton O. Moraes, por ter aceitado revisar a minha dissertação e participar desta banca examinadora. Suas sugestões foram valiosíssimas para a escrita deste trabalho.

A Dra. Yara M. Traub-Cseko, por ter aceitado participar desta banca examinadora e pelos conselhos que tanto melhoraram este trabalho. Além disso, pelo apoio e compreensão no desenvolvimento de parte deste trabalho em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo C. Cotrim, por ter aceitado participar desta banca examinadora e pelas suas sugestões neste trabalho.

Ao Dr. Marcelo R. Alves, por ter aceitado participar desta banca examinadora e pelo seu grande apoio e colaboração no desenvolvimento da análise estatística, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo A. Ferreira, por ter aceitado participar desta banca examinadora e pelas suas sugestões no melhoramento deste trabalho.

Ao Dr. Gabriel Grimaldi Filho, pelo apoio no seu laboratório de Pesquisa em Leishmaniose e pelas discussões sobre a leishmaniose.

Ao Dr. Jorge Arevalo, pela comunicação pessoal e discussões no âmbito de mecanismos de resistência a drogas em *Leishmania*.

Ao Dr. Alexandre Peixoto e ao Robison, pelo apoio científico e fornecimento de células competentes para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Renato Porrozzì, pelas discussões sobre leishmaniose.

À Ms. Vanessa Adui, pela amizade, conselhos e ensinamentos no âmbito do perfil de expressão gênica de *Leishmania*, que tanto colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Biologia Computacional e Sistema, e Biologia Molecular de Parasitos e Vetores; pela amizade e apoio que tornaram o local de trabalho, ao mesmo tempo, sério e divertido.

Aos colegas da Unidade de Parasitologia Molecular do Instituut voor Tropische Geneeskunde, pela acolhida, apoio e amizade no seu Instituto de Pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos e do Laboratório de Hanseníase, pelo apoio e ajuda na utilização de equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Silvana, Mariana, Priscila, Joana, Naty, Leonardo Alves, Leonardo Rocha, Kary, Diogo, Ana Bahia, Gabriel e Erich, pela amizade e ajuda a superar uma série de etapas na realização do presente trabalho.

Aos colegas Felipe, Grazi, Leonardo Alves, Bárbara, Caroline e Hellen, pela obtenção e caracterização dos parasitos utilizados no presente trabalho.

À Plataforma de Genômica - seqüenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ, em especial a Aline e Andressa, pelo apoio e trabalho no seqüenciamento das amostras estudadas no presente trabalho.

A todos os Professores e Pesquisadores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, que contribuíram na minha formação como futuro pesquisador.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo apoio e auxílios concedidos durante o meu mestrado acadêmico.

À secretaria acadêmica pelo apoio e atenção na solução de problemas adversos que surgiram durante o meu mestrado acadêmico.

A todos os funcionários do Pavilhão Leônidas Deane, pelo apoio e dedicação a pesquisa.

Ao meu primo Leonardo Nunes, pela sua inestimável amizade, companheirismo e força durante os bons e maus momentos.

À Érika Carvalho, pela companhia, compreensão e paciência. Sua amizade e carinho são inestimáveis.

Aos meus pais e minha irmã, pela confiança, paciência e dedicação incondicionais em todos os momentos de minha vida.

A todos que de algum modo me ajudaram neste trabalho.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO COM O APOIO FINANCEIRO  
DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Instituut voor Tropische Geneeskunde (Antuérpia, Bélgica).

Leishepinet-SA project (EU-FP6 : INCO-CT2005-015407).

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro  
– FAPERJ.



“Na longa história da humanidade (e também dos animais)  
aqueles que aprenderam a colaborar e a improvisar  
de forma mais eficaz foram os que prevaleceram.”

Charles Darwin

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Epidemiologia, infecção e clínica.....	21
1.2. Leishmaniose Cutânea Americana.....	24
1.3. Classificação de <i>Leishmania</i> Ross, 1993.....	27
1.4. Características moleculares de <i>Leishmania</i> spp. ....	29
1.5. Tratamento da Leishmaniose.....	30
1.6. Mecanismos de ação do antimônio pentavalente na leishmaniose.....	32
1.7. Mecanismos de resistência ao antimônio em <i>Leishmania</i> .....	36
1.8. Falha terapêutica X Resistência a drogas.....	40
1.9. Epidemiologia molecular.....	42
1.10. Marcadores moleculares em protozoários patogênicos.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
2.1. Objetivo geral.....	46
2.2. Objetivos específicos.....	46
3. METODOLOGIA.....	47
3.1. Desenho experimental.....	47
3.2. Obtenção da cultura de parasitos.....	47
3.3. Análise das seqüências de DNA.....	47
3.3.1. Isolamento de DNA.....	47
3.3.2. Análise da qualidade do DNA genômico.....	52
3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose a pH neutro.....	52
3.3.4. Amplificação dos genes em estudo por reação em cadeia da DNA polimerase.....	53
3.3.5. Purificação dos fragmentos amplificados.....	55
3.3.6. Clonagem dos fragmentos purificados.....	55
3.3.7. Transformação dos produtos da ligação em células de <i>Escherichia coli</i> .....	59
3.3.8. Extração do DNA plasmidial.....	62
3.3.9. Seqüenciamento dos clones transformados.....	62

3.3.10. Montagem das seqüências.....	63
3.3.11. Busca por similaridade das seqüências geradas, em um banco de dados de seqüências nucleotídicas.....	66
3.3.12. Consenso das seqüências dos clones geradas.....	66
3.3.13. Análise da diversidade nucleotídica observada.....	66
3.3.14. Análise de agrupamento hierárquico das seqüências de DNA.....	67
3.4. Análise de expressão gênica.....	68
3.4.1. Isolamento de RNA.....	68
3.4.2. Remoção do DNA contaminante.....	69
3.4.3. Quantificação e análise da qualidade do RNA total.....	69
3.4.4. Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real quantitativo (qPCR).....	70
3.4.5. Quantificação dos níveis de expressão.....	72
3.4.6. Análise estatística.....	74
3.4.7. Análise de agrupamento hierárquico dos perfis de expressão gênica.....	75
4. RESULTADOS.....	76
4.1. Análise das seqüências de DNA geradas.....	76
4.1.1. Seqüências consenso e diversidade genética.....	76
4.1.1.1. Gene AQP1.....	76
4.1.1.2. Gene HSP70.....	81
4.1.1.3. Gene MRPA.....	82
4.1.1.4. Gene TR.....	84
4.1.2. Evidência de recombinação e pressão seletiva.....	85
4.1.3. Modelo de regressão logística múltiplo e análise de agrupamento.....	87
4.2. Análise do perfil de expressão gênica.....	92
5. DISCUSSÃO.....	103
6. CONCLUSÕES.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
8. ANEXOS.....	140

## LISTA DE FIGURAS

			Página
Figura	1	– Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> . Fonte: Reithinger <i>et al.</i> (2007).....	23
Figura	2	– Desenho esquemático da distribuição geográfica dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea no Brasil. Fonte: Grimaldi <i>et al.</i> (1987); adaptado de Marzochi & Marzochi (1994).....	25
Figura	3	– Desenho experimental desenvolvido para a abordagem de seqüenciamento de DNA e análise de genes relacionados à resistência a drogas em isolados clínicos de <i>Leishmania</i> apresentando diferentes respostas terapêuticas.....	48
Figura	4	– Desenho experimental desenvolvido para a análise do perfil de expressão de genes relacionados à resistência a drogas em promastigotas de isolados clínicos de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> apresentando diferentes respostas terapêuticas, cultivados e coletados em duplicata e em duas fases do crescimento do parasito.....	49
Figura	5	– Desenho esquemático do mapa circular do <i>pGEM®-T Easy Vector</i> com pontos de referência da sua seqüência nucleotídica.....	60
Figura	6	– Desenho esquemático dos genes em estudo e da região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados. As colunas horizontais (cor azul) correspondem à região codificante, pequenos retângulos lado a lado (cor azul) exprimem que há uma continuidade da região codificante que não foi estudada, as regiões em verde ou vermelho correspondem a alguns domínios da proteína, enquanto as linhas em preto representam as regiões não codificantes. Gene: AQP1 (domínio MIP – <i>Major Intrinsic Protein</i> , região intermembranar da proteína), HSP70 (domínio HSP70), MRPA parcial (TM – domínio transmembrana; ATPase – domínio de ligação ao ATP) e TR parcial (Pyr. – Redox – lig. a FAD: domínio oxidoreductor piridina nucleotídeo-dissulfídica com ligação a FAD <sup>+</sup> ; Pyr. – Redox – lig. a NAD: domínio oxidoreductor piridina nucleotídeo-dissulfídica com ligação a NAD <sup>+</sup> ; Pyr. – Redox – Dimer.: domínio de dimerização e oxidoreductor piridina nucleotídeo-dissulfídica).....	65
Figura	7	– Gráfico representando a curva de acúmulo de fluorescência (preto) utilizando a função logística de 5 parâmetros e a representação da função da sua primeira (vermelho) e segunda (verde) derivada. O ponto de interseção da linha vertical verde, que parte do ponto de máxima da função de segunda derivada com a curva de acúmulo de fluorescência corresponde ao ponto característico da amostra (Cq ou CpD2) e com a curva de eficiência (azul) corresponde à eficiência de amplificação da amostra (Eff.). Fonte: Ritz <i>et al.</i> (2008).....	73

- Figura 8 – Comparação da diversidade genética por sítio ( $\pi$ ) em diferentes posições dentro dos genes AQP1 (A e B) e TR (E e F), e na região seqüenciada referente a porção 3' codificante do gene MRPA (C e D), compreendida até a posição 1291, seguida de ~500pb de região não codificante. Os valores de  $\pi$  foram obtidos dentro de uma janela de comprimento de 100pb mudando de posição a cada 25pb, com o auxílio do programa DnaSP. LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*; CT: Cura terapêutica; FT: Falha terapêutica..... 80
- Figura 9 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes AQP1 (6 grupos) e HSP70 (7 grupos) em *L. braziliensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em AQP1 foi de 0,97 e em HSP70 de 0,96. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos..... 88
- Figura 10 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes MRPA (8 grupos) e TR (4 grupos) em *L. braziliensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em MRPA foi de 0,87 e em TR de 0,98. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos..... 89
- Figura 11 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes AQP1 (5 grupos) e HSP70 (2 grupos) em *L. guyanensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em AQP1 foi de 0,97 e em HSP70 de 1. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos..... 90
- Figura 12 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes MRPA (2 grupos) e TR (2 grupos) em *L. guyanensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em MRPA foi de 0,99 e em TR de 0,99. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos..... 91

- Figura 13 – Exemplo de curvas de amplificação (em preto) aplicando-se o modelo sigmóide de 5 parâmetros nos 6 genes em estudo, as triplicatas da reação estão representadas através de círculos. Em cada gráfico, no eixo y a esquerda há os valores brutos de fluorescência, enquanto a direita há os valores de eficiência, já no eixo x correspondem aos ciclos de amplificação. Estão demonstrados as curvas de eficiência (azul), a primeira (vermelho) e segunda (verde) função derivada da curva de acúmulo de fluorescência. LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*.... 93
- Figura 14 – Gráficos em *box-plot* da comparação dos valores de ciclo de quantificação (Cq) e de eficiência da reação em *L. braziliensis* (LB) e *L. guyanensis* (LG). A linha horizontal em negrito para cada organismo corresponde à mediana, a linha superior e inferior do quadrante corresponde a 50% dos valores daquele limite, enquanto a linha horizontal restante a 95%..... 94
- Figura 15 – Gráfico representando a determinação do número ótimo de genes controles para a normalização dos níveis de expressão gênica. Análise da variação par a par ( $V_{n/n+1}$ ) entre os fatores de normalização (NF) a cada adição de um gene controle: ■ variação entre o NF dos dois genes com expressão mais estável e o restante; ■ variação entre o NF dos três genes com expressão mais estável e o restante; ■ variação entre o NF dos quatro genes com expressão mais estável e o restante; □ variação entre o NF dos cinco genes com expressão mais estável e o restante. LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*, CT: Cura terapêutica; FT: Falha terapêutica; Fase 1: fase logarítmica tardia da curva de crescimento de promastigotas; Fase 2: fase estacionária da curva de crescimento de promastigotas; Todos: todas as amostras. O detalhamento dos grupos e a ordem dos genes com expressão mais estável encontram-se na tabela 14 (página 95)..... 96
- Figura 16 – Média dos níveis de expressão normalizados em promastigotas de *L. guyanensis* (LG) e *L. braziliensis* (LB) nos quatro genes alvo AQP1,  $\gamma$ -GCS, MRPA e TR. As barras correspondem ao erro padrão. \* Grupos significativamente diferentes entre si dentro de cada gene ( $P < 0,05$ ). Foram utilizados diferentes escalas para cada gene..... 98
- Figura 17 – Média dos níveis de expressão normalizados relacionado a interação de primeira ordem entre espécie (LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*) e resposta terapêutica (Cura e Fal. [Falha]) em promastigotas dos parasitos em estudo nos quatro genes alvo AQP1,  $\gamma$ -GCS, MRPA e TR. As barras correspondem ao erro padrão. \* Grupos significativamente diferentes entre si ( $P < 0,05$ ). \*\* Grupos significativamente diferentes entre si ( $P = 0,057$ ). Foram utilizados diferentes escalas para cada gene..... 99

Figura 18	– Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico utilizando a distância de Manhattan e o método de ligação <i>single linkage</i> do conjunto de dados de expressão normalizados completo (A), apenas com amostras de <i>L. braziliensis</i> (B) e apenas com amostras de <i>L. guyanensis</i> (C). Abaixo ou acima da base de cada grupo determinado há um *. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do grupo amostral) representando a distância de Manhattan entre os diferentes grupos.....	100
Figura 19	– Gráfico obtido pelo escalonamento multidimensional (Mapeamento de Sammon) para todos os dados de expressão normalizados. As dimensões 1 e 2 correspondem às coordenadas que melhor preservam pequenas distâncias entre pares de expressão amostral (distância de Manhattan ou <i>city-block</i> ).....	101
Figura 20	– Agrupamentos em formato <i>heatmap</i> utilizando a distância de Manhattan e o método de ligação <i>single linkage</i> do conjunto de dados de expressão normalizados demonstrando o perfil de expressão amostral em cada gene alvo. Cada linha corresponde ao perfil de expressão amostral e cada coluna ao perfil de expressão do determinado gene. Quanto mais vermelho escuro maior será o valor de expressão amostral no determinado gene e quanto mais azul escuro menor.....	102
Figura 1 Suple.	– Média dos níveis de expressão normalizados para a interação de segunda ordem (espécie: resposta terapêutica: fase da curva de crescimento) nos quatro genes alvo AQP1, $\gamma$ -GCS, MRPA e TR. As barras correspondem ao erro padrão. Cura: isolados de cura terapêutica; Fal.: isolados de falha terapêutica; log-t: fase logarítmica tardia da curva de crescimento de promastigotas; Est.: fase estacionária da curva de crescimento de promastigotas. * Grupos significativamente diferentes entre si dentro de cada gene ( $P < 0,05$ ). Foram utilizados diferentes escalas para cada gene.....	140

## LISTA DE TABELAS

			Página
Tabela	1	– Regimes dos tratamentos recomendados com as drogas mais comumente usadas no combate a leishmaniose cutânea e seus efeitos adversos. Fonte: Murray <i>et al.</i> (2005); Reithinger <i>et al.</i> (2007); Santos <i>et al.</i> (2008).....	33
Tabela	2	– Dados clínicos, origem geográfica e identidade das amostras de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> em estudo, depositadas na Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), com as respectivas análises realizadas.....	50
Tabela	3	– Dados clínicos, origem geográfica e identidade das amostras de <i>L. (Viannia) guyanensis</i> em estudo, depositadas na Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), com as respectivas análises realizadas.....	51
Tabela	4	– Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões alvo.....	54
Tabela	5	– Componentes e sua concentração final da reação em cadeia da DNA polimerase das regiões referentes aos genes HSP70, MRP1 e TR.....	56
Tabela	6	– Componentes e sua concentração final da reação em cadeia da DNA polimerase da região referente ao gene AQP1.....	56
Tabela	7	– Condições térmicas da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) utilizadas nas reações de amplificação das regiões em estudo para as amostras de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> .....	57
Tabela	8	– Protocolo da reação de ligação dos fragmentos purificados da PCR no <i>pGEM®-T Easy Vector</i> .....	61
Tabela	9	– Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento das regiões alvo.....	64
Tabela	10	– Características, seqüência e condições dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.....	71
Tabela	11	– Características do alinhamento e parâmetros de diversidade genética de todos os genes nas espécies em estudo.....	77
Tabela	12	– Localização das mutações de base única identificadas pelo método de seqüenciamento de DNA nos genes em estudo, assim como as mutações na seqüência de aminoácidos traduzida, que permitem a discriminação das espécies <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> .....	78
Tabela	13	– Valores dos testes de evolução neutra nos genes e grupos de interesse.....	86
Tabela	14	– Ordem dos níveis de expressão gênica mais estáveis em cada grupo descrito abaixo.....	95

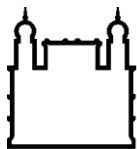


## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
3'-UTR	Região 3' não traduzida
A	Adenina
aa	Aminoácidos
ABC	Proteínas transportadoras de ligação ao ATP ( <i>ATP-binding cassette</i> )
a.C.	<i>ante Christum</i>
ACR2	Arsenato redutase 2
AIC	<i>Akaike's Information Criterion</i>
ANOVA	Análise de variância
AQP1	Gene da aquagliceroporina 1
AsV	Arsenato pentavalente
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
CpD2	Ciclo do ponto de máxima da função de segunda derivada curva de acúmulo de fluorescência de uma reação de qPCR
Cq	Ciclo de quantificação
CT	Cura terapêutica
CV	Coeficiente de variação
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dN	Taxa de mutações não sinônimas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
dS	Taxa de mutações sinônimas
D <sub>xy</sub>	Número médio de substituições nucleotídicas por sítio entre dois grupos
E ou Eff.	Eficiência de amplificação da qPCR
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídeo
FAD <sup>+</sup>	Flavina adenina dinucleotídeo
FT	Falha terapêutica
γ-GCS	γ-glutamilcisteína sintetase
g	Gramas
G	Guanina
GET	Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0

GS	Glutathiona sintetase
GSH	Glutathiona
h	Horas
H	Número de haplótipos
HCl	Ácido clorídrico
Hd	Diversidade dos haplótipos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSP70	Gene da <i>heat-shock protein 70</i>
<i>indels</i>	Inserção e/ou deleção nucleotídica
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
K	Diferença média de nucleotídeos par a par
KCl	Cloreto de Potássio
kDNA	Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
K <sub>xy</sub>	Diferença média de nucleotídeos par a par entre dois grupos
L	Litros
<i>lacZ</i>	Gene da β-galactosidase
LB	<i>Leishmania braziliensi</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LV	Leishmaniose visceral
LRR	Proteínas ricas em repetições de leucina
M	Concentração molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MLEE	Eletroforese de multilocus enzimático
min	Minuto
MIP	<i>Major Intrinsic Protein</i>
MRPA	Gene da proteína associada à resistência a múltiplas drogas A
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
N	Concentração normal
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico
NaOH	Hidróxido de sódio
NF	Fator de normalização

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
NO	Óxido nítrico
ODC	Gene da ornitina descarboxilase
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pi (π)	Diversidade nucleotídica, expressa pela média do número de substituições nucleotídicas par a par
qPCR	PCR quantitativo
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Ácido ribonucléico interferência
rpm	Rotações por minuto
SbIII	Antimônio trivalente
SbV	Antimônio pentavalente
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
T	Timina
Taq DNA	DNA Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM, pH8,0
TDR1	Gen da redutase dependente de tiol
TE	Tampão Tris-HCl 100mM, EDTA 1mM, pH 8,0
TM	Domínio transmembrana
Tris	Tris-hidróxiaminometano
TR	Gene da tripanotiona redutase
TSH	Tripanotiona
TryP	Gene da triparedoxina peroxidase
U	Unidade de atividade enzimática por minuto
UV	Ultra-violeta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

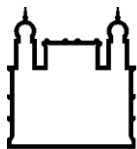
**Caracterização molecular de isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* e sua associação com a resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina no Brasil**

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Davi Coe Torres**

No Brasil, a leishmaniose cutânea (LC) constitui um importante problema de saúde pública, apresentando cerca de 28.000 novos casos reportados anualmente pelo Ministério da Saúde. Sete espécies de *Leishmania* causam a LC no Brasil, no qual a *L. braziliensis* e a *L. guyanensis* aparentam ser as mais prevalentes. Nos últimos anos, vem sendo reportados casos clínicos que não respondem ao tratamento. O fenômeno de falha terapêutica é complexo e dentre os vários fatores envolvidos está o fenótipo de resistência a drogas no parasito. Portanto, é fundamental identificar marcadores moleculares relacionados à resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina na LC causada por isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no Brasil. Neste estudo analisou-se isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* obtidos de pacientes com diferentes respostas terapêuticas, observando o polimorfismo das seqüências de DNA de regiões referentes aos genes AQP1, HSP70, MRPA e TR. Além disso, através da técnica de PCR em tempo real quantitativo, realizou-se uma análise do perfil de expressão de quatro genes alvo que codificam proteínas com função de transporte (AQP1 e MRPA) e metabolismo óxido-redutor ( $\gamma$ -GCS e TR). A variabilidade das seqüências estudadas sugere que *L. braziliensis* é mais heterogênea que *L. guyanensis*, corroborando com estudos anteriores. Uma análise de agrupamento hierárquico não revelou uma associação da resposta terapêutica com as seqüências em estudo. Através de um modelo de regressão logística múltiplo foi observado um polimorfismo na posição 1735 do gene HSP70 com chance 7,3 vezes maior de que isolados de *L. braziliensis* que apresentem uma guanina ao invés de uma adenina estejam associados à falha terapêutica. Também, foram observadas várias mutações não sinônimas nos genes em estudo que podem promover alterações na estrutura e atividade da proteína e, portanto, estarem relacionadas ao fenótipo de resistência a drogas em *Leishmania*. O perfil de expressão gênica observado revelou que a diferença entre as fases de crescimento de promastigotas em estudo não foi informativo. Então, considerando-se apenas a espécie e a resposta terapêutica, foi observado que o gene  $\gamma$ -GCS está superexpresso em isolados de falha terapêutica em *L. guyanensis*, indicando o potencial deste gene para ser utilizado no prognóstico da leishmaniose cutânea. Portanto, o presente trabalho enaltece que a diversidade fenotípica em *Leishmania* está além das informações presentes no genoma, podendo ser em parte explicada pelos diferentes níveis de expressão gênica observado entre os parasitos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Molecular characterization of clinical isolates from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* and its correlation with the therapeutic response to meglumine antimoniate in Brazil**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER'S THESIS**

**Davi Coe Torres**

Cutaneous leishmaniasis (CL) represents an important public health problem in Brazil, with over 28.000 new cases reported annually by the Ministry of Health. At least, seven *Leishmania* species are responsible for CL in Brazil, where *L. braziliensis* and *L. guyanensis* are the most prevalent. In the last years, non responsiveness clinical cases to the regular treatment have been reported. The phenomenon of therapeutic failure is complex and within several involved factors there is the parasite drug resistance phenotype. Thereafter, it is fundamental to identify molecular markers related to the therapeutic response to meglumine antimoniate in CL caused by *L. braziliensis* and *L. guyanensis* in Brazil. In the present study, clinical isolates of *L. braziliensis* and *L. guyanensis* from patients with different treatment outcome were analyzed, observing the DNA sequence polymorphisms from regions referred to the genes AQP1, HSP70, MRPA and TR. In addition, gene expression profile was accessed by quantitative real time PCR targeting four genes encoding proteins with different functions, including transport (AQP1 and MRPA) and redox metabolism ( $\gamma$ -GCS and TR). The genetic variability observed from the DNA sequences suggests that *L. braziliensis* is more heterogeneous than *L. guyanensis*, corroborating previous studies. The hierarchical cluster analysis did not show an association between the therapeutic response and the DNA sequences obtained. Using a multiple model of logistic regression, it was observed a polymorphism in the position 1735 of the HSP70 gene with odds ratio of 7.3 times to an isolate from *L. braziliensis* to be related to therapeutic failure when there is a guanine instead of an adenine. Several non synonymous mutations were also observed in the genes studied which could promote changes in the structure and activity of the protein and, thereby be related to the drug resistance phenotype in *Leishmania*. The genetic expression profile did not reveal any informative information in relation to the growth curve phases studied. Therefore, only the species and the therapeutic response were considered. In *L. guyanensis* the gene  $\gamma$ -GCS was overexpressed in therapeutic failure isolates, suggesting the potential of this gene to be used in the prognostic of the CL. This work emphasize that the phenotypic diversity of *Leishmania* is beyond the genome information and it could be in part explained by the different levels of genetic expression observed among the parasites.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Epidemiologia, infecção e clínica

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por um protozoário hemoflagelado do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), o qual infecta uma gama de espécimes de mamíferos, incluindo o homem. É uma doença endêmica em 88 países, sendo prevalente em regiões tropical e subtropical, com uma estimativa de 12 milhões de casos globalmente e uma população de 350 milhões em risco (Ashford *et al.*, 1992). Entretanto o número de casos é provavelmente subestimado, uma vez que a leishmaniose é apenas reportada compulsoriamente em 40 dos 88 países na qual é presente (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>). Atualmente, alguns fatores emergentes, como a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a migração humana, promovem a expansão da doença (Desjeux, 2001).

A leishmaniose é caracterizada por diferentes manifestações clínicas, constituindo um grave problema de saúde pública (WHO, 2002). Tradicionalmente, é classificada em: (i) leishmaniose cutânea (LC), provocada por úlceras cutâneas auto resolutivas; (ii) leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) que provoca a destruição maciça de tecidos cutâneos e subcutâneos e (iii) leishmaniose visceral (LV) que envolve a infecção do fígado dentre outros órgãos, podendo levar ao óbito se não tratada. O Brasil apresenta a maior prevalência de LC nas Américas (Grimaldi *et al.*, 1989), além de estar dentre os cinco países com maior incidência de LV (Desjeux, 1996). Desde 1995, ambas as formas da doença continuam em expansão no país, com uma taxa de incidência anual de 35.000 casos de LC e 4.000 de LV (CENEPI/FUNASA, 2005). Esse crescimento poderia ser em parte explicado por um melhoramento no diagnóstico e notificação dos casos (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Contudo, também poderia ser resultado de um controle ineficaz do vetor como do hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2008), aumento da detecção da doença devido à associação com infecções oportunistas (Alvar *et al.*, 2008) e a emergência de parasitos resistentes a drogas (Giudice *et al.*, 2007).

*Leishmania* spp. é um parasito unicelular e heteróxico, transmitido entre diversos mamíferos por insetos vetores do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, a forma promastigota (longas,

flageladas e extracelulares) do parasito é inoculada no hospedeiro vertebrado, geralmente infectando células do sistema imune fagocitário (Figura 1). Dentro dos fagolissomos de macrófagos residentes, promastigotas se transformam em amastigotas (esféricos, intracelulares e sem flagelo) e se replicam, podendo infectar outras células, espalhando-se pelos diversos tecidos do organismo. O ciclo continua quando um flebotomíneo se alimenta de um hospedeiro infectado, ingerindo parasitos que irão se reproduzir no seu trato digestivo, transformando-se novamente em promastigotas. Após um estágio de maturação, é alcançada a forma metacíclica infectante na glândula salivar do inseto. Então, o ciclo é completado quando numa próxima alimentação do inseto, parasitos são novamente inoculados em algum hospedeiro vertebrado.

O controle da leishmaniose baseia-se somente na quimioterapia, uma vez que vacinas contra este parasito ainda estão em desenvolvimento (Palatnik-de-Sousa, 2008). Antimoniais pentavalentes e seus derivados vêm sendo utilizados como a primeira linha de drogas para todas as formas de leishmaniose a mais de 60 anos. Entretanto, os seus efeitos adversos, a rotina de administração da droga e seu custo colaboram para uma alta desistência ao tratamento atual (Palacios *et al.*, 2001). Concomitantemente, um grande número de casos clínicos que não respondem ao tratamento vem sendo reportado nos últimos anos (Croft *et al.*, 2006). Portanto, designar um tratamento adequado para pacientes infectados com leishmaniose esta se tornando uma tarefa cada vez mais difícil.

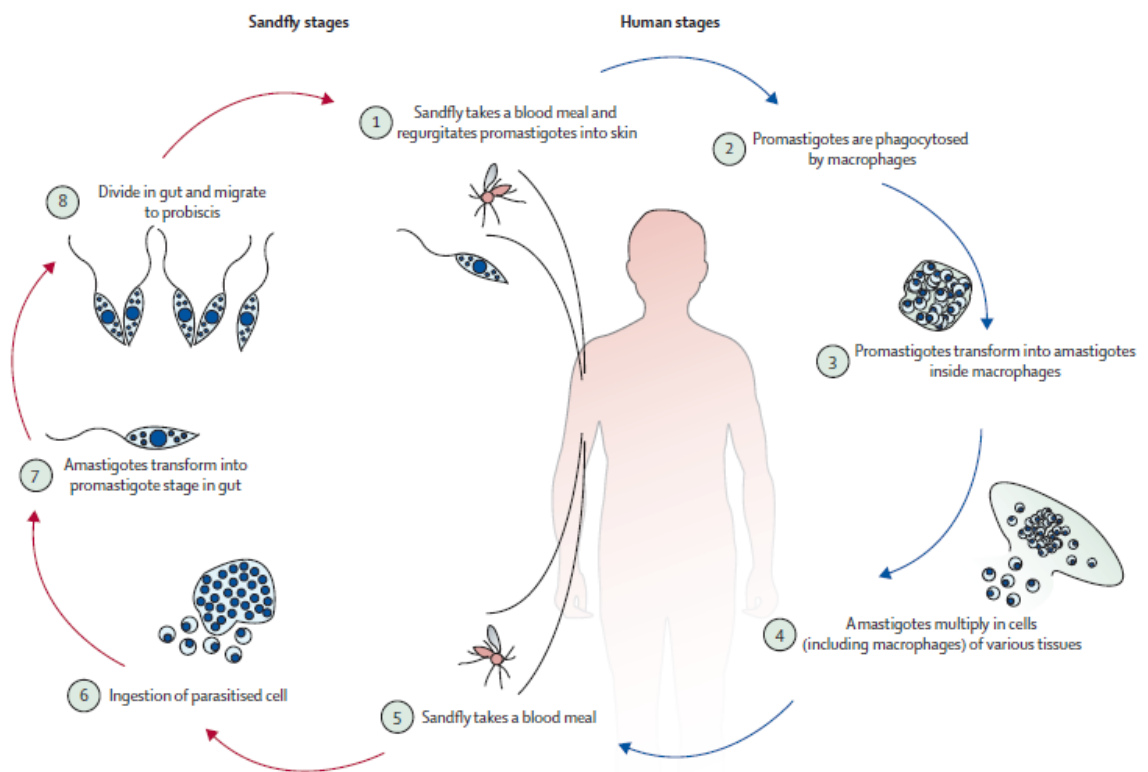


Figura 1 – Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento de parasitos do gênero *Leishmania*.  
 Fonte: Reithinger *et al.* (2007).



## 1.2. Leishmaniose Cutânea Americana

A leishmaniose cutânea americana foi tradicionalmente caracterizada como uma zoonose, primariamente infectando homens expostos aos ciclos de transmissão selvagem. Entretanto, este padrão epidemiológico sofreu mudanças, demonstradas por um crescente número de casos de leishmaniose humana. Uma crescente urbanização e alteração do ecossistema aonde a transmissão ocorre são os principais fatores que contribuíram para a expansão da doença (Desjeux, 2002).

Tanto a diversidade genética das leishmânias como a resposta diferenciada do hospedeiro à infecção influenciam na forma clínica da doença. A natureza da resposta imune tem papel fundamental na determinação da forma clínico-patológica da doença (Cunningham, 2002). Portanto, a leishmaniose cutânea pode apresentar uma gravidade em diferentes níveis, variando de acordo com a espécie do parasito envolvido assim como a resposta imunológica do hospedeiro. Por isso que características como o tipo de lesão e o conhecimento dos agentes etiológicos de cada região colaboram para o diagnóstico da doença (Lainson & Shaw, 1987).

A lesão típica é caracterizada pela formação de uma úlcera cutânea, única ou múltipla, de difícil cicatrização no local da picada pelo flebotomíneo infectado. Após um tempo variável de evolução (6 a 24 meses), pode ocorrer uma cicatrização espontânea, a qual geralmente se observa uma imunidade duradoura contra a infecção pela mesma espécie. Em apenas aproximadamente 5% dos casos (Carvalho *et al.*, 2006), a doença evolui para uma forma mais grave da doença, a leishmaniose cutâneo-mucosa ou leishmaniose mucosa (conhecida como espúndia na América do Sul) que destrói as mucosas do hospedeiro.

No Brasil já foram identificados sete espécies de *Leishmania* amplamente distribuídas (Figura 2) como agentes etiológicos da LC: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Grimaldi *et al.*, 1989; Silveira *et al.* 2002). Duas dessas espécies serão estudadas no presente trabalho.

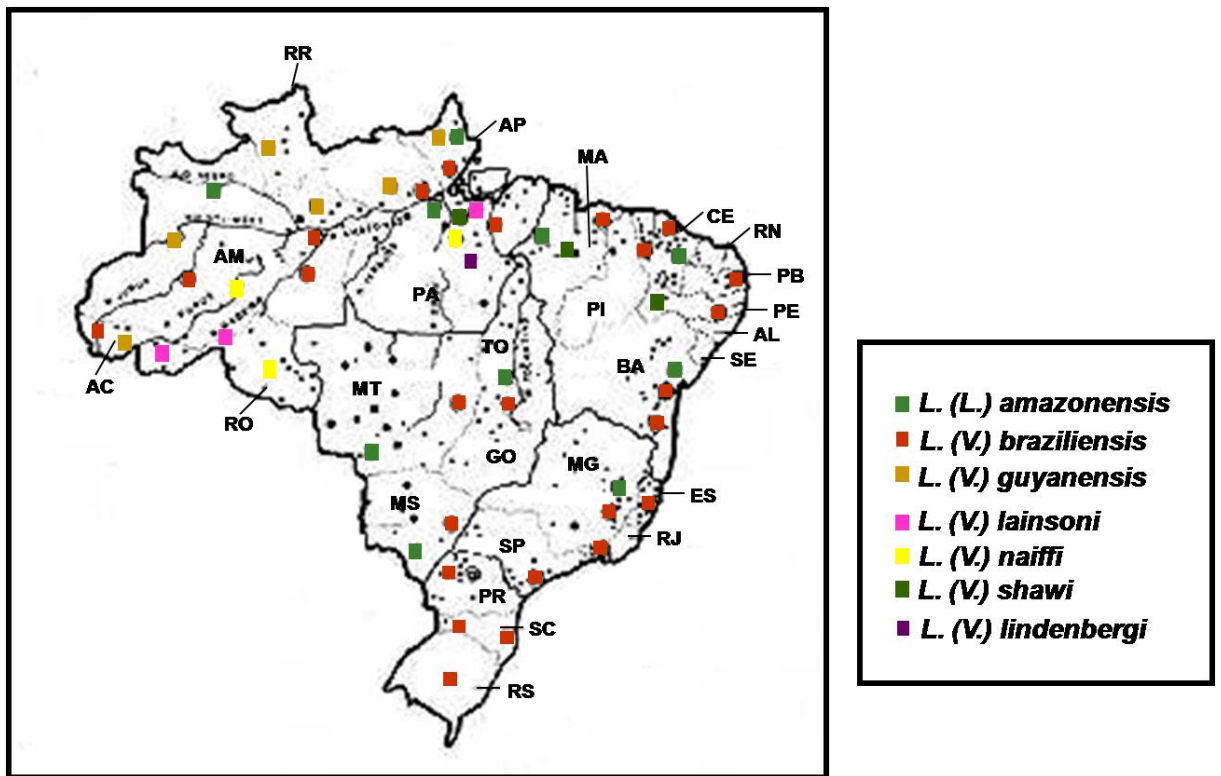


Figura 2 – Desenho esquemático da distribuição geográfica dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea no Brasil. Fonte: Grimaldi *et al.* (1987) e Marzochi & Marzochi (1994), adaptado pela Dra. Elisa Cupolillo (não publicado).

A *L. (V.) braziliensis* foi a primeira espécie descrita e determinada como agente etiológico da LC americana. Apresenta ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina, sendo observada em todas as áreas endêmicas para LC no Brasil. A transmissão está associada principalmente aos seguintes vetores: *Psychodopigus wellcomei*, em áreas silváticas dos estados do Pará, Ceará e Amazonas; *Lutzomyia whitmani*, em áreas de cerrado e caatinga nos estados do Ceará, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco; *Lu. intermedia* e provavelmente *Lu. migonei* e *Lu. fisheri*, nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Marzochi & Marzochi, 1994); e *Lu. pessoai* em Porto Alegre (RS) (da Silva & Grunewalde, 1999).

Parasitas de *L. braziliensis* já foram isolados de roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*), felídeos (*Felis catus*), canídeos (*Canis familiaris*) e eqüídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*). O papel desempenhado por estes mamíferos no ciclo de transmissão da doença ainda é incerto, contudo há evidências de que os roedores silvestres seriam os prováveis reservatórios primários (Ministério da Saúde, 2007).

A infecção provocada no homem pode apresentar uma variedade de manifestações clínicas, desde uma única ulceração cutânea até a menos freqüente forma disseminada da doença (Carvalho *et al.*, 1994), além de potencialmente evoluir para a forma mucosa (Marsden, 1986). Esta diversidade pode ser conseqüência de uma alta variabilidade genética intra-específica deste patógeno, que também está associada aos ciclos de transmissão da doença (Cupolillo *et al.*, 2003).

Outra espécie associada a LC no Brasil e com grande relevância principalmente em função da sua alta freqüência na região Amazônica é a *L. (V.) guyanensis*. Ela é predominante ao norte do Rio Amazonas, incluindo os estados do Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará, estendendo-se até as Guianas (Grimaldi *et al.*, 1989). O risco de infecção com este parasito está associado ao ciclo silvático. Portanto, esta espécie já foi isolada de mamíferos silvestres, tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*Didelphis albiventris*). Entretanto, ainda não foi comprovado que esses animais sejam realmente reservatórios deste parasito (Arias & Naiff, 1981; Arias *et al.*, 1981). Os vetores conhecidos são *Lu. umbratilis*, incriminado como o principal vetor, e *Lu. anduzei*. Visto a falta de evidências da adaptação do principal vetor em áreas peridomésticas,

o ciclo de transmissão parece ser essencialmente silvestre e a infecção do homem relacionada com a entrada deste nestes ambientes (Christensen *et al.*, 1982).

A *L. (V.) guyanensis* causa predominantemente úlceras cutâneas, únicas ou múltiplas, obtidas através de picadas simultâneas de flebotomíneos ou de metástases linfáticas secundárias (Dedet, 1990). Casos com comprometimento mucoso são bastante raros (Santrich *et al.*, 1990).

Pouco polimorfismo genético intra-específico foi encontrado em populações de *L. guyanensis* circulando no Brasil, quando comparado com *L. braziliensis* (Cupolillo *et al.*, 1995; Cupolillo *et al.*, 1998). Entretanto, um estudo mais recente realizado com 175 isolados de *L. guyanensis* na Guiana Francesa, revelou um grau de distinção significativo relacionado a diversas áreas geográficas e manifestações clínicas (Rotureau *et al.*, 2006).

### **1.3. Classificação de *Leishmania* Ross, 1903**

O conceito biológico de espécie consiste em um agrupamento de populações naturais intercruzantes, reprodutivamente isolados de outros grupos com as mesmas características (Mayr, 1970). Este conceito não pode ser aplicado em organismos unicelulares como *Leishmania*, uma vez que apresentam reprodução essencialmente assexuada (Tibayrenc *et al.*, 1990). Portanto, um conjunto de características (dados moleculares, geográficos, climáticos, evolução de vetores e hospedeiros) deve ser sempre considerado para se estudar a evolução desses organismos (Kerr, 2006).

O primeiro protista provavelmente surgiu durante o Mesoproterozóico, há mais de 1 bilhão de anos (Xiao *et al.*, 1997; Knoll *et al.*, 2006). A dificuldade de se obter registros fósseis em Kinetoplastida dificulta o estudo de sua evolução. O início da utilização de ácidos nucleicos como ferramenta filogenética e evolutiva na década de 70, trouxe novas alternativas para se estudar a origem de diversos organismos. Estudos moleculares demonstram um relacionamento de Kinetoplastida com Euglenophyta, ambos eucariotos do supergrupo *Excavata* (Dooijes *et al.*, 2000).

A origem do gênero *Leishmania* continua controversa, com alguns autores sugerindo um surgimento no Neotrópico e outros no Paleoártico ou Neoártico (Noyes, 1998; Kerr, 2000; Lukes *et al.*, 2007). Independentemente, a disseminação deste parasito seguiu a migração de vetores e hospedeiros (Perrotey *et al.*, 2005).

Os hospedeiros definitivos de leishmânias primitivas devem ter sido répteis ou mamíferos.

O primeiro registro fóssil de *Leishmania*, *Paleoleishmania proterus*, data do início do Cretáceo (100 milhões de anos). Esta descoberta também revelou a presença de larvas de insetos co-habitando com flagelados de vida livre semelhantes a tripanosomatídeos (Poinar & Poinar, 2004). Foi sugerido que esses flagelados eram provavelmente ingeridos e, posteriormente, se replicavam dentro dessas larvas (Poinar, 2007). Uma vez no inseto adulto, os flagelados poderiam ser transmitidos para um hospedeiro vertebrado, assim estabelecendo o ciclo do protista. Isto provavelmente aconteceu antes do surgimento de mamíferos placentários, no Paleoceno.

Desde a primeira descrição do gênero *Leishmania* em 1903, o número de novas espécies determinadas vem expandindo, com diferentes classificações sendo propostas. Primordialmente, os critérios utilizados para classificar as leishmânias eram baseados em fatores geográficos e epidemiológicos, manifestação clínica, desenvolvimento do parasito no vetor, dentre outros (Grimaldi & Tesh, 1993). Atualmente, técnicas moleculares e bioquímicas têm sido primariamente utilizadas para classificar esses parasitos. A técnica padrão ouro para identificação ao nível de espécie em *Leishmania* é a eletroforese de multilocus enzimático (MLEE), sendo amplamente utilizada pelos últimos 25 anos. Posteriormente, métodos de filogenia molecular corroboraram com grande parte dos dados taxonômicos oriundos de análises por MLEE (Croan *et al.*, 1997; Cupolillo *et al.*, 2000; Dávila & Momen, 2000).

A diversidade genética em *Leishmania* é considerável, com pelo menos 22 espécies patogênicas ao homem. De acordo com Lainson & Shaw (1987), este táxon apresenta dois subgêneros: *L. (Viannia)* Lainson & Shaw 1987, agrupa os parasitos que se desenvolvem na região peripilárica do intestino dos vetores, e *L. (Leishmania)* Safjanova 1982, agrupa os parasitos que se desenvolvem na região suprapilárica do intestino de vetores. Tal classificação manteve-se até os dias atuais, sendo corroborada por diferentes análises, como por MLEE (Rioux *et al.*, 1990) e por seqüências de DNA (Cupolillo *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 1994).

#### 1.4. Características moleculares de *Leishmania* spp.

A característica única que difere os organismos da ordem Kinetoplastida é a presença de um DNA mitocondrial presente no cinetoplasto (kDNA), localizado próximo ao corpo basal do flagelo (Simpson, 1987).

As leishmânias reproduzem-se por divisão binária (Grimaldi *et al.*, 1989) e a sua diversidade biológica é decorrente de mutações e/ou trocas genéticas entre os parasitos (Cupolillo *et al.*, 1997). Apesar de ser um organismo eucarioto, apresenta uma série de características únicas, similares aos seus ancestrais bacterianos: carência de *introns*, agrupamento policistrônico dos genes com uma maquinaria transcricional simplificada, no qual há processamento de mRNA por *trans-splicing* acoplado a poliadenilação (Ivens *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2008). Considerando que a regulação da expressão gênica em Kinetoplastida é realizada principalmente ao nível pós-transcricional, estudos relatam uma grande importância de regiões não traduzidas da posição 3' (3'-UTR) com função regulatória (Aly *et al.*, 2005; Boucher *et al.*, 2002; Haile & Papadopoulou, 2007). Contudo, o estudo da predição dessas regiões ainda está em andamento, já havendo métodos descritos para *T. brucei* (Benz *et al.*, 2005). Os tripanosomatídeos possuem extensa modificação pós-traducional das proteínas, especialmente as de superfície e secreção. Eles também utilizam mecanismos de duplicação e amplificação gênica como alternativa no aumento da expressão gênica. Além disso, este grupo apresenta uma expressão específica de várias enzimas relacionadas à biosíntese de glucoconjugados (Ivens *et al.*, 2005).

Baseado em dados de três genomas já seqüenciados em Kinetoplastida (*L. major*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*), pode-se notar uma alta preservação da sintonia dos genes na evolução desses organismos. Há cerca de 6.200 genes conservados em Trypanosomatidae e foram encontrados mais de 1.000 genes específicos para *Leishmania* (El-Sayed *et al.*, 2005). A arquitetura dos cromossomos de *Leishmania* difere dos outros tripanosomatídeos pela ausência de regiões subteloméricas extensas, nas quais há genes espécie-específicos.

As diferentes espécies de *Leishmania* apresentam de 34 a 36 cromossomos (Wincker *et al.*, 1996; Britto *et al.*, 1998), nos quais 31 são conservados e os outros são oriundos de eventos de fusão ou fissão. Uma comparação de genomas completos de três espécies de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*) revelou um conteúdo, sintonia e arquitetura genética bem conservada, sendo a

perda de genes e formação de pseudogenes os principais fatores que transformaram esses genomas (Peacock *et al.*, 2007). Foram encontrados 78 genes espécie-específicos e o mais interessante foi a presença de uma maquinaria de interferência mediada por RNA (RNAi) e elementos transponíveis somente em *L. braziliensis*. Essa alta conservação genômica sugere que um pequeno número de genes espécie-específico seria relevante para a patogenicidade, que o perfil de expressão gênica difere consideravelmente entre espécies ou que o genoma do parasito apresenta apenas um pequeno papel na apresentação clínica da doença (Smith *et al.*, 2007).

### **1.5. Tratamento da Leishmaniose**

Desde a antiguidade, já há relatos de leishmaniose cutânea, tendo descrições das suas manifestações clínicas na biblioteca do Rei Ashurbanipal do 7º século a.C. (*ante Christum*), na qual há relatos da doença que datam de 1500 a 2500 anos a.C. (Manson-Bahr, 1996). Inicialmente, pacientes com LC recebiam um tratamento dependendo da área endêmica aonde se encontravam. Somente no final do século 19 em Tashkent, começaram a usar ácido láctico puro para cauterizar as lesões. Outros agentes utilizados foram sulfato de cobre, ácido de bateria velha, extratos de planta, esquentar as lesões por 20h através de banhos quentes (Berman, 1988). Na Índia, a forma visceral era diagnosticada baseada no aumento do abdômen e era tratada queimando-se a pele nessa região.

Gaspar de Oliveira Vianna foi o primeiro a utilizar o tártaro emético (antimonial trivalente – SbIII) para tratar LC (Steck, 1972), o qual era anteriormente utilizado como substância emética, tratamento contra sífilis, gota, dentre outros. Entretanto, a droga foi refutada por outros estudiosos (Berman, 1988; Shortt, 1945), os quais enalteciam os seus efeitos colaterais, como depressão, tosses e dores no peito. Essas discussões levaram ao desenvolvimento dos antimoniais pentavalentes (SbV) como a uréia estibamina, o estibosan e neoestibosan em 1920s (Shortt, 1945). Alta taxa de cura e menor efeito tóxico estabeleceu o SbV como droga de escolha para o tratamento contra a leishmaniose.

O tratamento da LC é recomendado para acelerar o processo de cura e evitar casos de persistência ou disseminação das lesões, assim como diminuir as cicatrizes (Blum *et al.*, 2004; Weina *et al.*, 2004). Já numa infecção por LV ou LCM, o tratamento deve ser sempre realizado, uma vez que essas manifestações clínicas

podem levar ao óbito (Collin *et al.*, 2004; Davidson, 1998). Na maioria dos países endêmicos para a leishmaniose, a política do Ministério da Saúde oficial deve prover tratamento gratuito para todos os pacientes. Entretanto, isso nem sempre é seguido, uma vez que a quantidade de droga e profissionais treinados é limitada, principalmente em áreas rurais (Reithinger *et al.*, 2007).

Atualmente, o controle da leishmaniose ainda baseia-se somente na quimioterapia, uma vez que vacinas contra este parasito ainda estão em desenvolvimento (Palatnik-de-Sousa, 2008). O tratamento primário contra a leishmaniose continua sendo o antimonial pentavalente, em sua maioria na fórmula estibogluconato de sódio (Pentostan®, GlaxoWellcome, Londres, Reino Unido – utilizado geralmente em países de língua inglesa) ou como antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®, Rhône-Poulenc-Rohrer, Paris, França – utilizado principalmente em países da América Latina e de língua francesa ou espanhola) (Berman, 1988, Rath *et al.*, 2003). No Quênia, um estudo comparativo entre os dois medicamentos revelou que o segundo apresenta maior viabilidade de comercialização a menores custos e, conseqüentemente, possibilita o tratamento de um maior número de pacientes infectados pela leishmaniose visceral na África (Moore *et al.*, 2001). Entretanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS), relata que a eficiência terapêutica do Glucantime® depende de uma série de fatores, como a área geográfica e os protocolos de tratamento determinados (Carvalho *et al.*, 2000).

Para a maioria das regiões endêmicas, com exceção na Venezuela, Guiana Francesa e Suriname que seguem próprias políticas de saúde, a OMS recomenda o tratamento contra a LC com antimônio pentavalente a 20mg/kg por dia durante 20-28 dias consecutivos (Reithinger *et al.*, 2007). Inicialmente, era administrado 10mgSbV/kg, contudo o surgimento de casos que não respondiam ao tratamento, principalmente na Índia, na década de 70 promoveu o aumento da dosagem (Thakur, 1999).

Existe um aumento de evidências que a resposta ao tratamento contra LC depende da espécie e cepa de *Leishmania* spp (e.g. Soto *et al.*, 2004; Yardley *et al.*, 2005; Arevalo *et al.*, 2007). Além disso, a utilização do antimônio pentavalente tem sido ameaçada pelo desenvolvimento natural de resistência dos parasitos à droga (Croft *et al.*, 2006). Portanto, nos últimos anos, pesquisadores estão se empenhando no desenvolvimento de novas alternativas para a quimioterapia da leishmaniose. Geralmente, a busca por novos fármacos baseia-se em testar: (i) drogas comumente usadas para patologias similares, (ii) substâncias com potencial biotecnológico



isolados de plantas e microorganismos e (iii) substâncias usadas na medicina popular.

Existem aproximadamente 25 compostos com propriedades leishmanicidas, contudo apenas alguns poucos são usados como drogas no homem infectado. A maioria desses compostos apresenta uma ou mais desvantagens, como alto custo de produção, dificuldade na administração, toxicidade ou provoca o desenvolvimento de resistência a drogas no parasito (Mishra *et al.*, 2007).

Atualmente, em casos no qual não há resposta ao tratamento com antimônio, utiliza-se pentamidina, anfotericina B ou paromomicina como segunda opção (Santos *et al.*, 2008). Entretanto, severos efeitos colaterais e alto custo de produção limitam o seu uso (Mishra *et al.*, 1992). Além disso, já foram descritos casos resistentes ao tratamento com pentamidina (Bray *et al.*, 2003). Quatro novas drogas em potencial estão sendo introduzidas no combate a LV, incluindo a anfotericina B, com formulação lipídica (Berman *et al.*, 1998); miltefosina oral e sitamaquina (Sundar *et al.*, 2002; Wasunna *et al.*, 2005), ambas sendo testadas na Índia; e uma formulação parenteral de aminosidina, a paromomicina (Thakur *et al.*, 2000). Já para a LC foram introduzidas formulações tópicas de paromomicina (Soto *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008) e outras drogas, como o imuno modulador *imiquimod* (Arevalo *et al.*, 2001). Regime dos tratamentos recomendados utilizando-se diferentes drogas está descrito na tabela 1.

#### **1.6. Mecanismos de ação do antimônio pentavalente na leishmaniose**

Apesar da utilização do antimônio pentavalente há 60 anos como a primeira linha de drogas, o seu mecanismo de ação contra a leishmaniose ainda não foi totalmente esclarecido. Os primeiros estudos realizados sugeriram ação na inibição da via da glicólise e da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular nos parasitos (Berman *et al.*, 1985, 1987). Contudo, a interpretação desses dados é complexa, uma vez que não foram especificados corretamente as formulações utilizadas nos experimentos com estibogluconato de sódio. Já foi descrito que alguns conservantes (e.g. o m-clorocresol) apresentam por si só ação leishmanicida (Roberts & Rainey, 1993).

Tabela 1 – Regimes dos tratamentos recomendados com as drogas mais comumente usadas no combate a leishmaniose cutânea e seus efeitos adversos. Fonte: Murray *et al.* (2005); Reithinger *et al.* (2007); Santos *et al.* (2008).

Nome comercial	Químico/Nome	Tratamento	Aplicação*	Eficiência clínica	Efeitos adversos
Antimoniais pentavalentes / Glucantime® ou Pentostam®		20mg/kg diários por 20 dias	P, IV, IM	36-96%	Nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade.
Anfotericina B / Fungizone		1mg/kg dias alternados ou consecutivos	P	desconhecida	Febre alta, tromboflebite, miocardite, disfunção renal e morte
Isetionato de pentamidina / Lomidina		2mg/kg dias alternados – 7 doses	P	<i>L. panamensis</i> : 96% <i>L. braziliensis</i> : 35%	Cardiotoxicidade, <i>diabetes mellitus</i> insulina dependente irreversível e morte
		4mg/kg dias alternados – 4 a 8 doses	P	<i>L. braziliensis</i> : 71%	
Paromomicina / Humatin		14mg/kg	P	<i>L. braziliensis</i> e <i>L. mexicana</i> : 59%	Edema, prurido, irritação local
		2 aplicações diárias de 14-21 dias	T	<i>L. braziliensis</i> e <i>L. mexicana</i> : 68-91%	
Miltefosina		2,5mg/kg por 28 dias	O	<i>L. panamensis</i> : 91% <i>L. braziliensis</i> e <i>L. mexicana</i> : 53%	Distúrbios gastrintestinais, nefrotoxicidade e teratogenicidade

\* P – aplicação parenteral; IV – aplicação intravenosa; IM – aplicação intramuscular; O – aplicação oral; T – aplicação tópica.

Atualmente, sugere-se que o antimônio pentavalente seja uma pró-droga, sendo necessário um processo de redução *in vivo* para converter ao antimônio trivalente após sua administração. O local (amastigota ou macrófago) assim como o mecanismo de redução (enzimático ou não enzimático) continua controverso. Alguns estudos realizados em culturas axênicas de amastigotas demonstram uma susceptibilidade ao SbV, enquanto as formas promastigotas não o são, podendo sugerir que alguma redução estágio específica do ciclo de vida do parasito possa ocorrer (Ephros *et al.*, 1997, 1999). Contudo, já existem estudos indo de encontro a esta hipótese (Serenio *et al.*, 1998). Um segundo mecanismo seria que parte do SbV seja convertido para SbIII dentro de células do hospedeiro, o qual já foi estudado em humanos (Burguera *et al.*, 1993) e hamsters (Lugo de Yaburh *et al.*, 1994). Entretanto, como já foi demonstrado que o IC<sub>50</sub> para amastigotas axênicos varia de 3,2 a 100µg de SbIII por mL dependendo da espécie de *Leishmania* (revisado em Ashutosh *et al.*, 2007), enquanto o IC<sub>50</sub> para macrófagos THP-1 é de ~25µg/mL (Wyllie & Fairlamb, 2006), é provável que essas últimas células não reduzam o SbV para SbIII significativamente, sugerindo-se que a conversão ocorra em ambas as células.

O mecanismo pelo qual os amastigotas reduzem o SbV ainda não está totalmente esclarecido. A glutathiona (GSH) e a tripanotona (TSH) podem reduzir o SbV não enzimaticamente (Frezard *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003a, 2003b). As condições encontradas nos fagolisossomos, onde os amastigotas residem nos macrófagos, compreendem um pH ácido e elevada temperatura (37°C), favorecendo a redução. Contudo, esses fatores não são tão significativos, uma vez que estudos fisiológicos revelam que a taxa de conversão desses compostos é pequena. Além disso, este evento não explica o fato de promastigotas serem insensíveis ao SbV, enquanto apresentam maiores concentrações de GSH e TSH do que amastigotas (Ariyanayagam & Fairlamb, 2001; Wyllie *et al.*, 2004) e ambas as formas mantêm um pH intracelular próximo da neutralidade.

A redução de metais mediada por enzimas foi demonstrada em bactérias e leveduras (Rozen, 2002), levando a crer que o mesmo poderia ocorrer em *Leishmania*. Atualmente, existem duas enzimas candidatas a função redutora do SbV. A primeira é uma proteína tetramérica, a redutase dependente de tiol 1 (TDR1), que contém domínios da classe omega das glutathionas S-transferases. Ela utiliza a glutathiona como redutor e é mais expressa na forma amastigota (Denton *et al.*, 2004). A segunda é uma proteína monomérica, a arsenato redutase 2 (ACR2), que

apresenta atividade redutora tanto para arsenato pentavalente (AsV) como para o SbV, necessitando de GSH e glutaredoxina como co-fatores (Mukhopadhyay & Rosen, 2002; Zhou *et al.*, 2004).

Novas evidências sugerem que o antimônio mata os parasitos através da indução de apoptose, envolvendo fragmentação do DNA e transporte de fosfatidilserina para o lado externo da membrana celular (Lee *et al.*, 2002; Sereno *et al.*, 2001). Parece também que o modo de ação do antimônio está relacionado ao óxido nítrico (NO), pois ambos agem por estresse oxidativo e inibição de enzimas envolvidas no metabolismo energético com eventual apoptose (Holzmuller *et al.*, 2002). Um fato interessante foi a descoberta de amastigotas de *L. infantum* resistentes a SbIII apresentando resistência cruzada a NO *in vitro* (Holzmuller *et al.*, 2005). Um trabalho mais recente mostrou que o antimônio aumenta a função fagocitária de monócitos e neutrófilos através de receptores do complemento, provocando uma indução na produção de anion superóxido ( $O_2^-$ ) e TNF pelos fagócitos e, conseqüentemente, de NO após incubação dessas células com TNF e antimônio (Muniz-Junqueira & Paula-Coelho, 2008). Portanto, a droga permite às células fagocitárias um mecanismo que previne o parasito de escapar do sistema imune de defesa do hospedeiro.

Além disso, foi demonstrado que o SbIII é capaz de inibir as enzimas tripanotiona redutase (TR) (Cunningham *et al.*, 1994) e glutationa sintetase (GS) (Wyllie & Fairlamb, 2006), assim como promover um rápido efluxo de TSH e GSH (Wyllie *et al.*, 2004) *in vitro*. Como ambas as enzimas são essenciais para a manutenção da tripanotiona em tripanosomatídeos, e este composto está relacionado a processos de destoxificação (Fairlamb, 1992), o antimônio poderia comprometer o potencial redox da célula, induzindo a perda intracelular de tióis devido à inibição das enzimas acima mencionadas (Cunningham & Fairlamb, 1995).

O antimônio pentavalente também forma complexos estáveis com nucleosídeos de adenina, ligando-se a porção ribose, o que provoca a inibição de transportadores de purinas em *Leishmania* (Demicheli *et al.*, 2002). Portanto, a droga atua no metabolismo de nucleosídeos, envolvendo a formação de derivados citotóxicos, e, além disso, ela inibe a ação de topoisomerases do tipo 1, desestabilizando a maquinaria de replicação de DNA (Lucumi *et al.*, 1998), e interfere no processo de translocação de purinas pré-formadas (Carter *et al.*, 2000).

É provável que mais de um mecanismo esteja envolvido na ativação da droga. Como os macrófagos não reduzem eficientemente o SbV para SbIII (Wyllie & Fairlamb, 2006) e os parasitos não são expostos diretamente a um quantidade letal

de SbIII dentro dos macrófagos, a redução da forma pentavalente deve ser o evento crítico e, portanto, a perda da atividade redutora no parasito poderia levar a resistência. Estes mecanismos serão melhor descritos posteriormente.

### **1.7. Mecanismos de resistência ao antimônio em *Leishmania***

A seleção de patógenos resistente a drogas é uma ameaça bem conhecida no tratamento de diversas infecções e origens: bactéria, vírus, fungos e parasitos. Em geral, o efeito primário na morte celular envolve a interação da droga com um ou mais fatores que irão ativar uma cascata de reações. Como a quantidade da droga no seu sítio de ação é extremamente relevante, vários mecanismos podem ser acionados, tais como a diminuição no influxo e/ou o aumento do efluxo da droga e sua inativação por diferentes vias metabólicas (Croft *et al.*, 2006).

Em parasitos já foram relatados uma série de alterações que podem estar relacionadas com a susceptibilidade à droga, como permeabilidade celular, modificações na sensibilidade do alvo, dentre outros (Singh, 2006). O surgimento destas modificações nas populações pode ter múltiplas origens: (i) adaptação fisiológica; (ii) seleção diferencial de indivíduos resistentes numa população mista; (iii) mutações aleatórias seguidas de seleção; e (iv) alterações na expressão gênica.

No combate a leishmaniose, a eficácia dos diferentes tratamentos é consequência do perfil imunológico do paciente, das propriedades farmacocinéticas da droga e das diferenças intrínsecas de cada espécie de leishmânia no que diz respeito à sensibilidade à droga (Croft *et al.*, 2006; Cohen, 1992). A resistência de *Leishmania* sp. contra uma determinada droga pode ser adquirida tanto de uma forma natural como por exposição de parasitos selvagens a doses sub-ótimas crescentes da droga *in vitro* (Cohen, 1992). Acredita-se que *Leishmania* tenha potencial para responder a pressão seletiva de drogas de diversas maneiras. Os primeiros trabalhos neste assunto foram realizados em parasitos induzidos a resistência *in vitro* ao SbV, no qual se observou em isolados resistentes redução do acúmulo da droga (Dey *et al.*, 1994), amplificação gênica (Haimeur & Ouellette, 1998) e a não redução do metal (Shaked-Mishan *et al.*, 2001). Posteriormente, decidiu-se avaliar isolados resistentes ao SbIII, uma vez que esta é a forma ativa da droga (Haimeur *et al.*, 2000). Neste novo modelo, constatou-se que o parasito escapa do efeito da droga pelo aumento da produção de tripanotona o qual se conjuga com o antimônio trivalente e pode ser então seqüestrado para dentro do vacúolo de uma proteína transportadora de

ligação a ATP (ABC), homóloga a proteína associada à resistência a múltiplas drogas A (MRPA) em humanos (Légaré *et al.*, 2001; Sarcadi *et al.*, 2006), e em seguida expulsa da célula por uma bomba dependente de tiol (Dey *et al.*, 1996).

Atualmente, o que se sabe sobre os mecanismos de resistência ao SbIII em *Leishmania in vitro* concentra-se na diminuição da droga dentro da célula. Foi demonstrada uma diminuição no influxo da droga por uma baixa na expressão da aquagliceroporina 1 (AQP1), uma proteína transportadora de metais trivalentes em *Leishmania* (Gourbal *et al.*, 2004; Marquis *et al.*, 2005). Existem também relatos do efluxo da droga como descrito acima (Callahan & Beverley, 1991; El Fadilli *et al.*, 2005; Goyeneche-Patino *et al.*, 2008; Grondin *et al.*, 1997; Haimeur *et al.*, 2000; Légaré *et al.*, 1997; Leprohon *et al.*, 2009; Papadopoulou *et al.*, 1994), no qual a superprodução da tripanotona é devida a superexpressão da ornitina descarboxilase (ODC), a enzima limitante na biossíntese das poliaminas (Haimeur *et al.*, 1999), e de  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS), a enzima limitante da biossíntese de glutatona (Guimond *et al.*, 2003). Outros mecanismos anti-oxidantes já foram descritos por serem fundamentais ao fenótipo de resistência ao antimônio, como a superexpressão da triparedoxina peroxidase (TryP) (Wyllie *et al.*, 2008), enzima responsável pela destoxificação de compostos peróxidos (Flohe *et al.*, 2003).

A superexpressão do gene MRPA já foi relacionada a uma diminuição no influxo da droga e não a um aumento no seu efluxo (Callahan *et al.*, 1994). Esse transportador por si só não promove a remoção da droga da célula, mas a mantém dentro de um vacúolo nos quais os efeitos danosos podem ser retardados. Uma vez que há uma concentração razoável de droga no meio intracelular, tendo sido seqüestrada pelo MRPA, a sua entrada será barrada por um efeito dominante negativo.

Outros transportadores ABC também já foram observados pelo seu potencial na contribuição do fenótipo de resistência a drogas. Utilizando-se da técnica de microarranjos para se avaliar as diferenças na expressão gênica de membros da família ABC, destacaram-se 3 genes sendo superexpressos no isolado mutante resistente: MRPA, ABCA3 e ABCH1 (Leprohon *et al.*, 2006). Um homólogo de ABCA3 em *T. cruzi* está relacionado ao tráfego de vesículas intracelulares e vias de exocitose (Torres *et al.*, 2004), sugerindo que este gene poderia co-atuar com o MRPA para promover o mecanismo de fuga à droga. Em outro trabalho, o transportador PRP1 (proteína de resistência a pentamidina 1) ou ABCC7 foi descrito

por promover resistência a segunda linha de droga pentamidina em *Leishmania* spp., assim como ao antimônio trivalente (Coelho *et al.*, 2003, 2007).

O fenômeno de aneuploidia em cromossomos específicos já foi descrito em células tumorais resistentes a drogas (revisado em Duesberg *et al.*, 2007). Nos últimos anos, descobriu-se que o mesmo processo está presente em isolados resistentes de *Leishmania* ao antimônio (Leprohon *et al.*, 2009), como ao antifolato metotrexato (Ubeda *et al.*, 2008). Um número crescente de proteínas com arranjos de motivos repetitivos são observados apresentando diferentes funções, sendo principalmente relacionadas à interação proteína-proteína (revisado em Kobe & Kajava, 2001). Estudo realizado com clonagem funcional permitiu a descoberta de uma proteína rica em repetições de leucina (LRR) superexpressa em amastigotas axênicos resistentes a SbIII de *L. infantum* (Genest *et al.*, 2008). Portanto, diferentes mecanismos estão sendo associados à resistência *in vitro*, comprovando uma origem multifatorial.

O aumento de casos refratários ao tratamento contra a leishmaniose nos últimos anos desviou a atenção dos estudiosos, que passaram a estudar não só a resistência de isolados de *Leishmania* induzidos a resistência *in vitro*, mas também os isolados clínicos. O mecanismo de resistência ao antimônio enfrenta algumas modificações quando se estudam isolados de pacientes, no qual há um passo extra que é minimizar a conversão do SbV para a forma ativa da droga, o SbIII. Grande parte dos estudos realizados até o presente momento foram com *L. donovani*, parasito responsável pela manifestação clínica da LV.

Um dos primeiros trabalhos demonstrou que parasitos resistentes naturais na forma amastigota diminuem a expressão de duas enzimas chaves,  $\gamma$ -GCS e ODC (envolvidas na síntese de precursores da tripanotona), assim minimizando a redução do SbV. Além disso, diminuem a expressão do transportador AQP1, que permite o influxo de SbIII na *Leishmania* (Decuyper *et al.*, 2005). Entretanto, num outro experimento do mesmo grupo científico, utilizando um protocolo diferente de manipulação da forma amastigota, demonstrou resultados contrastantes, com um aumento na expressão dos genes AQP1 e  $\gamma$ -GCS em isolados resistentes (Decuyper *et al.*, 2008). Este exemplo em particular demonstra como as variações técnicas podem influenciar na biologia do parasito ao ponto de induzir resultados distantes da realidade. Isolados clínicos podem alcançar o fenótipo de resistência a drogas seguindo diferentes vias. Já foram observados parasitos resistentes naturais com influxo reduzido de SbIII (Maharjan *et al.*, 2008), entretanto o número de cópias

do gene AQP1 era superior ao de isolados sensíveis e os níveis de RNA não eram significativamente diferentes, portanto deixando o fenótipo observado sem explicação.

Os parasitos também podem modular a expressão de  $\gamma$ -GCS no macrófago hospedeiro (Carter *et al.*, 2006), deste modo diminuindo a produção de glutatona e por conseqüência a conversão de SbV para SbIII no hospedeiro. Em outro modelo observou-se dados semelhantes aos de isolados induzidos a resistência *in vitro*, com amplificação gênica de MRPA e uma superexpressão dos genes ODC e  $\gamma$ -GCS em alguns isolados resistentes da Índia (Mukherjee *et al.*, 2007). Existem também isolados resistentes com uma maior concentração de tióis intracelular, mas não devido à amplificação do gene  $\gamma$ -GCS e sim o da enzima tripanotona redutase (TR), uma flavoproteína oxidoreductase dependente de NADPH que é essencial para a manutenção da tripanotona em tripanosomatídeos (Fairlamb, 1992). Modulação de enzimas envolvidas na síntese lipídica e no metabolismo da membrana celular pode alterar o acesso a droga pelo parasito. Modificações na membrana celular já foram sugeridas como mecanismo de defesa ao antimônio (Kothari *et al.*, 2007), provavelmente implicados ao gene PG1 localizado na membrana.

Um estudo de proteômica comparativa revelou um número de proteínas diferentemente expressas em isolados clínicos resistentes de *L. donovani*, envolvidas no programa de morte celular (Vergnes *et al.*, 2007). Duas proteínas em particular estavam intimamente envolvidas no programa mencionado: a HSP83, aumentando a resistência a drogas e reduzindo a ativação do processo de morte celular, e a pequena proteína de Kinetoplastida relacionada à calpaína (SKCRP14.1), promotor do processo de morte celular induzido por antimônio. Outros genes relacionados ao estresse, HSP70 e HSC70, já foram sugeridos por aumentar a tolerância ao SbIII em mutantes resistentes de *Leishmania* quando superexpressos (Brochu *et al.*, 2004), sugerindo o seu potencial como primeira linha de defesa contra a droga.

Além disso, o fenótipo de resistência a drogas pode estar associado a diversas oscilações fisiológicas relacionadas à infectividade do parasito, incorporação de metabólitos, conjugação e tráfego com xenobióticos, metabolismo intracelular, interação parasito-hospedeiro e diferenciação de amastigota-promastigota (Ponte-Sucre, 2003). O melhor entendimento desses eventos fisiológicos pode colaborar no desenvolvimento de alternativas quimioterápicas contra a resistência a drogas em *Leishmania*.



O aumento da incidência de falha terapêutica nos últimos 15 anos vem se tornando uma grande ameaça, principalmente aos pacientes co-infectados com *Leishmania* spp. e HIV. A principal razão dessa emergência é devido ao mau uso das drogas, promovendo a seleção de pequenas populações resistentes (Croft *et al.*, 2006). Os métodos atuais para monitorar a resistência de isolados individuais baseiam-se no modelo *in vitro* macrófago-amastigota, uma técnica exigente e demorada. Portanto, há uma necessidade urgente pela busca de marcadores moleculares relacionados a resistência a drogas que pudessem avaliar o desenvolvimento deste fenótipo na resposta terapêutica de forma fácil e com baixo custo (Natera *et al.*, 2007).

### **1.8. Falha terapêutica X Resistência a drogas**

Apesar da diversidade clínica, patológica e etiológica observada nas leishmanioses, o principal quimioterápico, derivados do antimônio pentavalente, tem sido utilizado há mais de 60 anos para tratar todas as formas clínicas da doença. Nos últimos anos estão sendo relatados casos que não respondem ao esquema terapêutico convencional, assim como parasitos resistentes a drogas (revisado em Croft *et al.*, 2006). A leishmaniose visceral no estado de Bihar, Índia, alcançou dados alarmantes na terapia com antimônio pentavalente, apresentando falha ao tratamento em 34 a 65% dos casos (Sundar *et al.*, 2000; Sundar, 2001; Thakur *et al.*, 1998). Na leishmaniose cutânea já foi também observado falha a terapia convencional (Romero *et al.*, 2001a; Palacios *et al.*, 2001). Existem também relapsos após terapia com antimônio em pacientes co-infectados com *Leishmania* spp. e HIV (Alvar *et al.*, 2008). Estudos conduzidos na América Latina com a leishmaniose cutânea revelam diferentes cenários: 7% de falha terapêutica na Bolívia (Bermúdez *et al.*, 2006), 16% no Brasil (Oliveira-Neto *et al.*, 1997), 21,9% no Peru (Arevalo *et al.*, 2007) e 39% na Colômbia (Palacios *et al.*, 2001).

No Brasil, vários casos refratários ao tratamento da leishmaniose já foram reportados em diferentes estados, como no Rio de Janeiro (Oliveira-Neto *et al.*, 1997), Bahia (Romero *et al.*, 2001a) e Amazonas (Teixeira *et al.*, 2008). Entretanto, poucos estudos foram realizados analisando a sensibilidade à droga de isolados clínicos. No município do Rio de Janeiro, os dados já reportados inferem que uma excelente resposta clínica observada em pacientes tratados contra LC está

correlacionada com uma alta sensibilidade da forma promastigota desses parasitos à droga (Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007).

Diferentes espécies de *Leishmania* são conhecidas por apresentar variabilidade intrínseca em relação à susceptibilidade ao antimônio (Allen & Neal, 1989). Já se constatou que na leishmaniose cutânea no Brasil, há uma diferença na resposta terapêutica ao tratamento convencional dependendo do agente etiológico, no caso *L. braziliensis* apresentou uma taxa de cura de 50,8% enquanto que *L. guyanensis* de 26,3% (Romero *et al.*, 2001a). Há também diferenças em relação a origem geográfica, uma vez que pacientes infectados com *L. braziliensis* no Peru apresentaram uma taxa de cura de 69,6% (Arevalo *et al.*, 2007). Além disso, tanto a resistência primária como a secundária ao antimônio podem contribuir para a falha terapêutica na LC americana (Rojas *et al.*, 2006). Portanto, a sensibilidade de isolados clínicos de *Leishmania* ao antimônio está sob influência de diversos fatores, que merecem devida atenção no planejamento de futuros estudos envolvendo esta área.

O fenômeno de falha terapêutica é complexo, uma vez que há vários fatores envolvidos: características do hospedeiro, como a genética e a resposta imunológica; fatores farmacológicos, como a qualidade da droga, o seu lote e a empresa que a produz; a duração do tratamento; e a biologia do parasita, como uma insensibilidade intrínseca de uma determinada espécie ou cepa e o fenótipo de resistência a droga (Grogl *et al.*, 1989).

O fenótipo de resistência a drogas em *Leishmania* pode ocorrer espontaneamente na natureza (Grogl *et al.*, 1992), sendo determinado geneticamente, e pode também ser induzido *in vitro* pela exposição do parasito a doses crescentes da droga (Grogl *et al.*, 1989). Falha terapêutica e resistência a drogas são dois fenômenos distintos que devem ser cuidadosamente analisados. O primeiro é uma resposta da interação parasito-hospedeiro-droga e o segundo da seleção de parasitos resistentes quando em contato com a droga. Ambos os fenômenos já foram encontrados na Índia (Lira *et al.*, 1999) e no Irã (Hadighi *et al.*, 2006), entretanto o mesmo não ocorreu no Nepal (Rijal *et al.*, 2007) e no Sudão (Abdo *et al.*, 2003).

Testes de sensibilidade a drogas em *Leishmania* spp. podem ser realizados nos seus diferentes estágios de vida: promastigotas (Berman & Wyler, 1980; Grogl *et al.*, 1992), amastigotas intracelulares (Robledo *et al.*, 1999; Laurent *et al.*, 2007) e amastigotas axênicos (Callahan *et al.*, 1997). Contudo, estudos *in vitro* avaliando a susceptibilidade do parasito *Leishmania* ao antimônio demonstram uma correlação

inconsistente com a resposta clínica ao tratamento (Grogl *et al.*, 1992; Rijal *et al.*, 2007; Yardley *et al.*, 2006). Esta incongruência pode ser devido a uma série de fatores experimentais: a não susceptibilidade das formas promastigotas ao SbV (Berman, 1980), resultando no uso de concentrações excessivas da droga para determinar a sensibilidade; efeitos citotóxicos de aditivos em formulações comerciais da droga (Ephros *et al.*, 1997; Sereno *et al.*, 1998); e diferentes definições para falha terapêutica (Jackson *et al.*, 1990).

Ensaio de susceptibilidade a drogas em amastigotas intracelulares são tecnicamente exigentes e demorados. Entretanto, esses experimentos reproduzem os efeitos das células hospedeiras em relação ao influxo da forma pentavalente e posterior redução à trivalente (Shaked-Mishan *et al.*, 2001), como acontece na infecção natural. Alguns estudos relatam uma associação com a resposta terapêutica apenas em testes de susceptibilidade na forma amastigota (Ibrahim *et al.*, 1994; Lira *et al.*, 1999), enquanto outros encontraram uma correlação na forma promastigota (Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 1998; Robledo *et al.*, 1999). Portanto, ajustar e padronizar os ensaios de susceptibilidade a drogas em *Leishmania* deve ser de fundamental importância de modo a permitir que possam ser usados no prognóstico da doença.

### **1.9. Epidemiologia molecular**

Nos últimos anos, as ferramentas moleculares têm demonstrado fundamental importância no estudo da epidemiologia e de agentes infecciosos. As suas abordagens podem contribuir significativamente para o controle da distribuição da doença através da(o): (i) identificação das espécies envolvidas numa região endêmica; (ii) estudo da prevalência da infecção numa população; (iii) ajuda no diagnóstico clínico; (iv) determinação da estrutura da população e a extensão da migração dos patógenos e vetores envolvidos; e (v) estudo da emergência e propagação de resistência a drogas.

O estudo de espécies de *Leishmania* apresenta algumas dificuldades, devido a sua extensa diversidade clínica e epidemiológica. Além disso, o debate sobre o seu método de reprodução clonal ou sexual levanta uma série de problemas na determinação de marcadores moleculares. Caso o modo de reprodução seja sexuada, os genótipos multilocus de uma determinada população serão instáveis uma vez que ocorre recombinação genética, deste modo apenas genes individuais

poderiam ser usados em epidemiologia (Tibayrenc, 2005). Caso exista uma reprodução clonal, os genótipos são propagados de geração em geração e poderiam ser utilizados como marcadores epidemiológicos confiáveis. Além disso, parasitos clonais acumulam mais mutações divergentes, como em genes envolvidos nas manifestações clínico-patológicas e na resistência a drogas, que podem levar a formação de unidades discretas evolutivas (Tibayrenc, 1998). Atualmente, a hipótese mais aceita em *Leishmania* é a de uma reprodução clonal (Banúls *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 1997; Tibayrenc *et al.*, 1990), apesar de ter sido constatado recombinação genética para algumas espécies (Cupolillo *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1991; Lukes *et al.*, 2007).

### **1.10. Marcadores moleculares em protozoários patogênicos**

A escolha dos primeiros marcadores utilizados baseava-se em genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenotípicos, de fácil visualização. Esta classe de marcadores contribuiu significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. A dificuldade em associar características de interesse econômico a marcadores morfológicos, através do estudo de populações segregantes foi um dos pontos cruciais que não permitiram sua utilização em um espectro maior de organismos.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), a revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. Como consequência disto, houve um aumento no número de marcadores genéticos disponíveis, incluindo assim, uma maior diversidade de espécies. Os primeiros estudos envolvidos na identificação e epidemiologia de parasitos utilizaram-se da técnica de eletroforese de isoenzimas acoplada à análise de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição, técnica conhecida como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), e a hibridização de Southern (Anderson *et al.*, 1993; Nash *et al.*, 1985; Vasconcelos *et al.*, 1988). O desenvolvimento de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, sendo a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a mais conhecida, assim com as de clonagem e seqüenciamento de DNA, expandiram as classes de marcadores moleculares, permitindo grandes avanços na parasitologia.

A técnica de PCR apresenta um grande número de aplicações na caracterização de parasitos. A mais direta foi a sua utilização como ferramenta qualitativa de diagnóstico. Desde o final da década de 80, foram desenvolvidos ensaios para a

detecção de uma grande variedade de parasitos, incluindo *Leishmania* (revisado em Reithinger *et al.*, 2007), *Trypanosoma* (Sarataphan *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2006), *Toxoplasma* (Salant *et al.*, 2007), *Plasmodium* (Berry *et al.*, 2008), dentre outros. Informação adicional pode ser adquirida com a utilização da PCR acoplada à análise por enzimas de restrição, o qual vem sendo utilizada largamente na caracterização desses parasitos (Cupolillo *et al.*, 1995; Restrepo-Pineda *et al.*, 2008; Rozas *et al.*, 2007; Velmurugan *et al.*, 2008). Outras abordagens mais sensíveis, entretanto mais demoradas e caras, foram também desenvolvidas, como o seqüenciamento automático de DNA e análise de expressão gênica.

O crescente número de dados de seqüenciamento de DNA sendo depositados em bancos públicos e os avanços na bioinformática permitiram a identificação de vários loci de microssatélites, pequenas seqüências repetitivas em tandem consistindo de unidades de 1-6 nucleotídeos flanqueadas por seqüências conservadas (Tóth *et al.*, 2000). Esses marcadores exibem uma quantidade substancial de variabilidade em vários genomas eucariotos. Portanto, estão se tornando um dos principais marcadores moleculares para filogenia, genética de populações e epidemiologia molecular. O genoma de *Leishmania* é relativamente rico em seqüências de microssatélites com cerca de 600 loci por genoma haplóide, sendo as repetições de dinucleotídeos CA as mais abundantes (Rossi *et al.*, 1994). Esses marcadores vêm também sendo utilizados com sucesso na caracterização e detecção de variabilidade genética intra-específica em uma série de parasitos (Al-Jawabreh *et al.*, 2008; Havryliuk *et al.*, 2008; Koffi *et al.*, 2007; Mallon *et al.*, 2003).

A técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada com o objetivo de quantificar o número de parasitos numa determinada amostra, assim como caracterizar o perfil de expressão gênica de uma dada espécie. Este método apresenta uma série de vantagens quando comparado com outras técnicas de amplificação convencional: quantificação simples de ácidos nucléicos, as amostras não precisam ser manipuladas após a realização do processo, detecção de variabilidade das seqüências amplificadas através da realização da curva de dissociação, além de ser rápido e automatizado (Traub *et al.*, 2005). Esta técnica já foi aplicada em protozoários parasitas para se avaliar o sucesso do tratamento à doença de Chagas (Britto *et al.*, 1999); na identificação de espécies de *Plasmodium* (de Monbrison *et al.*, 2003), diagnóstico de *Giardia*, *Entamoeba* e *Cryptosporidium* (Verweij *et al.*, 2004), quantificação e identificação de *Leishmania* (Bretagne *et al.*, 2001; Castilho *et al.*, 2008; Tupperwar *et al.*, 2008), etc.

Em protozoários patogênicos, o fenótipo de resistência a drogas pode estar associado a mutações genéticas que podem ser monitoradas por ferramentas moleculares. Já foram determinadas mutações pontuais em vários genes de *Plasmodium*, principalmente com função de transporte, relacionadas à resistência a cloroquina e a pirimetamina (Hayton *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 1990; Wellems & Plowe, 2001). Polimorfismos foram também observados em espécies de *Trypanosoma* resistentes ao cloreto de isometamidium e ao aceturato de diminazeno (Delespaux *et al.*, 2005, 2006, 2007). Apesar de já ter sido observado uma estrutura heterogênea em isolados clínicos de *L. donovani* (Laurent *et al.*, 2007), ainda não foi possível determinar marcadores moleculares envolvidos na resistência ao antimônio em leishmaniose. Análises de expressão gênica indicam possíveis alvos relacionados ao mecanismo de resistência, entretanto fornecem dados contrastantes dependendo dos isolados clínicos em estudo (Decuypere *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2007). A descoberta de marcadores moleculares para a resistência a drogas em *Leishmania* tornaria possível o desenvolvimento de estratégias mais efetivas para o controle da doença, permitindo a contenção de isolados resistentes nas regiões endêmicas e a realização de um excelente prognóstico clínico-patológico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar marcadores moleculares relacionados à resposta terapêutica ao antimoníato de meglumina na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no Brasil.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar polimorfismos nos genes alvo AQP1, HSP70, MRPA e TR nos isolados em estudo e avaliar a sua correlação com a resposta terapêutica.
- ✓ Estudar o perfil de expressão de genes envolvidos na resistência ao antimônio pentavalente (AQP1,  $\gamma$ -GCS, MRPA, TR, GS, TDR1) nos isolados em estudo e analisar a sua relação com a resposta ao tratamento.
- ✓ Realizar uma análise de agrupamentos e estudar a diversidade genética encontrada nos isolados clínicos selecionados e identificar possíveis relações fenotípicas.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Desenho experimental**

O desenho experimental seguido para a análise das seqüências e do perfil de expressão dos genes alvo está descrito nas figuras 3 e 4. A metodologia será melhor descrita abaixo.

### **3.2. Obtenção da cultura de parasitos**

Parasitos isolados de pacientes com leishmaniose cutânea, antes do início do tratamento com antimoniato de meglumina, foram obtidos e caracterizados, através de eletroforese de multilocus enzimático, junto a Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), RJ, Brasil. Neste trabalho foram selecionados isolados de *L. braziliensis*, todos classificados como zimodema 27, e de *L. guyanensis*, estes classificados como zimodema 23, seguindo a classificação em zimodemas da CLIOC. Dados clínicos, origem geográfica e identidade das amostras em estudo com as respectivas análises realizadas estão resumidos nas tabelas 2 e 3. Depois de retirados da criopreservação, as formas promastigotas dos parasitos foram cultivados *in vitro* em meio bifásico NNN ágar sangue, contendo como sobrenadante o meio líquido Schneider para *Drosophila* (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis – MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; *Nutricell* Nutrientes Celulares LTDA, Campinas – SP, Brasil) inativado por calor (Hendricks *et al.*, 1978).

### **3.3. Análise de seqüências de DNA**

#### **3.3.1. Isolamento de DNA**

Promastigotas oriundos de culturas primárias mantidas em meio bifásico foram expandidos a 25°C em frascos plásticos de cultura contendo meio líquido Schneider com SFB à 20% até alcançarem uma densidade de cerca de  $1 \times 10^7$  células/mL. As células eram então coletadas por centrifugação a 4.000rpm por 10min a 4°C e, posteriormente, lavadas duas vezes com uma solução tampão de TE 2:1 (Tris 0,2M, EDTA 0,1M e pH 8,0).



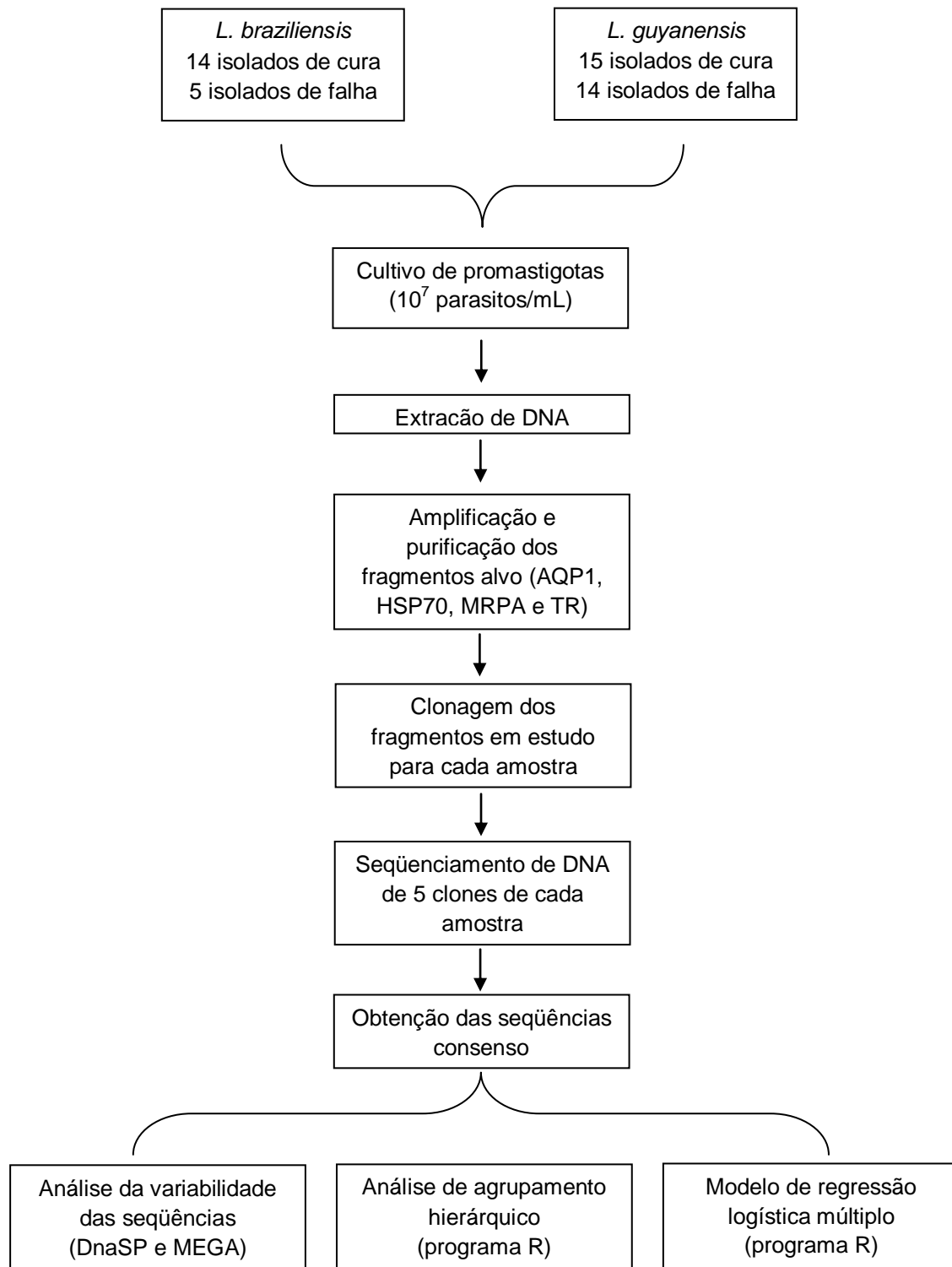


Figura 3 – Desenho experimental desenvolvido para a abordagem de seqüenciamento de DNA e análise de genes relacionados à resistência a drogas em isolados clínicos de *Leishmania* apresentando diferentes respostas terapêuticas.

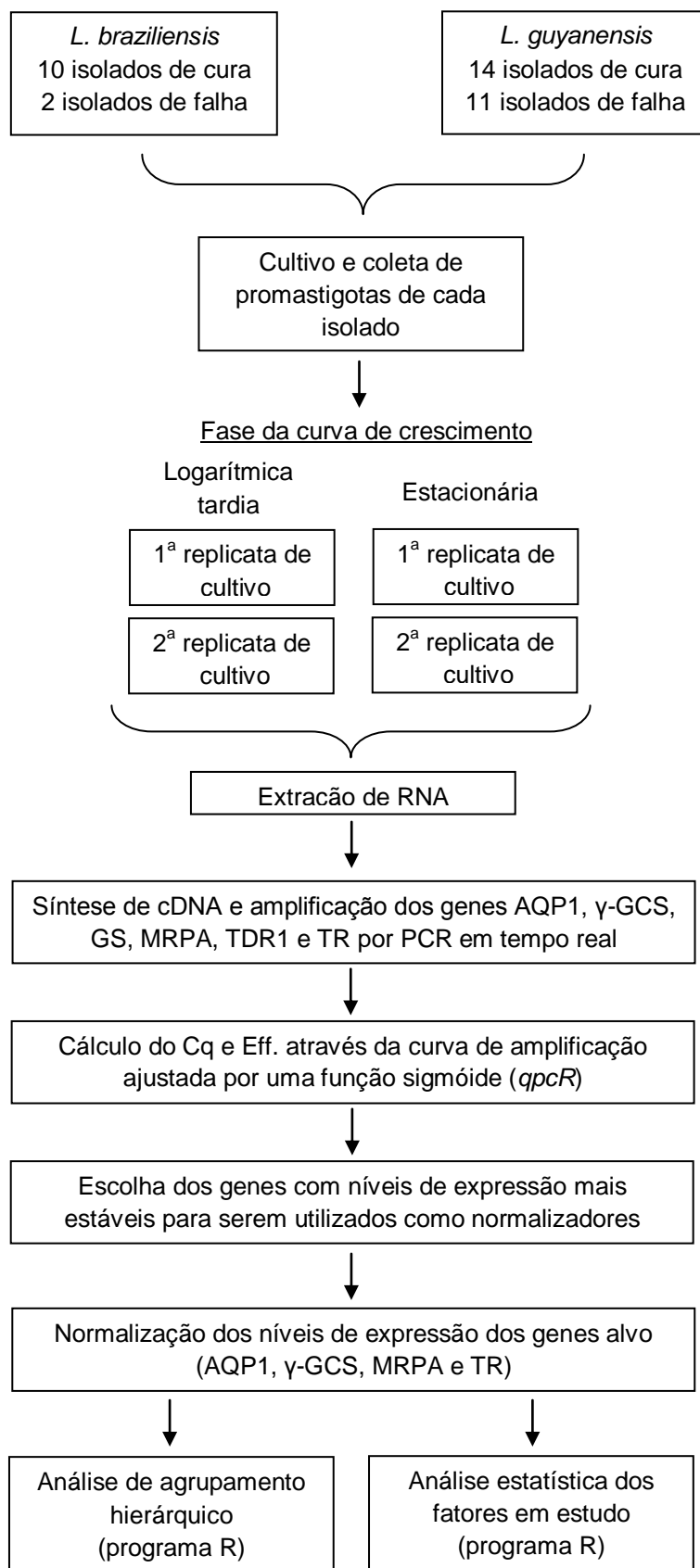


Figura 4 – Desenho experimental desenvolvido para a análise do perfil de expressão de genes relacionados à resistência a drogas em promastigotas de isolados clínicos de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* apresentando diferentes respostas terapêuticas, cultivados e coletados em duplicata e em duas fases do crescimento do parasito.

Tabela 2 – Dados clínicos, origem geográfica e identidade das amostras de *L. (Viannia) braziliensis* em estudo, depositadas na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), com as respectivas análises realizadas.

IOC/L	Resposta Terapêutica *	Estado de Origem	Análise de seqüências de DNA	Análise de expressão gênica
2463	FALHA	BA	X	X
2538	CURA	RJ	X	X
2823	CURA	RJ	X	X
2842	CURA	BA	X	X
2846	CURA	BA	X	X
2867	FALHA	BA	X	-
2869	CURA	BA	X	X
2871	CURA	BA	X	X
2872	CURA	BA	X	-
2876	FALHA	BA	X	-
2878	CURA	BA	X	X
2889	CURA	BA	X	X
2891	CURA	BA	X	-
2892	CURA	BA	X	X
2893	CURA	BA	X	-
2918	CURA	RJ	X	X
2927	FALHA	BA	X	X
2928	FALHA	BA	X	-
2934	CURA	BA	X	-

\* Os pacientes foram considerados curados quando se observou completa recuperação durante os primeiros 3 meses após o tratamento com antimoniato de meglumina (Glucantime®, Rhodia, São Paulo – SP, Brasil) a 20mg de SbV/kg/dia aplicado intra-venosa ou intra-muscular por 20 dias. Caso ocorresse uma persistência ou piora dos sintomas após o mesmo período de tempo, os pacientes eram diagnosticados como falha terapêutica.

Tabela 3 – Dados clínicos, origem geográfica e identidade das amostras de *L. (Viannia) guyanensis* em estudo, depositadas na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), com as respectivas análises realizadas.

IOC/L	Resposta Terapêutica *	Estado de Origem	Análise por seqüenciamento de DNA	Análise de expressão gênica
2334	FALHA	AM	X	X
2335	CURA	AM	X	X
2336	CURA	AM	X	X
2337	CURA	AM	X	X
2341	FALHA	AM	X	X
2346	FALHA	AM	X	-
2354	FALHA	AM	X	X
2356	FALHA	AM	X	X
2357	FALHA	AM	X	-
2358	FALHA	AM	X	-
2362	FALHA	AM	X	X
2366	FALHA	AM	X	X
2370	CURA	AM	X	X
2371	FALHA	AM	X	X
2372	FALHA	AM	X	X
2378	FALHA	AM	X	X
2389	CURA	AM	X	X
2391	CURA	AM	X	X
2397	FALHA	AM	X	X
2398	FALHA	AM	X	X
2404	CURA	AM	X	-
2405	CURA	AM	X	X
2407	CURA	AM	X	X
2414	CURA	AM	X	X
2956	CURA	AM	X	X
2957	CURA	AM	X	X
2958	CURA	AM	X	X
2959	CURA	AM	X	X
2960	CURA	AM	X	X

\* Os pacientes foram considerados curados quando se observou completa recuperação durante os primeiros 3 meses após o tratamento com antimoniato de meglumina (Glucantime®, Rhodia, São Paulo – SP, Brasil) a 20mg de SbV/kg/dia aplicado intra-venosa ou intra-muscular por 20 dias. Caso ocorresse uma persistência ou piora dos sintomas após o mesmo período de tempo, os pacientes eram diagnosticados como falha terapêutica.

A massa de parasitas, imersa em 10-50µL de líquido residual do tampão de lavagem, era estocada a -20°C até ser submetida ao processo de extração de DNA genômico com o auxílio do produto *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison – WI, EUA), seguindo-se o protocolo de isolamento de DNA de cultura de células fornecido pelo fabricante.

### **3.3.2. Análise da qualidade do DNA genômico**

O DNA isolado das amostras em estudo foi visualizado em um gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, como descrito abaixo. Analisou-se o grau de degradação do DNA para a sua posterior utilização nas reações em cadeia da DNA polimerase. Após a eletroforese realizou-se a quantificação do DNA genômico através da medida de absorvância em um comprimento de onda de 260nm, em um espectrofotômetro *Eppendorf Biophotometer* (Bioreserch do Brasil, São Paulo – SP, Brasil). De acordo com Sambrook *et al.* (1989), uma solução de DNA dupla fita, numa concentração de 50ng/µl possui uma  $A_{260nm}$  de 1,0. Assim, a concentração de DNA das amostras estudadas foi calculada pela expressão  $C = 50 \times D \times A_{260nm}$ , onde C representa concentração de ácidos nucleicos em ng/µL e D é o fator de diluição. A razão entre os dois valores de absorvância ( $A_{260nm} / A_{280nm}$ ) também foi calculada a fim de estimar a contaminação por proteínas (Romano, 1998).

### **3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose a pH neutro**

As preparações de DNA genômico foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O gel de agarose foi preparado em TAE 1X (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM).

Foram aplicados em cada poço do gel, aproximadamente 5µl da amostra, preparado previamente com 2µl do tampão de amostra (glicerol 30%, Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM a pH 8,0, azul de bromofenol 0,25%). Além disso, em um poço aplicou-se 5µl do marcador de peso molecular adequado, descrito abaixo, correspondendo a uma quantidade final de 250ng para os marcadores de concentração conhecida. O tampão de corrida utilizado foi o TAE 1X e a corrida eletroforética foi realizada a uma amperagem constante (100mA) por aproximadamente 60 minutos, fornecida pela fonte DYY-6CBA POWER SUPPLY (*BioAmerica, Inc.*, São Paulo – SP, Brasil).

Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso numa solução contendo brometo de etídio (EtBr) 0,5µg/ml por 15min. Posteriormente, o gel foi retirado e imerso em água destilada para remover o excesso de EtBr durante 20min. O DNA foi visualizado pela fluorescência do brometo de etídio quando exposto aos raios UV (320nm) em um transluminador T1201 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis – MO, EUA); e a imagem do gel foi capturada através do *DNr Bio-Imaging Systems MiniBis Pro* (BioAmerica, Inc., São Paulo – SP, Brasil).

A visualização dos resultados das reações em cadeia da DNA polimerase foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), como descrito acima.

Os marcadores de peso molecular utilizados foram: uma solução de fragmentos de DNA do fago  $\lambda$  digerido com *Hind* III, um marcador de alto peso molecular utilizado como referência quando realizado uma eletroforese com DNA genômico ou plasmidial; uma solução de fragmentos de DNA do bacteriófago  $\phi$ X-174 digerido com *Hae* III, um marcador de baixo peso molecular utilizado como referência quando realizado uma eletroforese de produtos de PCR inferiores a 1400pb; e uma solução de 1kb DNA *Step Ladder* que contem 10 fragmentos compreendendo 1-10kb, utilizado como referência quando realizado uma eletroforese de produtos de PCR superiores a 1400pb e de DNA plasmidial. Os dois primeiros marcadores foram obtidos através da *Biotools B&M Labs*, S.A. (Madri, Espanha) e o último pela *Prodimol Biotecnologia S.A.* (Belo Horizonte, Brasil).

#### **3.3.4. Amplificação dos genes em estudo por reação em cadeia da DNA polimerase**

Quatro regiões do genoma de *Leishmania* foram amplificadas utilizando-se como substrato, o DNA genômico previamente isolado e oligonucleotídeos específicos (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). A primeira corresponde a região 3' do gene da *heat-shock protein 70* (HSP70), a segunda ao gene da aquagliceroporina 1 (AQP1) adicionado a ~30pb em ambas as extremidades não codificantes, a terceira ao gene parcial da tripanotiona redutase (TR) e, por último, a região 3' do gene da *multidrug resistance associated protein A* (MRPA) adicionado a ~500pb da porção 3' não codificante.

Os oligonucleotídeos (Tabela 4) foram desenhados a partir de seqüências já depositadas de *L. braziliensis* e/ou *L. guyanensis* no *GenBank*

Tabela 4 – Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões alvo.

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência do oligonucleotídeo (direção 5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)
Aquagliceroporina 1	AQP1F AQP1R	CTATGAGGGCGAAGTCCAG TGGCAGAGCAAGTTAGAGCA	938
<i>Heat-shock protein</i> 70	HSP70F HSP70R	AAGCGCAAGAACAAGGGTAA TAGTCGACCTCCTCGACCTT	1223
<i>Multidrug resistance</i> <i>associated protein A</i>	MRPA-F MRPA-R	ACTCGCCGTATCAAGAGCAT AAACTAACACTGAGAGAGCATCAA	1833
Tripanotiona redutase	TR-F TR-R	CCCACATCCACTCACAAAAAT CAAATTACAGCTGAGCTTTTCGAC	1516

\* F – Oligonucleotídeo *forward*; R – Oligonucleotídeo *reverse*.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), com o auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007).

Em um tubo *ependorf* estéril *Axygen Scientific Inc.* (Union City - CA, EUA) de 0,2mL realizou-se as reações de PCR para um volume final de 50µL. A concentração final dos reagentes utilizados para cada região do DNA amplificada encontra-se nas tabelas 5 e 6. A quantidade de DNA utilizada foi de 300ng para a amplificação do gene AQP1 e variou de 10-50ng para os genes TR e MRPA, e de 50-100ng para o gene HSP70. Além das amostras analisadas na reação de PCR, foi utilizado um controle negativo, que continha água no lugar do DNA, e o restante dos reagentes.

O processo de amplificação ocorreu no termociclador PTC-200 (*MJ Research Inc.*, Waltham – MA, EUA), programado com os diferentes passos de desnaturação, anelamento e extensão para cada gene em estudo, descrito na tabela 7. Após as reações de PCR, as amostras eram mantidas a 16°C e quando retiradas do equipamento eram estocadas a -20°C até o devido uso. Para análise do produto da reação, uma alíquota de 5µl foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente.

### **3.3.5. Purificação dos fragmentos amplificados**

Após a confirmação do sucesso da amplificação dos genes em estudo para cada amostra, o restante do volume da reação foi aplicado em um gel de agarose 0,8%. As bandas referentes aos fragmentos em estudo foram excisadas e submetidas ao processo de purificação utilizando-se o produto *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison – WI, EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O resultado da purificação foi ressuspendido em 25µL de água ultrapura estéril. A concentração de DNA purificado foi estimada pela sua visualização em um gel de agarose 1% corado com EtBr, comparando-se com um marcador molecular de concentração conhecida.

### **3.3.6. Clonagem dos fragmentos purificados**

De modo a minimizar os erros de leitura da Taq DNA polimerase durante a reação de PCR, optou-se por utilizar uma enzima de alta fidelidade, que apresenta ação exonucleásica 3' → 5'. Ambas as enzimas utilizadas durante este estudo amplificam



Tabela 5 – Componentes e sua concentração final da reação em cadeia da DNA polimerase das regiões referentes aos genes HSP70, MRP1 e TR.

Reagentes	Concentração final
Tampão de reação 10X*	1X
MgSO <sub>4</sub> 50mM	2mM
Mistura de dNTP's 1mM	0,2mM cada
Oligonucleotídeo F (5μM)	0,3mM
Oligonucleotídeo R (5μM)	0,3mM
H <sub>2</sub> O ultrapura estéril	q.s.p. 50μL de reação
Platinum Taq DNA Polimerase de Alta fidelidade (5U/μL)**	1 U

\* Tris-SO<sub>4</sub> 600mM (pH 8,9), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180mM.

\*\* Enzima obtida pela *Invitrogen Corporation* (São Paulo – SP, Brasil).

F – Oligonucleotídeo *forward*; R – Oligonucleotídeo *reverse*.

Tabela 6 – Componentes e sua concentração final da reação em cadeia da DNA polimerase da região referente ao gene AQP1.

Reagentes	Concentração final
Tampão de reação 10X*	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3mM
Mistura de dNTP's 1mM	0,2mM cada
Oligonucleotídeo F (5μM)	0,8mM
Oligonucleotídeo R (5μM)	0,8mM
H <sub>2</sub> O ultrapura estéril	q.s.p. 50μL de reação
FideliTaq DNA polimerase (5U/μL)**	1 U

\* Tris-HCl 100mM (pH 8,6), KCl 500mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM.

\*\* Enzima obtida pela *GE Healthcare Life Sciences* (São Paulo – SP, Brasil).

F – Oligonucleotídeo *forward*; R – Oligonucleotídeo *reverse*.

Tabela 7 – Condições térmicas da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) utilizadas nas reações de amplificação das regiões em estudo para as amostras de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

<b>Gene AQP1</b>			
Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Primeiro	Desnaturação	95	2
	Anelamento	53	1
	Extensão	68	1
Do 2º ao 29º	Desnaturação	95	0,5
	Anelamento	53	1
	Extensão	68	1
Último	Desnaturação	95	0,5
	Anelamento	53	1
	Extensão	68	5
<b>Gene HSP70</b>			
Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Primeiro	Desnaturação	95	2
	Anelamento	63	0,5
	Extensão	68	1
Do 2º ao 29º	Desnaturação	95	0,5
	Anelamento	63	0,5
	Extensão	68	1
Último	Desnaturação	95	0,5
	Anelamento	63	0,5
	Extensão	68	5
<b>Gene MRPA</b>			
Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Primeiro	Desnaturação	94	4
	Anelamento	60	0,5
	Extensão	68	2
Do 2º ao 29º	Desnaturação	94	0,5
	Anelamento	60	0,5
	Extensão	68	2
Último	Desnaturação	94	0,5
	Anelamento	60	0,5
	Extensão	68	6

Tabela 7 – Continuação.

<b>Gene TR</b>			
Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Primeiro	Desnaturação	94	2
	Anelamento	60	0,5
	Extensão	68	1,5
Do 2º ao 5º	Desnaturação	95	0,5
	Anelamento	60	0,5
	Extensão	68	1,5
Do 6º ao 29º	Desnaturação	95	0,5
	Anelamento	65	0,5
	Extensão	68	1,5
Último	Desnaturação	95	0,5
	Anelamento	65	0,5
	Extensão	68	6

fragmentos com pontas coesivas e com a adição de única adenina (A) na porção 3'.

Dois produtos foram testados para analisar a eficiência da clonagem: (i) *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega, Madison – WI, EUA) que se liga a fragmentos contendo um adenina nas suas pontas; (ii) *pMOSBlue blunt ended cloning kit* que se liga a fragmentos com pontas coesivas. O primeiro produto apresentou maior eficiência e foi escolhido como método de clonagem.

O *pGEM®-T Easy Vector* é um plasmídeo de 3015pb, que apresenta um gene de resistência à ampicilina, assim como uma timina (T) terminal em ambas as pontas (Figura 5). Este vetor tem a vantagem de possuir uma porção do gene *lacZ* que codifica para enzima  $\beta$ -galactosidase, dentro do qual se localiza o sítio múltiplo de clonagem. A presença ou ausência do inserto no vetor pode ser facilmente detectada após a cultura de células transformadas com este plasmídeo através de um ensaio cromogênico simples utilizando dois componentes isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo (X-gal).

A reação de ligação dos fragmentos purificados obedeceu à relação molar vetor/inserto e protocolo descrito na tabela 8. Após a mistura de todos os reagentes a reação foi incubada por 1 hora a 25°C e, posteriormente, a 4°C de um dia para o outro. Em seguida, as reações de ligação foram estocadas a -20°C até serem submetidas ao processo de transformação.

### **3.3.7. Transformação dos produtos da ligação em células competentes de *Escherichia coli***

A técnica de transformação utilizada foi a do choque térmico com o auxílio de células competentes de *Escherichia coli*, seguindo-se o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). No geral, 2 $\mu$ L do produto de cada reação de ligação foi adicionado a um tubo contendo 50 $\mu$ L das células *E. coli* DH5 $\alpha$  que tinham sido previamente retiradas de um freezer a -80°C e deixadas a descongelarem imersas em gelo. A mistura foi incubada em gelo por 30min e posteriormente realizou-se o choque térmico a 42°C por 45s. Os tubos foram então recolocados no gelo por 3 min e, posteriormente, adicionou-se 200 $\mu$ L de meio LB líquido (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de NaCl e pH 7,0). Em seguida, as células foram incubadas à 37°C sob agitação (200rpm) por 1 hora. 200 $\mu$ L da solução contendo as células transformadas com os produtos da ligação foram plaqueados, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo 20mL de meio LB ágar

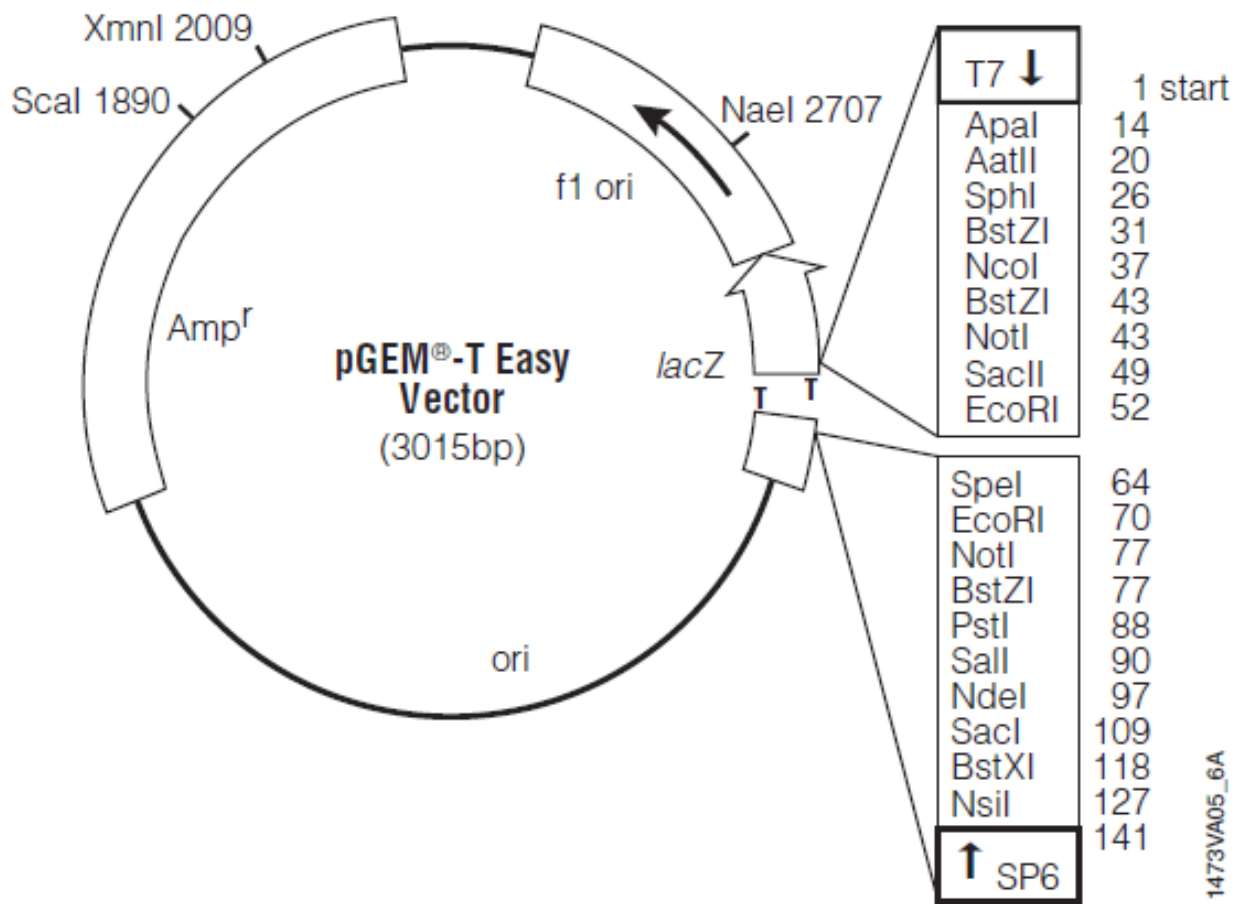


Figura 5 – Desenho esquemático do mapa circular do *pGEM®-T Easy Vector* com pontos de referência da sua seqüência nucleotídica.

Tabela 8 – Protocolo da reação de ligação dos fragmentos purificados da PCR no *pGEM®-T Easy Vector*.

Componentes	Volume (µL) dos componentes da reação para cada gene			
	AQP1	HSP70	MRPA	TR
Tampão de ligação 2X	2,5	3	4	4
<i>pGEM®-T Easy Vector</i> (50ng)	0,5	0,5	0,5	0,5
Fragmento purificado da PCR	1,5	2	3	3
T4 DNA ligase (3U/µL)	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume (µL) final da reação	5	6	8	8
Relação molar inserto/vetor	3,5:1	5:1	8:1	8:1

suplementado com 100µg/mL de ampicilina, 80µg/mL de X-gal e 0,5mM de IPTG. Posteriormente, incubaram-se as placas à 37°C por 16 horas e observou-se o crescimento de colônias brancas e azuis.

### **3.3.8. Extração de DNA plasmidial**

Para a realização deste trabalho, decidiu-se seqüenciar 5 clones de cada amostra de cada fragmento amplificado. Então, com o auxílio de um palito estéril, 5 colônias brancas foram selecionadas ao acaso das placas contendo as células transformadas de cada reação de ligação e foi realizado um inóculo em 1mL de meio Circlegrow® (40g/L, MP Biomedicals, LLC., Solon – O, EUA), contendo 100µg/mL de ampicilina, em placas de 96 poços de fundo U. Os inóculos foram incubados a 37°C por 21 horas sob agitação (200rpm). Após o crescimento das culturas, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000rpm por 6 minutos à 20°C. A partir das células sedimentadas, os plasmídeos foram purificados de acordo com o método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

Primariamente, as células foram lavadas em 240µL de tampão GET (glucose 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0) e em seguida ressuspendidas em 83µL de GET com RNase (0,4µg/µL). Foram adicionados 80µL de uma solução lise alcalina (NaOH 0,2N e SDS 1%). As placas foram invertidas cerca de trinta vezes para homogeneizar a solução e incubadas à 25°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 80µL de acetato 3M gelado seguido de homogeneização e incubação por 10 minutos à 25°C. Posteriormente, as placas foram também incubadas a 80°C por 40 minutos e resfriadas em gelo por 12 minutos. Após uma centrifugação a 4.000rpm por 9 minutos, o sobrenadante foi transferido e purificado em placas *AcroPrep™ 96 Filter Plates* (Pall do Brasil LTDA, São Paulo – SP, Brasil). O DNA foi então precipitado em isopropanol 100%, lavado em etanol 70% e, finalmente, suspenso em 40µL de água ultrapura estéril.

### **3.3.9. Seqüenciamento dos clones transformados**

Devido ao grande número de clones gerados, apenas 14 clones oriundos de uma mini preparação de DNA plasmidial em placa de 96 poços (cada poço há um clone) eram analisados em gel de agarose 0,8% para estimar a qualidade do plasmídeo isolado por placa. Além disso, o DNA da mesma alíquota de clones já mencionado

foi quantificado através da medida de absorvância num comprimento de onda de 260nm em um *NanoDrop* ND-1000 Spectrophotometer (*NanoDrop Technologies*, Inc., Wilmington – DE, EUA), para estimar a sua concentração.

Neste momento, os diferentes clones obtidos foram seqüenciados com o auxílio do produto *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems Brazil*, São Paulo – SP, Brasil) no seqüenciador automático ABI3730 DNA analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City – CA, EUA), junto a Plataforma de Genômica - seqüenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ. Na reação, foram utilizados como molde 250ng dos plasmídeos purificados e 3,2pmoles de oligonucleotídeos específicos para a região T7 e SP6 presente no *pGEM®-T Easy Vector* (*Promega*, Madison – WI, EUA) e outros oligonucleotídeos especialmente desenhados para o seqüenciamento interno dos fragmentos de maior comprimento (Tabela 9). Um esquema do anelamento dos oligonucleotídeos e dos genes utilizados na amplificação e seqüenciamento encontra-se na Figura 6.

### **3.3.10. Montagem das seqüências**

Após o seqüenciamento, os dados brutos gerados são processados para originar uma seqüência, processo esse chamado de *basecalling*. As seqüências determinadas de cada amostra foram então submetidas a um pacote de programas para montagem e obtenção de seqüências consenso.

O pacote de programas Phred (Ewing *et al.*, 1998a; Ewing & Green, 1998b) e Phrap (Phil Green, *University of Washington*, EUA) é utilizado para a leitura dos dados brutos e montagens das seqüências consenso em ambiente operacional LINUX. Esses pacotes estudam cada sítio da seqüência de DNA, utilizando a seqüência de maior qualidade para determinar os nucleotídeos em cada posição na seqüência consenso (Brown, 2000).

Posteriormente, o pacote Consed (Gordon *et al.*, 1998; 2001) fornece a interface gráfica para a visualização e edição das seqüências consenso montadas pelo programa Phrap.



Tabela 9 – Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento das regiões alvo.

Local do anelamento	Oligonucleotídeo	Seqüência do oligonucleotídeo (direção 5' → 3')
<i>pGEM®-T Easy Vector</i>	T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG
	SP6-R	ATTTAGGTGACACTATAG
HSP70	H300F	AAGGTGCAGTCCCTCGTGT
MRPA	MRPA-SF	GCTGTTGACGGGTCTGT
	MRPA-SR	CACGATGATCTTGTGCGCACT
TR	TR-SF	GGTCAGGTGGACCTGTGCTA
	TR-SR	GCCAATGGCGTAAATGTTGTC

F – Oligonucleotídeo *forward*; R – Oligonucleotídeo *reverse*.

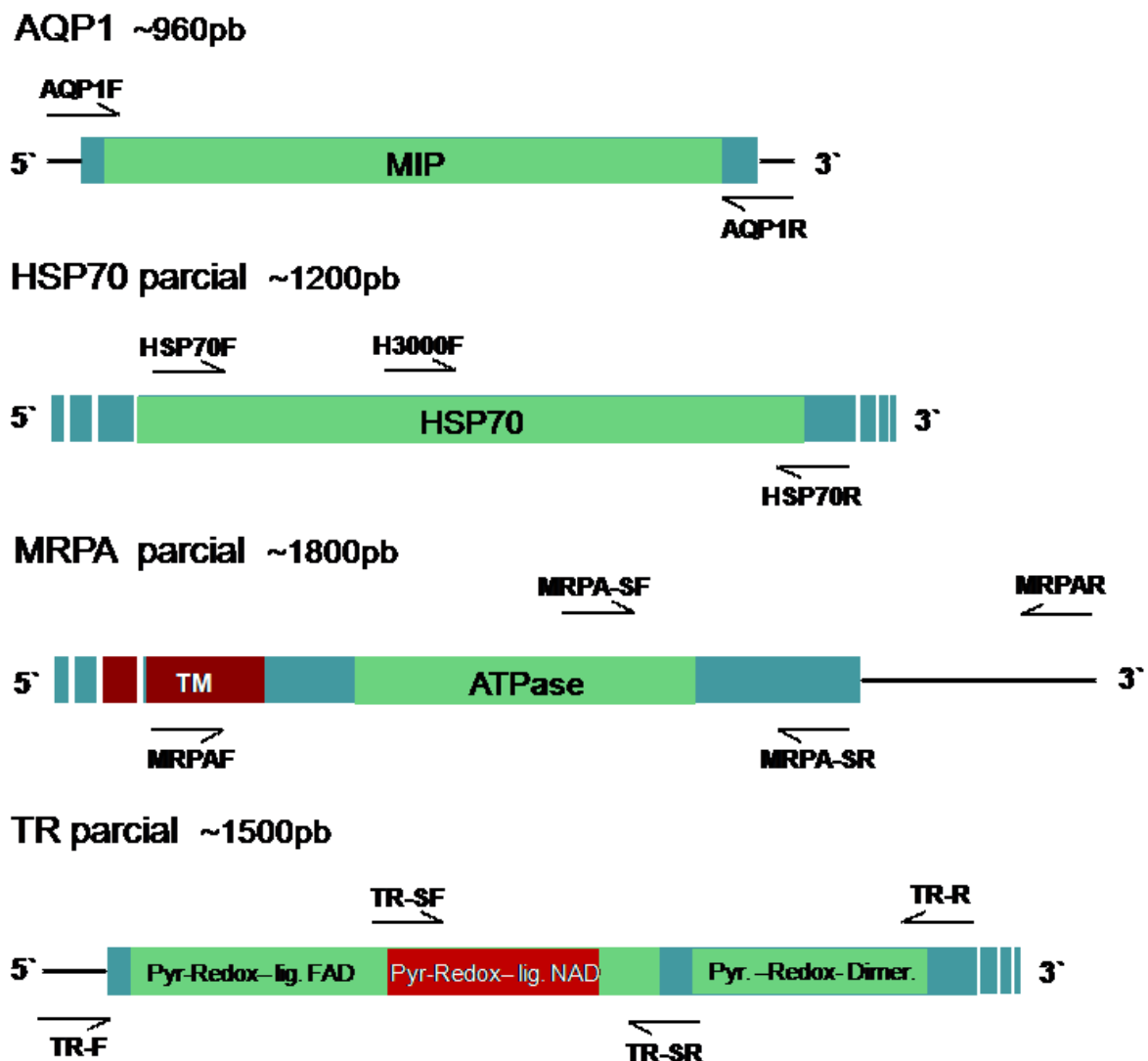


Figura 6 – Desenho esquemático dos genes em estudo e da região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados. As colunas horizontais (cor azul) correspondem à região codificante, pequenos retângulos lado a lado (cor azul) exprimem que há uma continuidade da região codificante que não foi estudada, as regiões em verde ou vermelho correspondem a alguns domínios da proteína, enquanto as linhas em preto representam as regiões não codificantes. Gene: AQP1 (domínio MIP – *Major Intrinsic Protein*, região intermembranar da proteína), HSP70 (domínio HSP70), MRPA parcial (TM – domínio transmembrana; ATPase – domínio de ligação ao ATP) e TR parcial (Pyr. – Redox – lig. a FAD: domínio oxidoreduzidor piridina nucleotídeo-dissulfídica com ligação a FAD<sup>+</sup>; Pyr. – Redox – lig. a NAD: domínio oxidoreduzidor piridina nucleotídeo-dissulfídica com ligação a NAD<sup>+</sup>; Pyr. – Redox – Dimer.: domínio de dimerização e oxidoreduzidor piridina nucleotídeo-dissulfídica).

### **3.3.11. Busca por similaridade das seqüências geradas, em um banco de dados de seqüências nucleotídicas**

As seqüências nucleotídicas geradas foram submetidas à busca por similaridade no *GenBank* (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*) através da ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Zhang *et al.*, 2000), disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. O objetivo foi determinar se as seqüências nucleotídicas obtidas realmente correspondiam à região estudada, através da busca por similaridade com outras seqüências já depositadas e identificadas.

### **3.3.12. Consenso das seqüências dos clones geradas**

De modo a remover a redundância e prováveis erros de leitura da enzima Taq polimerase dos clones seqüenciados de cada amostra, seguiu-se a seguinte estratégia: (i) para cada amostra realizou-se um alinhamento múltiplo dos clones seqüenciados com o auxílio do programa ClustalX versão 2.0.9 (Larkin *et al.*, 2007); (ii) quando polimorfismos eram encontrados dentre os clones em estudo, somente eram considerados verdadeiros quando fossem comprovados pela seqüência de um segundo clone, caso não os polimorfismos eram descartados; (iii) as seqüências dos clones com 100% de identidade eram reduzidas a uma; e (iv) determinação de uma ou mais seqüências consenso dentro dos clones de cada amostra.

### **3.3.13. Análise da diversidade nucleotídica observada**

Todas as seqüências dos clones respectivos as amostras de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* em estudo foram alinhadas com o programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). O alinhamento múltiplo gerado foi utilizado como dado de entrada para os programas DnaSP versão 4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003) e MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Com o auxílio deste primeiro programa, determinaram-se os sítios polimórficos; a diversidade nucleotídica  $P_i$  ( $\pi$ ), a qual é expressa pela média do número de substituições par a par; o número e diversidade dos haplótipos, diferenças genéticas par a par ( $K$ ) e entre grupos ( $K_{xy}$ ); e parâmetros de recombinação ( $R$  e  $R_m$ ). Outros dois programas foram utilizados para confirmar possíveis eventos de recombinação: o RDP2 v. 3.34

(Martin *et al.*, 2005) que emprega 6 diferentes algoritmos para identificar recombinação (RDP, SiScan, BootScan, Chimeric, MaxChi e Geneconv), e o SplitsTree4 v. 4.10 (Huson & Bryant, 2006) que realiza o teste Phi. Para os genes com mais de um domínio, a diversidade  $\pi$  foi também calculada em janelas de 100pb deslizando nas seqüências em estudo a cada 25pb, para avaliar a variabilidade entre eles. As regiões dos domínios conservados foram obtidas numa busca no banco de famílias de proteínas Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e os domínios transmembrana foram determinados com o auxílio do TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

A teoria de evolução neutra foi avaliada pelo teste D de Tajima e D e F de Fu e Li, com e sem grupo externo. *L. guyanensis* foi utilizado como grupo externo para *L. braziliensis* e vice-versa. A grande diferença entre os dois testes é que o de Fu e Li considera a teoria de coalescência, enquanto o outro não (Li *et al.*, 2003). Valores positivos de D implicam seleção natural positiva, enquanto valores negativos correspondem a seleção negativa ou purificadora (Escalante *et al.*, 2004). Além disso, outro teste de evolução neutra mais sensível a mudanças demográficas foi analisado através da comparação das taxas de mutações sinônimas (dS) e não sinônimas (dN), computadas pelo segundo programa mencionado. Utilizou-se o método de Nei e Gojobori com correção de Jukes e Cantor. Quando é observado valores de  $dN < dS$ , acredita-se que uma seleção negativa esteja atuando, enquanto o contrário deve significar uma seleção positiva.

#### **3.3.14. Análise de agrupamento hierárquico das seqüências de DNA**

Os consensos determinados a partir das seqüências geradas dos clones de cada amostra e gene em estudo foram, primeiramente, codificados em dados binários, no qual o nucleotídeo adenina foi representado pelas variáveis *dummies* (0, 0), a timina por (0, 1), a citosina por (1, 0) e a guanina por (1, 1). As regiões não informativas de cada gene, ou seja, as posições que não variam, foram removidas. Devido à natureza dos dados utilizados, a distância escolhida para a construção das matrizes foi a binária, nas quais valores de 1 representam concordância e valores de 0 discordância. Os grupos determinados a partir das matrizes de distância foram validados pelo método de *silhouettes*, no qual a variação de um valor de -1 a 1 permite classificar quão bem uma determinada amostra pertence a um grupo e quão distante um grupo está do outro. Quanto mais próximo de 1 maior a razão de

chances de que os grupos formados são consistentes (Lovmar *et al.*, 2005). De modo a escolher o melhor método dentre os diferentes algoritmos (*single linkage*, *complete linkage* e *ward*) utilizados para agrupamentos hierárquicos, foi calculado o coeficiente de correlação cofenético, o qual gera uma métrica de resolução dos grupos gerados. A métrica com valor mais próximo de 1 determinará o melhor método a ser utilizado (Halkidi *et al.*, 2001).

Posteriormente, foi calculado a razão de chances (*Odds Ratio*) dos sítios variáveis apresentarem informação relevante para a resposta terapêutica através de um modelo de regressão logística múltiplo. O nível de significância adotado para as análises logísticas foi de 95% ( $P < 0,05$ ). Todas as análises acima descritas foram realizadas com o auxílio de pacotes do programa R versão 2.8.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

### **3.4. Análise de expressão gênica**

#### **3.4.1. Isolamento de RNA**

Para cada amostra em estudo, relatadas nas tabelas 2 e 3 para análise de expressão gênica, um inóculo de  $1 \times 10^6$  promastigotas foi cultivado a 25°C em quatro diferentes frascos plásticos de cultura contendo cada um 10mL de meio líquido Schneider com SFB à 10%. O desenho experimental constava de dois pontos de coleta, referentes à fase logarítmica tardia e à fase estacionária da curva de crescimento do parasito, em duplicata. Baseado em ensaios de curva de crescimento realizados por pesquisadores do grupo do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil), coletou-se os parasitos da espécie *L. braziliensis* no quinto e sexto dia e os parasitos da espécie *L. guyanensis* no quarto e quinto dia, após o inóculo. Ambos os dias de coleta correspondem respectivamente às duas fases da curva de crescimento mencionada acima. Portanto, há dois níveis de replicação biológica, o primeiro relacionado aos diferentes espécimes do parasito e o segundo relacionado ao seu cultivo, no qual estão incluídas as diferentes fases do crescimento e suas respectivas duplicatas.

As células eram então coletadas nos pontos da curva de crescimento descritos acima por centrifugação (4.000rpm, 10 min, 4°C) e, posteriormente, lavadas duas vezes com uma solução tampão salina de PBS 1X ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8mM, KCl 2,7mM, NaCl 137mM e pH 7,2) preparada com água tratada com DEPC

(dietil-pirocarbonato). A massa de parasitos era então suspensa numa solução de RNAholder (BioAgency Biotecnologia Ltda., São Paulo – SP, Brasil). A mistura era incubada a 4°C de um dia para o outro, de modo a permitir que a solução de preservação penetre na massa de células por completo, e depois armazenadas a -80°C até o dia do isolamento do RNA.

O método de isolamento escolhido consistiu na utilização do reagente TRIzol® (Invitrogen Corporation, Carlsbad – CA, EUA). Após o descongelamento em gelo, a solução de preservação foi removida por centrifugação (5.000 x g por 6min à 4°C) e a massa de parasitas foi suspensa em 1mL de TRIzol® e incubada a 25°C por 5min. Em seguida, adicionou-se 200µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos com posterior incubação à 25°C por 2-3 minutos. Centrifugou-se, então, por 15 minutos à 4°C e 12.000 x g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O RNA foi então precipitado com isopropanol 100% e lavado com etanol 75%. O precipitado foi suspenso em 30µL de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C.

#### **3.4.2. Remoção do DNA contaminante**

De modo a remover possível DNA genômico contaminante das preparações de RNA total realizadas, utilizou-se uma DNase I recombinante oriunda do produto DNA-free™ (Ambion Inc., Austin – TX, EUA), incubando a mistura a 37°C por 30min e, posteriormente, seguiu-se o protocolo de tratamento rotineiro fornecido pelo fabricante.

#### **3.4.3. Quantificação e análise da qualidade do RNA total**

O RNA total foi quantificado através da medida de absorbância num comprimento de onda de 260nm, em um NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington – DE, EUA). A pureza do RNA foi avaliada através da razão entre dois valores de absorbância: (i)  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  para identificar contaminação protéica e (ii)  $A_{260\text{nm}} / A_{230\text{nm}}$  para identificar contaminação por solventes orgânicos. Ambos os valores devem ser superiores a 1,8 para estimar uma solução com RNA de boa qualidade (Imbeaud *et al.*, 2005).

Além disso, algumas amostras foram selecionadas randomicamente para se avaliar a integridade do RNA, através de uma eletroforese microcapilar medida pelo

*Agilent 2100 bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara – CA, EUA) utilizando em conjunto com o produto RNA 6000 Nano *LabChip® Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara – CA, EUA). O *bioanalyzer* é um equipamento automatizado bioanalítico que permite separações eletroforéticas de acordo com a massa molecular e subsequente detecção de fluorescência induzida via laser. O resultado é visualizado num eletroferograma no qual a quantidade de fluorescência medida correlaciona com a quantidade de RNA numa determinada amostra (Mueller *et al.*, 2000).

#### **3.4.4. Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real quantitativo (qPCR)**

Para a análise do perfil de expressão gênica trabalhou-se com 6 genes que codificam para proteínas com diferentes funções: (i) transporte (AQP1 e MRPA); (ii) metabolismo óxido-redutor (GS,  $\gamma$ -GCS e TR); e (iii) redução celular (TDR1). Isso nos permitiu verificar se o perfil de expressão gênica de diferentes funções celulares estaria relacionado à resposta terapêutica. Baseado em dados já descritos na literatura (Decuypere *et al.*, 2005; Decuypere *et al.*, 2008), os genes AQP1, MRPA, TR e  $\gamma$ -GCS foram analisados como possíveis genes alvo, enquanto os genes TDR1 e GS foram analisados como possíveis controles internos para a normalização dos dados.

Primeiro, o RNA total foi reversamente transcrito à 55°C com o auxílio do produto *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, Alemanha), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante para um volume final de 20 $\mu$ L de reação, contendo aproximadamente 150ng de RNA. Como havia interesse em utilizar o mesmo cDNA para todas as amplificações com os diversos genes em interesse, optou-se por utilizar o oligo (dT)<sub>18</sub> no processo de transcrição reversa, o qual é caracterizado por promover um aumento na sensibilidade mas uma diminuição na especificidade da reação. Também, realizou-se um controle negativo da reação, no qual a enzima transcriptase reversa foi substituída por água tratada com DEPC livre de RNase (Ambion Inc., Austin – TX, EUA), para ser posteriormente utilizado no processo de amplificação por PCR em tempo real.

O cDNA resultante de cada amostra foi então diluído 10X e 2 $\mu$ L foi adicionado ao volume total de 25 $\mu$ L das reações de PCR quantitativa, contendo 1X B-R SYBR® *Green SuperMix for iQ™* (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg – MD, EUA) e oligonucleotídeos especificados na tabela 10. Todos os ensaios de qPCR foram

Tabela 10 – Características, seqüência e condições dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.

Gene	Proteína	Função / Relevância	Seqüência do oligonucleotídeo	Concentr. final	Tamanho do produto	T <sub>M</sub> do produto
AQP1	Aquagliceroporina 1	Influxo de Sb(III)	5' CTTTGCGGTGTGGAGTGAGATA 3' 5' CCAGAGTTGATACCTGTCGTGATAC 3'	600ηM	156pb	87-87,5°C
γ-GCS	γ-glutamilcisteína sintetase	Biosíntese de tiol	5' CTACGACTCTATCTCCATCTTCATCA 3' 5' CACACCAGCCTTCTCCAGC 3'	600ηM	115pb	84,5-85°C
TR	Tripanotiona redutase	Redutor da forma dissulfídica da tripanotiona	5' GAAAAGGATGGCGAGGTGC 3' 5' AGATGCCTACGCTCTGAATGAT 3'	500ηM	76pb	87,5-88,5°C
MRPA	<i>Multidrug resistance associated protein A</i>	Seqüestro do conjugado tiol-Sb(III)	5' AAGTGGGCAGCGACTCAAA 3' 5' CCAGTTCAGCGTCTCCGTT 3'	400ηM	81pb	84,5-85°C
TDR1	Redutase 1 dependente de tiol	Redutor de Sb(V)	5' GCTTCTTCCTGGACAACGC 3' 5' CTCAAACTCAGCCTTCGCATC 3'	500ηM	89pb	84-84,5°C
GS	Glutationa sintetase	Biosíntese de tiol	5' ACGAAGAGCGACGCCA 3' 5' GTGACGCCGTAGATGCCA 3'	400ηM	158pb	86-86,5°C

Concentr. – concentração; T<sub>M</sub> – temperatura de dissociação

\* Oligonucleotídeos desenhados pela pesquisadora Ms. Vanessa Adai do Instituto de Medicina Tropical *Alexander von Humboldt*, Universidad Peruana Cayetano Heredia (dados não publicados).



realizados em um iCycler (Bio-Rad, Hercules – CA, EUA) usando o seguinte protocolo: um passo inicial de desnaturação (95°C por 3min), seguido por 34 ciclos de 30s a 95°C (desnaturação), 15s a 60°C (anelamento) e 15s a 72°C (extensão). Posteriormente, a PCR foi imediatamente seguida de uma análise de curva de dissociação no qual ocorre um aumento progressivo na temperatura de 0,5°C a cada 10s, partindo de uma temperatura de 45°C até chegar a 95°C. Este procedimento é realizado para se certificar que o produto esperado foi amplificado e se produtos não específicos ou dímeros de oligonucleotídeos estão sendo formados. Os seguintes controles foram incluídos para cada corrida de cada gene da qPCR: (i) controle negativo da síntese de cDNA (reação sem a transcriptase reversa) e (ii) controle negativo sem amostra de cDNA. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

#### **3.4.5. Quantificação dos níveis de expressão**

A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das triplicatas da reação de PCR quantitativo em tempo real de cada amostra, utilizou-se um ajuste de função logística ou sigmóide de 3, 4 ou 5 parâmetros para representar a curva de amplificação, usando-se para tal o pacote *qpcR* (Ritz *et al.*, 2008) desenvolvido para o ambiente estatístico R versão 2.8.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). A escolha da melhor função paramétrica, ajustada pela minimização do erro médio quadrático dos valores de fluorescência das triplicatas nos 34 ciclos, baseou-se no *Akaike's Information Criterion* (AIC). O ciclo de quantificação (Cq) foi determinado pelo ponto de interseção de uma linha perpendicular, a partir do ponto de máxima da função de segunda derivada da função logística escolhida para representar a curva de amplificação da triplicata de reação de cada amostra (Figura 7). O uso deste ponto característico da curva de acúmulo de fluorescência ajustada é conveniente uma vez que ele se encontra numa região de eficiência constante na fase exponencial da curva de amplificação, além de ser invariante ao poço ou placa de origem da reação de PCR (Rebrikov & Trofimov, 2006), diferente de métodos mais tradicionais como a do ciclo *threshold*. A eficiência (E ou Eff.) foi calculada para cada amostra utilizando a razão entre o valor de fluorescência no ciclo de quantificação sobre o do ciclo anterior.

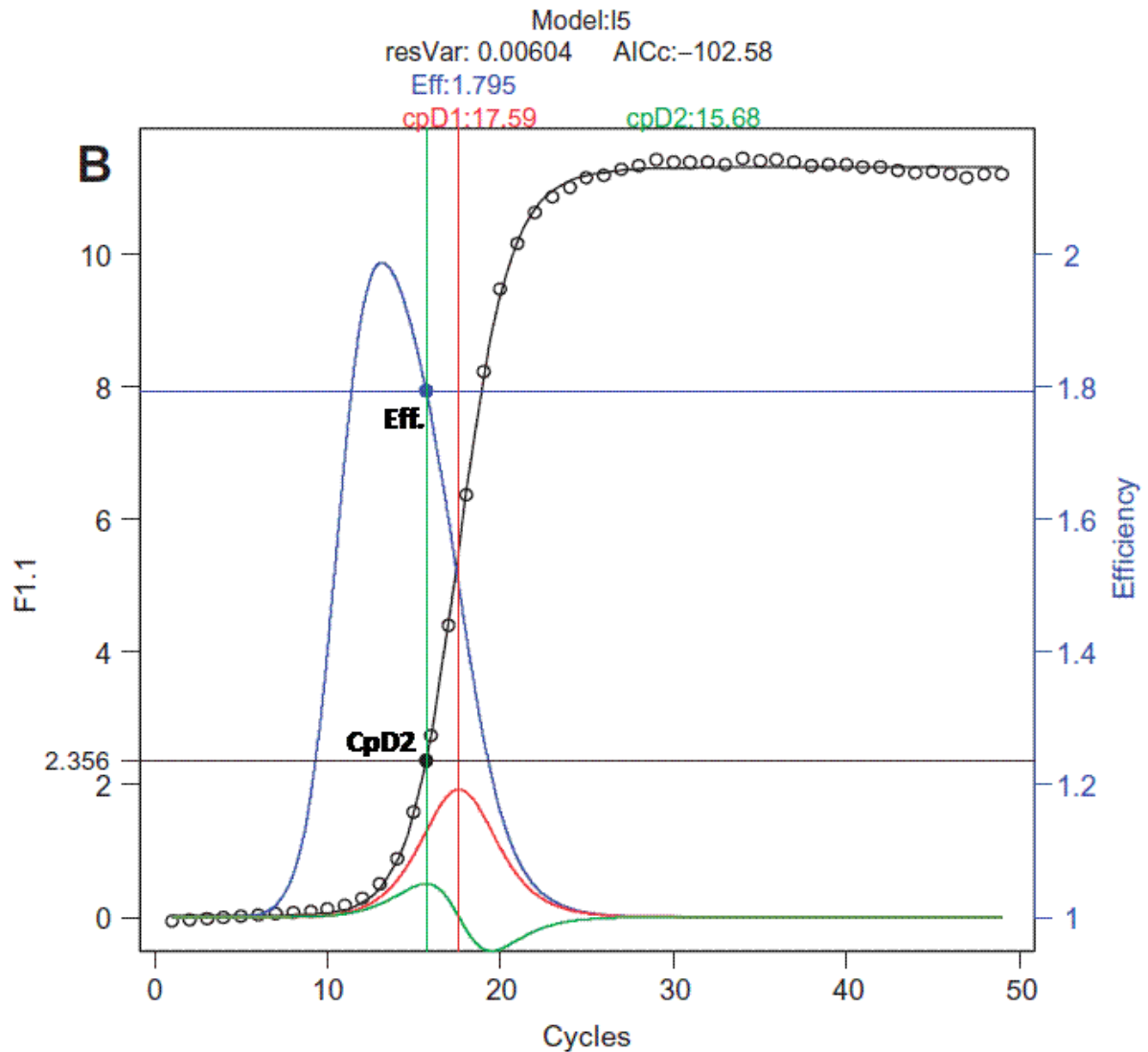


Figura 7 – Gráfico representando a curva de acúmulo de fluorescência (preto) utilizando a função logística de 5 parâmetros e a representação da função da sua primeira (vermelho) e segunda (verde) derivada. O ponto de interseção da linha vertical verde, que parte do ponto de máxima da função de segunda derivada com a curva de acúmulo de fluorescência corresponde ao ponto característico da amostra (Cq ou CpD2) e com a curva de eficiência (azul) corresponde à eficiência de amplificação da amostra (Eff.). Fonte: Ritz *et al.* (2008).

Posteriormente, os dados de  $E^{Cq}$  de cada amostra, tanto de *L. braziliensis* como *L. guyanensis*, foram processados em conjunto de acordo com Vandesompele *et al.* (2002) para servir de entrada para o pacote geNorm, o qual determina os genes com expressão mais estável, ou seja, os genes normalizadores dentro do seu grupo de estudo. Os níveis de expressão normalizados foram então obtidos pela razão entre os dados brutos de expressão de cada amostra e seu respectivo fator de normalização, dado pela média geométrica dos níveis de expressão dos genes normalizadores (GS e TDR1).

#### **3.4.6. Análise estatística**

De modo a obter uma distribuição linear e normal dos níveis de expressão normalizados para serem utilizados na análise estatística, aplicou-se uma função logarítmica de base 2. Foram ajustados modelos de análise de variância (*N-Way ANOVA*) para os dados de expressão normalizados de cada gene alvo, de modo a comparar os grupos estudados através dos fatores: (i) fase da curva de crescimento [logarítmica tardia (fase 1) ou estacionária (fase 2)], (ii) espécie (*L. braziliensis* ou *L. guyanensis*) e (iii) resposta terapêutica (falha ou cura); assim como as suas interações de primeira (Espécie: Resposta terapêutica; Organismo: Fase da curva de crescimento e Resposta terapêutica: Fase da curva de crescimento) e segunda ordem (Organismo: Resposta terapêutica: Fase da curva de crescimento). Com o intuito de corrigir as múltiplas comparações geradas das interações de primeira e segunda ordem foi utilizado o teste de diferenças honestas de significância de Tukey. Previamente às análises de ANOVA foram realizados testes de normalidade de distribuição dos dados de expressão normalizados de Shapiro-Wilk (1965) e o teste de Levene (1960) para avaliar a igualdade de variância entre os grupos formados pelos fatores descritos. A comprovação do bom ajuste dos modelos mais parcimoniosos de ANOVA foi feita através da análise do resíduo regularizado desses pela estatística de Shapiro-Wilk e por gráficos de distribuição e QQ-plots (*quantile-quantile plots*). Para todas as análises, utilizou-se o nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ). As comparações realizadas foram representadas em gráficos contendo os níveis de expressão normalizados de cada grupo com o erro padrão da média. Todas as análises acima descritas foram realizadas com o auxílio de pacotes do programa R versão 2.8.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

### 3.4.7. Análise de agrupamento hierárquico dos perfis de expressão gênica

Os dados dos níveis de expressão normalizados log-transformados (base 2) foram utilizados nas análises de agrupamentos hierárquicos. Foram avaliadas as distâncias de Manhattan (ou *city block*), Euclidiana e Minkowski e os métodos de ligação *single linkage*, *complete linkage* e *ward*. Os grupos formados foram validados pela medida de *silhouettes* e a melhor distância e algoritmo de agrupamento foram determinados pelo coeficiente de correlação cofenético, assim como descrito para os dados de seqüências de DNA (seção 3.3.14). Todas as análises acima descritas foram realizadas com o auxílio de pacotes do programa R versão 2.8.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise das seqüências de DNA geradas

#### 4.1.1. Seqüências consenso e diversidade genética

##### 4.1.1.1. Gene AQP1

As seqüências geradas foram de ótima qualidade (phred>20), apresentando 899pb, no qual compreenderam 30pb na região 5' não codificante, seguido do gene completo de AQP1 (858 pb) e mais 11pb na região 3' não codificante. De acordo com os parâmetros previamente estabelecidos, determinou-se o seguinte número de seqüências consenso: 7 e 19 para os isolados de *L. braziliensis* obtido de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente; 15 e 21 para os isolados de *L. guyanensis* obtidos de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente. A maioria das amostras foi representada por apenas uma seqüência consenso, entretanto em alguns casos obtiveram 2 (*L. braziliensis*: IOC/L 2538, 2842, 2872, 2878, 2892, 2867 e 2876; *L. guyanensis*: IOC/L 2337, 2389, 2391, 2407 e 2357) e 3 em apenas uma *L. guyanensis* (IOC/L 2958). O conteúdo G+C médio de toda a região seqüenciada foi de 54,3%. As seqüências foram altamente conservadas, apresentando 2% dos seus sítios variáveis. Não foi observada a presença de inserções e/ou deleções nucleotídicas (*indels*). As características do alinhamento assim como alguns parâmetros de diversidade genética estão descritos na tabela 11.

Foram observados 7 polimorfismos que permitiram discriminar entre *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, os quais estão presentes em 100% dos isolados de cada espécie (Tabela 12). Ocorreram 2 mutações não sinônimas que separam ambas as espécies. O interessante dessas mutações é que em *L. braziliensis* existem dois aminoácidos polares e neutros (Gly e Thr), enquanto que em *L. guyanensis* os aminoácidos nas respectivas posições são apolares (Ala e Ile).

Variação intra-específica foi observada em ambas as espécies, sendo superior em *L. braziliensis* baseado em uma série de parâmetros listados na tabela 11. Em *L. guyanensis* o número de diferenças de nucleotídeos ( $K_{xy}$ ) e o número médio de

Tabela 11 – Características do alinhamento e parâmetros de diversidade genética de todos os genes nas espécies em estudo.

Características avaliadas	Gene											
	AQP1			HSP70			MRPA			TR		
	LB e LG	LB	LG	LB e LG	LB	LG	LB e LG	LB	LG	LB e LG	LB	LG
Nº de sítios alinhados	899	899	899	1183	1183	1183	1789	1789	1789	1471	1471	1471
Nº de sítios conservados	880	890	896	1168	1174	1182	1750	1777	1785	1447	1465	1466
Nº de sítios polimórficos	19	9	3	15	9	1	39	12	4	24	6	5
Nº de <i>singletons</i>	2	1	1	9	8	1	7	4	3	6	1	5
Nº de sítios informativos a parcimônia	17	8	2	6	1	0	32	8	1	18	5	0
Conteúdo G+C (%)	54,3	54,2	54,4	66,1	66,3	66	61,2	61,4	61,1	59,7	59,7	59,7
Transições (s)	13	8	2	12	9	1	28	10	2	17	3	5
Transversões (v)	6	1	1	2	0	0	11	2	2	7	3	0
Taxa de s / v	2,17	8	2	6	-	-	2,54	5	1	2,43	1	-
Nº de mutações sinônimas	9	5	0	10	8	0	11	5	0	10	2	1
Nº de mutações não-sinônimas	9	4	3	5	1	1	8	5	1	14	4	4
Diversidade nucleotídica Pi ( $\pi$ )	0,00638	0,00248	0,00056	0,00268	0,00084	0	0,00807	0,0019	0,00018	0,00552	0,00127	0,00021
Diferença média de nucleotídeos par a par (K)	5,74	2,23	0,50476	3,16	1	0,067	14,4	3,4	0,31828	8,12	1,86	0,3
Nº de haplótipos (H)	-	6	5	-	7	2	-	10	5	-	5	5
Diversidade dos haplótipos (Hd)	-	0,769	0,392	-	0,647	0,067	-	0,887	0,245	-	0,576	0,231

LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*; *singletons*: mutação única no alinhamento.

Tabela 12 – Localização dos polimorfismos de base única identificadas pelo método de seqüenciamento de DNA nos genes em estudo, assim como as mutações na seqüência de aminoácidos traduzida, que permitem a discriminação das espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

Espécies	Loc. na seq. de nt do gene AQP1						Loc. na região 3' da seq. de nt após o gene AQP1						Loc. na seq. de aa traduzida de AQP1											
	446	516	666	755	768	783	3						149 252											
<i>L. braziliensis</i>	G	A	A	C	C	T	C						G T											
<i>L. guyanensis</i>	C	C	C	T	T	C	A						A I											
	Localização na seq. de nt do gene HSP70					Localização na seqüência de aa traduzida de HSP70																		
	1632	1666	1669	1711	1794	556 557 571																		
<i>L. braziliensis</i>	C	G	T	T	C	V S S																		
<i>L. guyanensis</i>	T	A	G	A	T	I A T																		
	Localização na seq. de nt do gene TR												Loc. na seq. de aa traduzida de TR											
	107	177	246	261	289	294	345	347	388	807	828	939	955	36 97 115 116 130 319										
<i>L. braziliensis</i>	T	G	A	C	G	A	C	G	A	T	G	A	G	V A D S K V										
<i>L. guyanensis</i>	C	T	G	A	A	G	G	A	C	C	A	G	A	A T E N Q I										
	Localização na seq. de nt do gene MRPA								Localização na região 3' da seq. de nt após o gene MRPA															
	3519	3531	3592	3811	3861	4161	4476	4575	15 42 94 111 162 211 228 248 276 347 356 359 382 403 443															
<i>L. braziliensis</i>	A	G	A	G	A	G	A	T	G G A G T C G G A G G A A C C															
<i>L. guyanensis</i>	C	A	G	A	G	T	G	C	A A G A G T A A T T A C G T G															
	Localização na seq. de aa traduzida de MRPA																							
	1198 1271																							
<i>L. braziliensis</i>	I E																							
<i>L. guyanensis</i>	V K																							

aa – aminoácidos; Loc. – localização; seq. – seqüência; nt – nucleotídeo.

substituições por sítio ( $D_{xy}$ ) entre os isolados de cura e falha terapêutica foram 0,48 e 0,00053 respectivamente. Em *L. braziliensis* esses mesmos parâmetros foram bem superiores (1,93 e 0,00215) em relação *L. guyanensis*. Quando se compara as mesmas medidas em *L. braziliensis* do Rio de Janeiro e da Bahia obtém-se os valores 2,64 e 0,00293. Em ambas as espécies os isolados clínicos oriundos de cura terapêutica obtiveram maior número de haplótipos (5 em LBCT e 4 em LBFT; 5 em LGCT e 3 em LGFT) e maiores valores de Pi (0,0029 em LBCT e 0,0012 em LBFT; 0,00068 em LGCT e 0,00042 em LGFT).

Não foram observados polimorfismos que delimitam os grupos relacionados à resposta terapêutica para ambas as espécies. Em *L. braziliensis* há uma mutação não sinônima compartilhada entre amostras de cura e falha terapêutica na posição 127 da seqüência de aminoácidos traduzida. Contudo a mudança de leucina para fenilalanina pode ser pouco significativa uma vez que ambos são aminoácidos apolares. Duas outras mutações nas posições 66 e 150 são compartilhadas entre algumas amostras de cura terapêutica, sendo apenas esta primeira entre aminoácidos de diferentes propriedades, alanina (apolar) para ácido aspártico (polar e negativo). Em *L. guyanensis* há duas mutações não sinônimas (Leu27Phe e Ser157Thr) compartilhadas entre amostras de falha e cura terapêutica, contudo a mudança ocorre entre aminoácidos do mesmo grupo.

O domínio MIP (*Major Intrinsic Protein*) está delimitado entre os aminoácidos 33 e 278 da seqüência da proteína AQP1 (285aa - aminoácidos) que corresponde às posições nucleotídicas de 99 a 834. Existem também 6 hélices transmembranas, compreendidas nas posições relativas ao gene em: (i) 117-183; (ii) 228-294; (iii) 357-423; (iv) 528-585; (v) 624-710; (vi) 768-834. Percorrendo a seqüência em janelas de 100pb a cada 25pb revelou valores de Pi de 0 a 0,0126 em *L. braziliensis*, sendo o maior valor no intervalo de 351-450pb, e de 0 a 0,0026 em *L. guyanensis*, sendo o maior valor no intervalo de 376-475pb (Figura 8a). Portanto, a região compreendendo o terceiro domínio transmembrana e o intervalo até o quarto domínio é a mais polimórfica. Levando em consideração a resposta terapêutica em *L. guyanensis* as mesmas regiões variáveis na seqüência se repetem, entretanto em diferentes níveis (Figura 8b). Já em isolados de cura terapêutica de *L. braziliensis* há uma região variável na posição de 300-500pb que não é encontrada em amostras de falha.



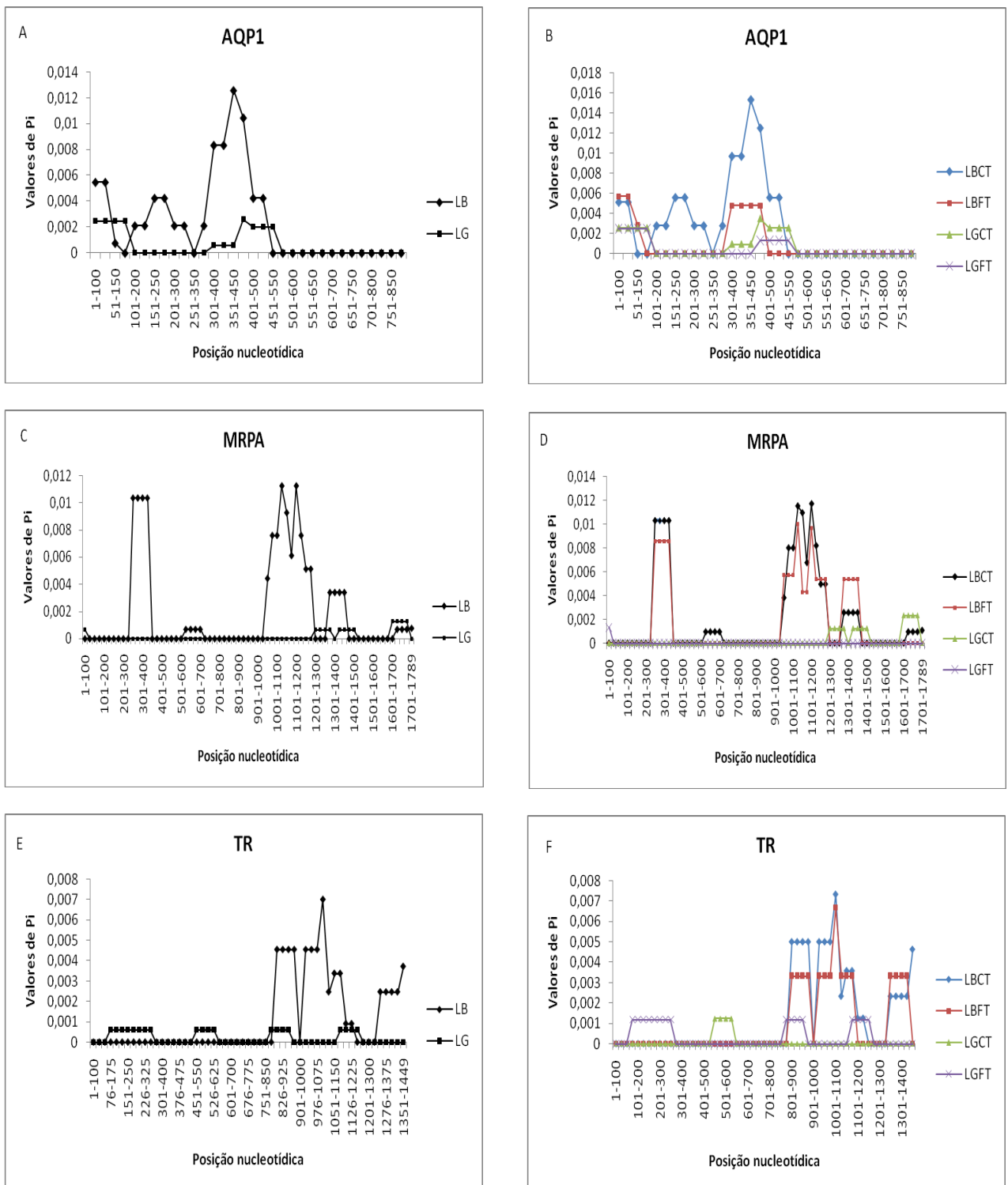


Figura 8 – Comparação da diversidade genética por sítio ( $\pi$ ) em diferentes posições dentro dos genes AQP1 (A e B) e TR (E e F), e na região seqüenciada referente a porção 3' codificante do gene MRPA (C e D), compreendida até a posição 1291, seguida de ~500pb de região não codificante. Os valores de Pi foram obtidos dentro de uma janela de comprimento de 100pb mudando de posição a cada 25pb, com o auxílio do programa DnaSP. LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*; CT: Cura terapêutica; FT: Falha terapêutica.

#### 4.1.1.2. Gene HSP70

Seqüências de ótima qualidade foram geradas, apresentando de 1181 a 1183pb e conteúdo G+C médio de 66,1%. Toda a região seqüenciada está compreendida na porção 3' do gene HSP70 completo. Determinou-se o seguinte número de seqüências consenso: 8 e 24 para os isolados de *L. braziliensis* obtido de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente; 14 e 16 para os isolados de *L. guyanensis* obtidos de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente. A maioria das amostras foi representada por apenas uma seqüência consenso, com algumas apresentando 2 (*L. braziliensis*: IOC/L 2538, 2869, 2871, 2891, 2892, 2893, 2867, 2876 e 2927; *L. guyanensis*: IOC/L 2336) e 3 em apenas duas *L. braziliensis* (IOC/L 2823 e 2889). As seqüências foram altamente conservadas, em *L. braziliensis* apenas 1% dos seus sítios foi variável, enquanto que em *L. guyanensis* ocorreu apenas um *singleton* (Tabela 11). No isolado IOC/L 2336 de *L. guyanensis* foi observado uma diminuição no número de motivos de (CG)<sub>5</sub> para (CG)<sub>4</sub>, numa região de microssatélite, em uma de suas seqüência consenso.

Cinco polimorfismos permitiram discriminar entre *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, observados em 100% dos isolados de cada espécie (Tabela 12). Essas diferenças levaram a 3 mutações não sinônimas que separam ambas as espécies, nas quais ocorreu apenas uma mudança de aminoácidos com diferentes propriedades, serina (polar neutra) em *L. braziliensis* para alanina (apolar) em *L. guyanensis* na posição 557 da seqüência de aminoácidos traduzida.

Foi observado que as seqüências de HSP70 em *L. guyanensis* estão bem conservadas, apenas o isolado IOC/L 2336 apresentou variação, portanto, não foi possível obter informação que separe os parasitos de acordo com a resposta terapêutica. Já em *L. braziliensis* uma pequena variação intra-específica foi observada, contudo apenas um sítio foi informativo a parcimônia. O número de diferenças de nucleotídeos ( $K_{xy}$ ) e o número médio de substituições por sítio ( $D_{xy}$ ) entre os isolados de cura e falha terapêutica foram 1,021 e 0,00086 respectivamente. Quando se compara as mesmas medidas em *L. braziliensis* do Rio de Janeiro e da Bahia obtém-se os valores 1,295 e 0,00109. O número de haplótipos (6 em LBCT e 3 em LBFT) assim como os valores de Pi (0,00086 em LBCT e 0,00057 em LBFT) foram superiores nos isolados clínicos oriundos de cura terapêutica.

Em *L. braziliensis* a única mutação que foi compartilhada entre diferentes isolados resultou numa mutação não sinônima de treonina (polar neutro) para alanina (apolar). Apesar de essa mudança ter sido encontrada em algumas seqüências de isolados clínicos de cura terapêutica (IOC/L 2823, 2871, 2889, 2891, 2892 e 2893), todos os de falha apresentam pelo menos uma seqüência consenso com o aminoácido alanina na posição 579 da proteína. Vale salientar, que todos os isolados de cura terapêutica que apresentaram alanina possuem mais de uma seqüência consenso, no qual a outra seqüência apresenta a treonina.

A seqüência da proteína apresenta apenas um domínio HSP70 entre as posições 6 e 615, no qual a maioria das mutações foram observadas. Apenas um *singleton* foi visualizado fora deste domínio, na posição 625. Os sítios variáveis se concentraram entre as posições de 300-400 e 500-600aa da proteína.

#### 4.1.1.3. Gene MRPA

Foram obtidas seqüências com comprimento total de 1789pb, referentes a 1291pb da região 3' do gene MRPA mais 498pb de região não codificante, e com conteúdo G+C médio de 61,2%. Determinou-se o seguinte número de seqüências consenso: 8 e 21 para os isolados de *L. braziliensis* obtidos de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente; 15 e 16 para os isolados de *L. guyanensis* obtidos de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente. No geral, em *L. braziliensis* geraram-se duas seqüências consenso (IOC/L 2823, 2842, 2846, 2869, 2878, 2891, 2918, 2934, 2463, 2876 e 2927), enquanto que em *L. guyanensis* a maioria das amostras foi representada por apenas uma seqüência consenso, havendo apenas dois isolados com duas (IOC/L 2335 e 2372). Como esperado, a região codificante seqüenciada, apesar de ser maior do que duas vezes a não codificante, apresentou-se mais conservada. Esta primeira região possui 19 sítios variáveis enquanto a segunda 20. Não foi observado a presença de *indels*.

A região seqüenciada referente ao gene MRPA e uma porção 3' não codificante apresentou o maior número de polimorfismos que diferenciam entre *L. braziliensis* e *L. guyanensis* nos genes em estudo (Tabela 12). Dentre as 2 mutações não sinônimas que separam ambas as espécies, apenas uma promoveu uma alteração na carga elétrica da proteína, de ácido glutâmico em *L. braziliensis* para lisina (básico) em *L. guyanensis*.

Em *L. guyanensis* 3 das 4 mutações observadas foram *singletons*, enquanto a última, uma transversão, foi compartilhada entre dois isolados de cura terapêutica (IOC/L 2391 e 2959). Variação intra-específica entre os isolados de cura e falha terapêutica foi observada em *L. braziliensis*, sendo o  $K_{xy}$  e o  $D_{xy}$  entre eles de 3,4 e 0,002, respectivamente. Quando se compara as mesmas medidas em isolados de diferentes origens geográficas (Rio de Janeiro e Bahia) em *L. braziliensis* ocorre uma queda nesses fatores (3,37 e 0,0019). Em ambas as espécies os isolados clínicos oriundos de cura terapêutica obtiveram maior número de haplótipos (10 em LBCT e 4 em LBFT; 4 em LGCT e 2 em LGFT) e maiores valores de  $P_i$  (0,00193 em LBCT e 0,00164 em LBFT; 0,00027 em LGCT e 0,00007 em LGFT).

Duas das três mutações não sinônimas (Asn1250Asp, Ser1481Asn e Ala1492Ser), observadas e compartilhadas entre as amostras de *L. braziliensis*, promoveram mudanças na propriedade da proteína: na posição 1250 da seqüência traduzida de uma asparagina (polar neutra) para ácido aspártico (polar e negativo) e na posição 1492 de alanina (apolar) para serina (polar neutro). Esta segunda mudança foi observada em apenas isolados de cura terapêutica (IOC/L 2842, 2846 e 2878), enquanto a primeira surgiu também na maior parte dos isolados de falha (IOC/L 2463, 2867, 2876 e 2927).

A proteína MRPA está dividida em 2 domínios transmembranas (TM) e 2 de ligação ao ATP. Na região seqüenciada está compreendido o segundo domínio TM parcial da posição 1 até 319, apresentando 2 das 6 hélices transmembranas, e o segundo domínio de ligação ao ATP completo da posição 619-1171. Percorrendo a seqüência em janelas de 100pb a cada 25pb a diversidade genética ( $\pi$ ) variou de 0 a 0,01123 em *L. braziliensis*, sendo o maior valor no intervalo de 1026-1125pb e de 1101-1200pb, enquanto que em *L. guyanensis* foi de 0 a 0,00125, sendo o maior valor no intervalo de 1601-1775pb (Figura 8c). Em *L. braziliensis*, duas regiões se destacaram por apresentar maior diversidade: o final do domínio transmembrana mais parte do espaço inter-domínios (251-425pb) e o fim do domínio de ligação ATP até o final do gene (950-1275pb). Considerando a resposta terapêutica em *L. braziliensis*, as mesmas regiões variáveis na seqüência se repetem tanto em isolados de cura como falha, obtendo valores superiores em regiões codificantes e inferiores em regiões não codificantes para os isolados de cura (Figura 8d). Já em *L. guyanensis* a maior diversidade encontrada foi na região não codificante e basicamente só foi observado variedade em isolados de cura terapêutica.

#### 4.1.1.4. Gene TR

Foram obtidas seqüências de 1471pb, compreendendo 22pb da região 5' não codificante e o restante estando dentro do gene TR, com conteúdo G+C médio de 59,7%. Determinou-se o seguinte número de seqüências consenso: 6 e 16 para os isolados de *L. braziliensis* obtidos de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente; 17 e 16 para os isolados de *L. guyanensis* obtidos de pacientes que apresentaram falha e cura terapêutica, respectivamente. A maioria das amostras foi representada por apenas uma seqüência consenso, com exceção dos isolados IOC/L 2878, 2918 e 2928 de *L. braziliensis* e os IOC/L 2414, 2334, 2362 e 2397 de *L. guyanensis*, que apresentaram 2 seqüências.

Mais de 50% dos polimorfismos encontrados, quando comparadas todas as amostras, contem informação para diferenciar entre as duas espécies estudadas (Tabela 12). Duas das seis mutações não sinônimas que delimitam essas espécies sofrem mudanças de polaridade (posição 97 da proteína: alanina em *L. braziliensis* e treonina em *L. guyanensis*) ou de carga elétrica (posição 130 da proteína: lisina em *L. braziliensis* e glutamina em *L. guyanensis*).

Em ambas as espécies em estudo foram observados poucas diferenças intra-específicas, 6 e 5 polimorfismos em *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, respectivamente (Tabela 11), não ocorrendo presença de *indels*. Devido a todos os polimorfismos encontrados em *L. guyanensis* serem *singletons* pouca informação pode ser obtida. Três das cinco mutações, observadas e compartilhadas entre isolados de *L. braziliensis*, resultaram em mudanças na seqüência de aminoácidos (Val299Ala, Arg446Lys e Lys480Asn). Apenas uma mutação promoveu uma diferença na carga elétrica, de positivo (lisina) para neutro (asparagina), presente em alguns isolados de cura terapêutica (IOC/L 2538, 2842, 2846 e 2878), na posição 480 da proteína.

Quando isolados de cura e falha terapêutica de *L. braziliensis* foram comparados, observou-se valores de  $K_{xy}$  e de  $D_{xy}$  de 1,7 e 0,00116, respectivamente, sendo o número de haplótipos (5 em LBCT e 2 em LBFT) e valores de  $P_i$  (0,00139 em LBCT e 0,00091 em LBFT) superiores nos de cura. Obteve-se um aumento dos valores de  $K_{xy}$  e de  $D_{xy}$  (1,86 e 0,00127, respectivamente) quando isolados de *L. braziliensis* de diferentes origens geográficas (Rio de Janeiro e Bahia) foram comparados.

A proteína TR está dividida em três domínios: oxidoredutor piridina nucleotídeo-dissulfídica com ligação a  $FAD^+$  (posição nucleotídica 18-589 no gene), interrompido pelo domínio oxidoredutor piridina nucleotídeo-dissulfídica com ligação a  $NAD^+$  (592-

880), e continuando na posição 883-1018, e por último o domínio de dimerização e oxidoreductor piridina nucleotídeo-dissulfídica (1086-1416). A diversidade genética ( $\pi$ ) ao longo da seqüência variou de 0 a 0,007 em *L. braziliensis*, sendo o maior valor no intervalo de 1001-1100pb, e de 0 a 0,0006 em *L. guyanensis* (Figura 8e). Ambos os resultados relatam valores muito baixos de diversidade, contudo pode-se observar uma tendência de maior variabilidade entre o final do domínio de ligação ao FAD<sup>+</sup> e início do de dimerização (posição 800-1100) em *L. braziliensis*. No caso do gene TR, as regiões que estão variando apresentam diferentes razões de diversidade relacionadas à resposta terapêutica em *L. braziliensis*, enquanto que na segunda espécie diferentes regiões estão variando de acordo com a resposta terapêutica (Figura 8f).

#### 4.1.2. Evidência de recombinação e pressão seletiva

Utilizando os algoritmos dos programas SplitsTree4 e RDP2 não foram observados eventos de recombinação nas quatro regiões em estudo. Contudo, utilizando o método de Hudson & Kaplan (1985) através do programa DnaSP observou-se eventos de recombinação para *L. braziliensis* entre as posições 33 e 379 do gene AQP1, 4442 e 4599 do gene MRPA, 1011 e 1095 do gene TR; e para *L. guyanensis* entre as posições 79 e 469 do gene AQP1.

Quando se avaliou se os genes AQP1 e MRPA estavam sob efeito de alguma pressão seletiva, nenhum dos valores de D de Tajima ou D e F de Fu e Li dispersaram significativamente de 0 ( $P > 0,1$ ), implicando que ambos os genes estão de acordo com a teoria da evolução neutra. Nos testes de Fu e Li, foram observados valores negativos distantes significativamente de 0 nas seqüências do gene HSP70 de isolados de *L. braziliensis* (Tabela 13), mais especificamente também nos isolados de *L. braziliensis* de cura terapêutica, indicando que poderia estar ocorrendo uma seleção negativa ou purificadora. O teste D de Tajima e a observação da diferença dN-dS não reproduziram os mesmos resultados. Já para o gene TR, observou-se valores negativos significativos para *L. guyanensis*, contando todos os isolados ou apenas os de falha terapêutica, em quase todos os testes realizados, com exceção para a diferença dN-dS.

Tabela 13 – Valores dos testes de evolução neutra nos genes e grupos de interesse.

Gene / Grupo	dN-dS	Tajima D	Fu e Li D*	Fu e Li F*	Fu e Li D	Fu e Li F
<b>AQP1</b>						
LB	-0,00508	-0,17406	0,81213	0,60271	0,84157	0,62569
LG	0,00078	-0,67694	-0,31902	-0,49193	-0,35606	-0,52704
LBCT	-0,00655	0,4771	1,34523	1,27103	1,44255	1,38036
LBFT	-0,00022	-0,65405	-0,519	-0,59207	0,23258	0,04521
LGCT	0,00094	-0,7067	-0,14199	-0,34256	-0,20017	-0,39883
LGFT	0,00059	-1,00161	-0,47619	-0,69721	0,90247	0,4854
<b>HSP70</b>						
LB	0,00083	-1,69521	-3,37071*	-3,33911*	-3,72016*	-3,66236*
LG	0,00007	-1,147	-1,68214	-1,76554	-1,72095	-1,81063
LBCT	0,00114	-1,68905	-2,84233*	-2,91008*	-3,20981*	-3,27067*
LBFT	-0,0004	-0,44794	-0,14931	-0,23785	-0,312	-0,39867
LGCT	0,00014	-1,16221	-1,45287	-1,5682	-1,52257	-1,65732
LGFT	0	-	-	-	-	-
<b>MRPA</b>						
LB	-0,00357	0,36407	-0,38764	-0,18199	-0,48964	-0,25416
LG	0,00007	-1,73616	-2,0028	-2,23487	-2,13759	-2,37335
LBCT	-0,00364	0,11924	-0,20778	-0,13042	-0,31979	-0,21992
LBFT	-0,00318	1,23789	1,40857	1,5107	1,50324	1,71362
LGCT	0	-1,34917	-1,12152	-1,35098	-1,27285	-1,51755
LGFT	0,00014	-1,15945	-1,42646	-1,54266	-1,50052	-1,63852
<b>TR</b>						
LB	-0,001	0,40583	0,52088	0,56493	0,50884	0,5675
LG	0,00004	-2,00833*	-3,33112*	-3,41858*	-3,55474*	-3,63952*
LBCT	-0,00095	0,45774	0,61234	0,65444	0,50884	0,5675
LBFT	-0,00135	-1,29503	-1,32453	-1,39621	0,62757	0,25787
LGCT	0,00011	-1,16221	-1,45287	-1,5682	-1,52257	-1,65732
LGFT	-0,00003	-1,84308*	-2,46944*	-2,63848*	-2,76014*	-2,95753*

LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*; CT: Cura terapêutica; FT: Falha terapêutica. Valores D\* e F\* de Fu e Li correspondem aos testes realizados sem grupo externo.

\* Valores significativos ( $P < 0,05$ )

Restante apresenta valores não significativos ( $P > 0,1$ )

#### 4.1.3. Modelo de regressão logística múltiplo e análise de agrupamentos

Um modelo de regressão logística múltiplo foi aplicado com o objetivo de se estudar a associação dos polimorfismos encontrados nas seqüências de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* em estudo com a resposta terapêutica dos pacientes infectados. Apenas o gene HSP70 em *L. braziliensis* apresentou resultados estatísticos significativos. Quando há uma guanina ao invés de uma adenina na posição 1735 deste gene, há uma chance 7,3 vezes maior de um determinado isolado estar associado à falha terapêutica ( $P < 0,05$ ).

O melhor algoritmo de agrupamento para todos os genes quando analisados ambas as espécies em conjunto foi o *single linkage*, com valores do coeficiente de correlação cofenético acima de 0,98. Os quatro genes em estudo separaram as duas espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* em todos os dendrogramas gerados (dados não mostrados). Os dendrogramas gerados para as amostras de *L. braziliensis* encontram-se nas figuras 9 e 10, e os gerados para as de *L. guyanensis* em 11 e 12. Contrariando o método de ligação escolhido para a maioria das amostras, para o gene MRPA foi escolhido o *complete linkage* em *L. braziliensis* e o de *ward* em *L. guyanensis*. Este primeiro método utiliza a maior distância entre quaisquer dois objetos enquanto o segundo utiliza uma análise de variância para determinar a ligação entre os agrupamentos.

Não foi observado nenhum dendrograma no qual os grupos estivessem separados de acordo com a resposta terapêutica ou origem geográfica. As análises de *L. braziliensis* forneceram um maior número de agrupamentos em relação a *L. guyanensis* e, portanto uma maior resolução. Nesta primeira espécie o gene MRPA forneceu o maior número de grupos (8), seguido de HSP70 (7), AQP1 (6) e TR (4). No geral, os grupos formados com um pequeno número de amostras não se repetiram dentre os genes, com exceção para o grupo IOC/L 2538, 2842 e 2878 que se repete para os genes MRPA, AQP1 e TR. Duas amostras de falha terapêutica, IOC/L 2928 em AQP1 e 2876 em HSP70, formaram grupos isolados.



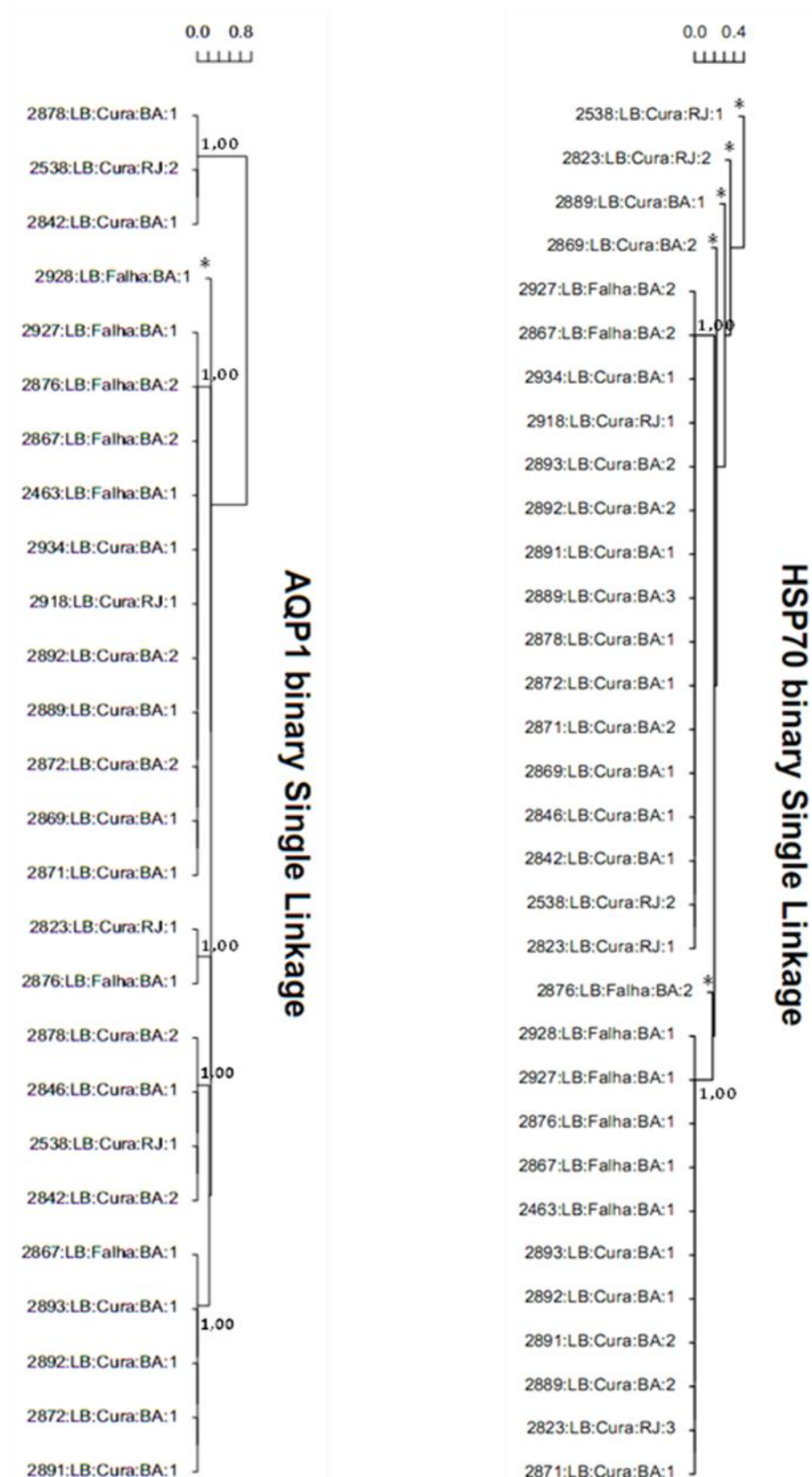


Figura 9 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes AQP1 (6 grupos) e HSP70 (7 grupos) em *L. braziliensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em AQP1 foi de 0,97 e em HSP70 de 0,96. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos.

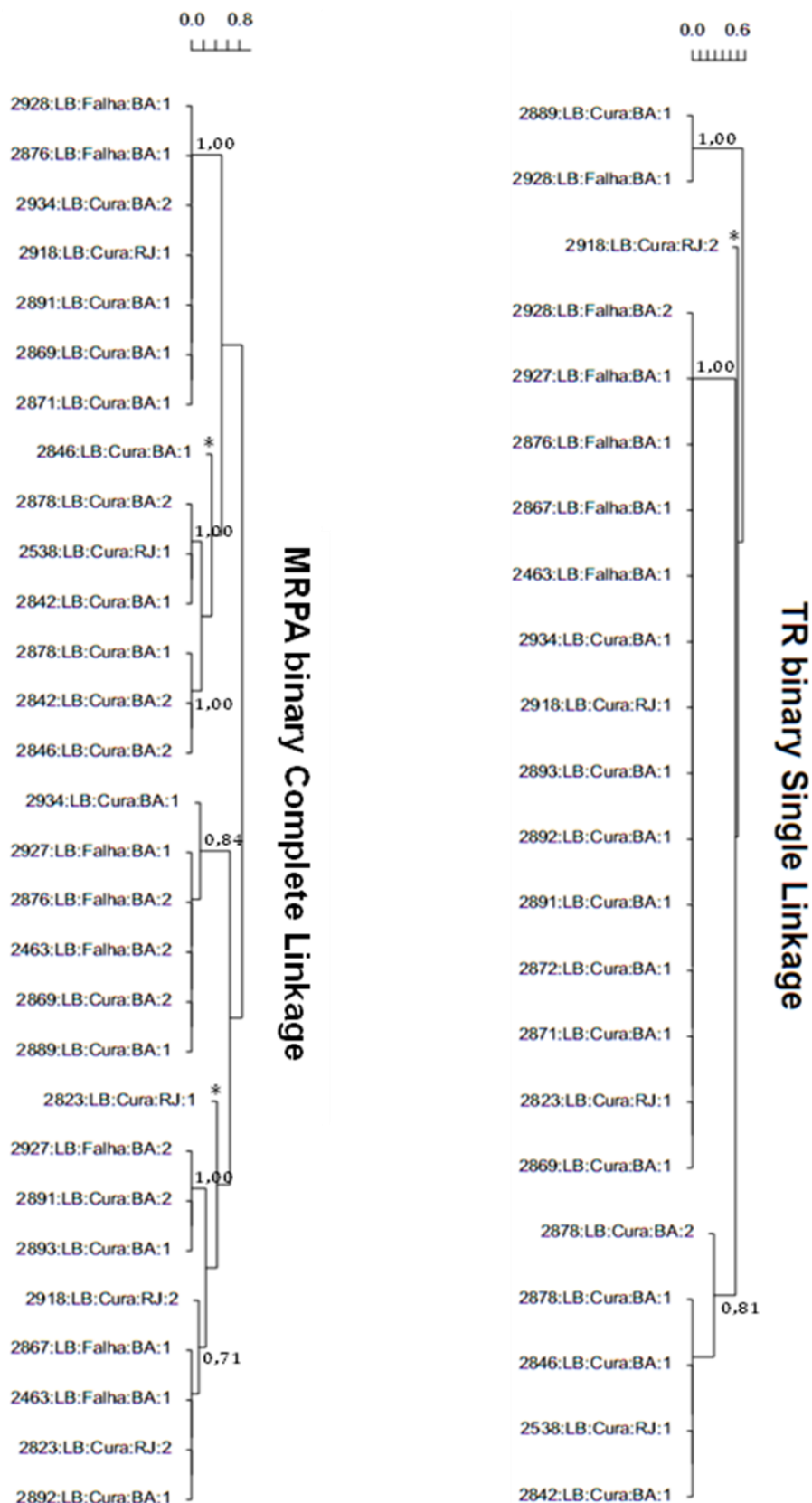


Figura 10 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes MRP (8 grupos) e TR (4 grupos) em *L. braziliensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em MRP foi de 0,87 e em TR de 0,98. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos.

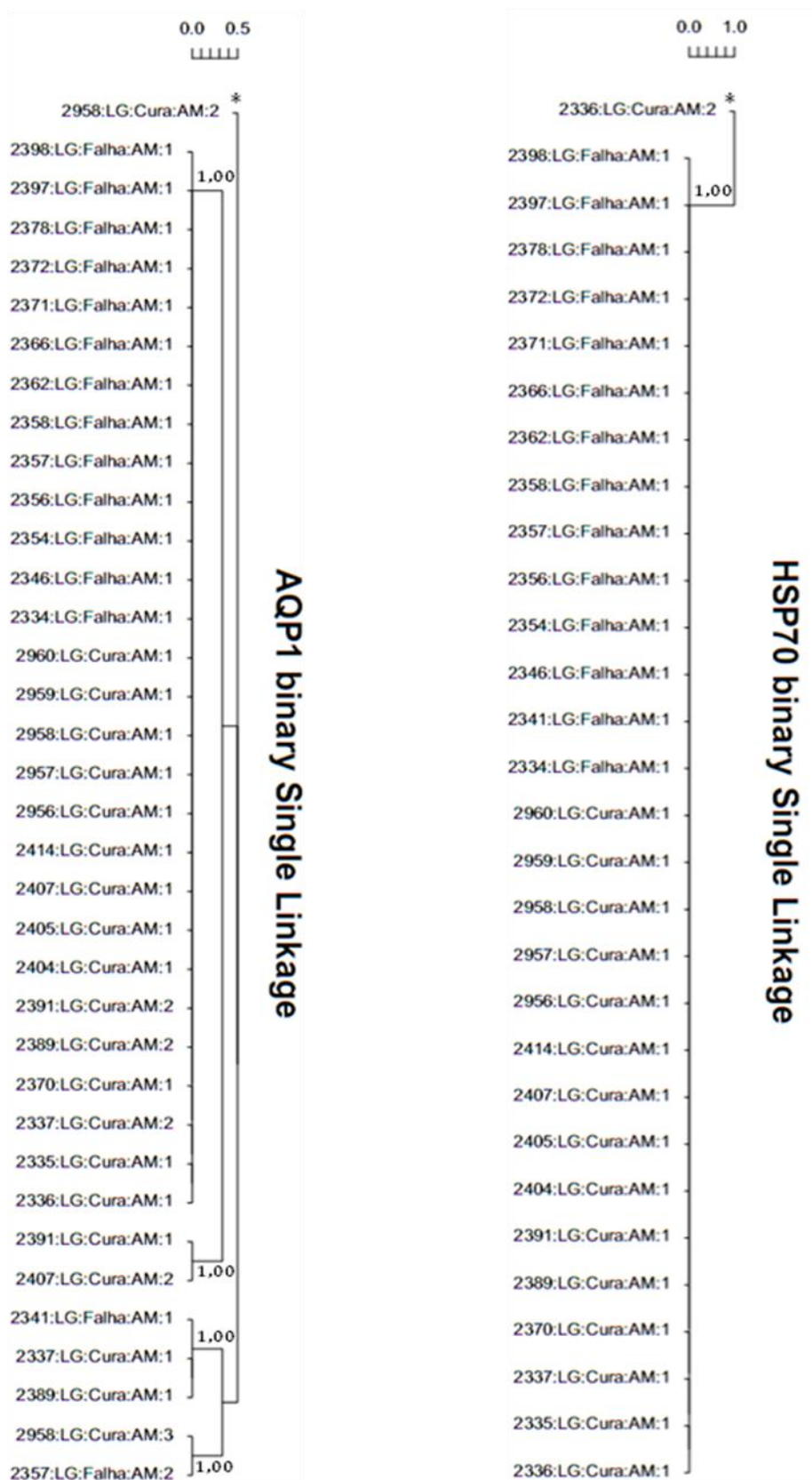


Figura 11 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes AQP1 (5 grupos) e HSP70 (2 grupos) em *L. guyanensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em AQP1 foi de 0,97 e em HSP70 de 1. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos.

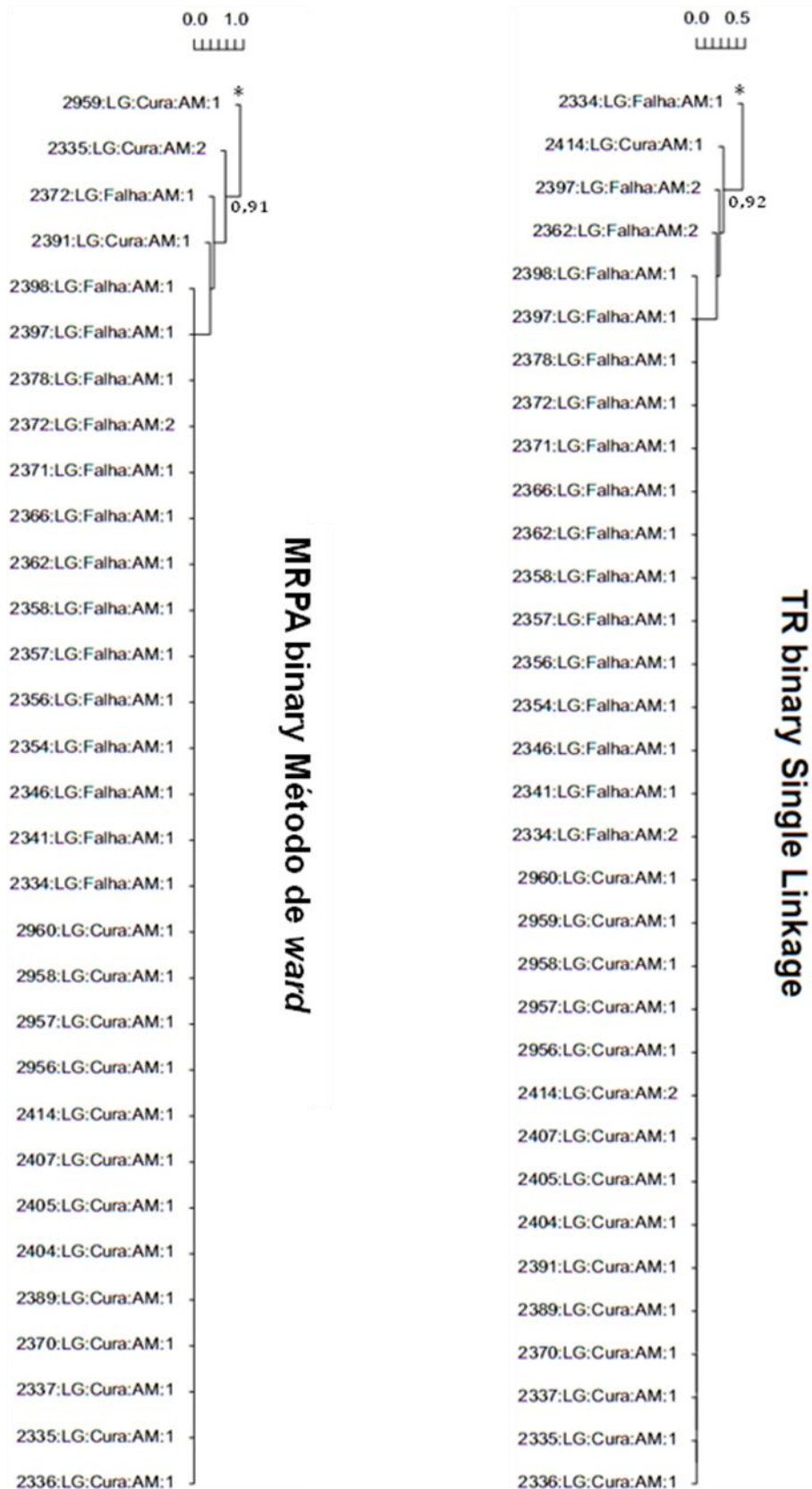


Figura 12 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico para os genes MRPB (2 grupos) e TR (2 grupos) em *L. guyanensis*. O coeficiente de correlação cofenético para o melhor método de ligação e distância em MRPB foi de 0,99 e em TR de 0,99. Acima ou abaixo da base de cada grupo determinado está descrito o seu valor médio de *silhouette*. Em alguns grupos há um \*, uma vez que não é possível obter um valor de média de *silhouette* com apenas um representante. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do gene) representando a distância binária entre os diferentes grupos.

Em *L. guyanensis* o gene AQP1 obteve o maior número de grupos (5), seguido pelos outros que obtiveram 2 cada um. A pouca variabilidade encontrada nas seqüências dessa espécie reproduz na formação de um grande grupo no qual estão a maioria das amostras.

#### 4.2. Análise do perfil de expressão gênica

As reações de PCR em tempo real apresentaram ótima reprodutibilidade para cada amostra, como pode ser visualizado na qualidade das triplicatas na construção da curva de acúmulo de fluorescência utilizando o modelo sigmóide (Figura 13). Não foi observado a presença de dímeros de oligonucleotídeos na reação ou qualquer outro contaminante. No geral, a utilização de 5 parâmetros, o qual considera um fator de assimetria com grande impacto na curvatura do modelo sigmóide, foi predominante de acordo com método de escolha de AIC. Os valores de Cq foram inferiores em *L. guyanensis* em relação a *L. braziliensis* e, portanto a eficiência das reações para esta primeira espécie foi superior (Figura 14), uma vez que os valores são inversamente proporcionais.

Quando considerado todas as amostras de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* os genes com expressão mais estável foram o GS e o TDR1 e os mais variáveis o  $\gamma$ -GCS e o MRPA (Tabela 14). Para determinar quantos genes devem ser utilizados como normalizadores é necessário analisar a variação dos fatores de normalização a cada adição de um gene controle (Figura 15). A adição do terceiro gene com expressão mais estável (AQP1) ao par GS e TDR1 diminui a variação de aproximadamente 0,8 para 0,64. Apesar disso, optou-se em não utilizar o gene AQP1 como normalizador, uma vez que os seus níveis de expressão são pouco estáveis em *L. braziliensis* e poderia então comprometer a análise. Portanto, apenas a média geométrica dos valores brutos de expressão dos genes GS e TDR1 foram utilizados para o cálculo dos fatores de normalização, e os genes AQP1,  $\gamma$ -GCS, TR e MRPA foram considerados genes alvo.

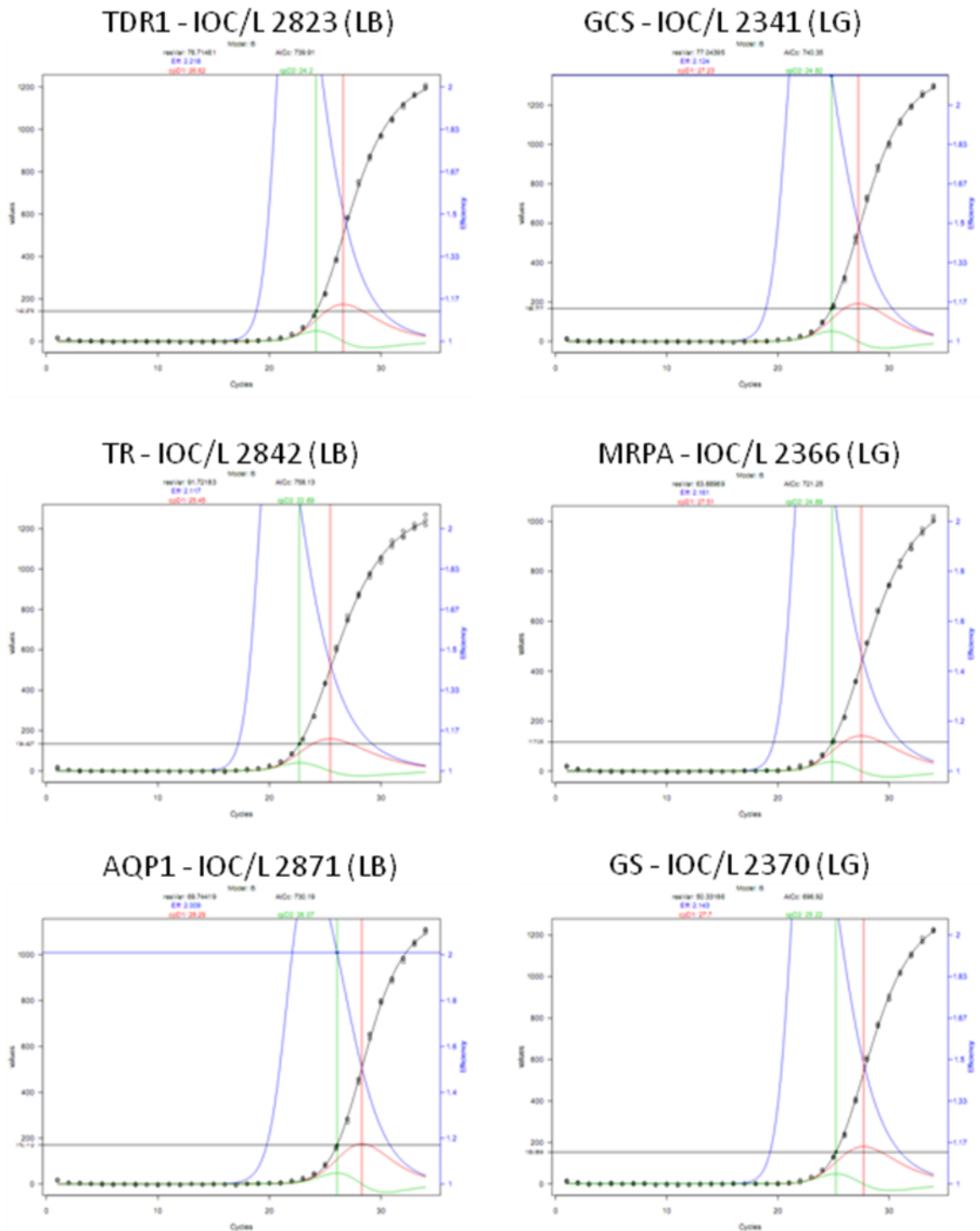


Figura 13 – Exemplo de curvas de amplificação (em preto) aplicando-se o modelo sigmóide de 5 parâmetros nos 6 genes em estudo, as triplicatas da reação estão representadas através de círculos. Em cada gráfico, no eixo y à esquerda há os valores brutos de fluorescência, enquanto à direita há os valores de eficiência, já no eixo x correspondem aos ciclos de amplificação. Estão demonstrados as curvas de eficiência (azul), a primeira (vermelho) e segunda (verde) função derivada da curva de acúmulo de fluorescência. LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*.

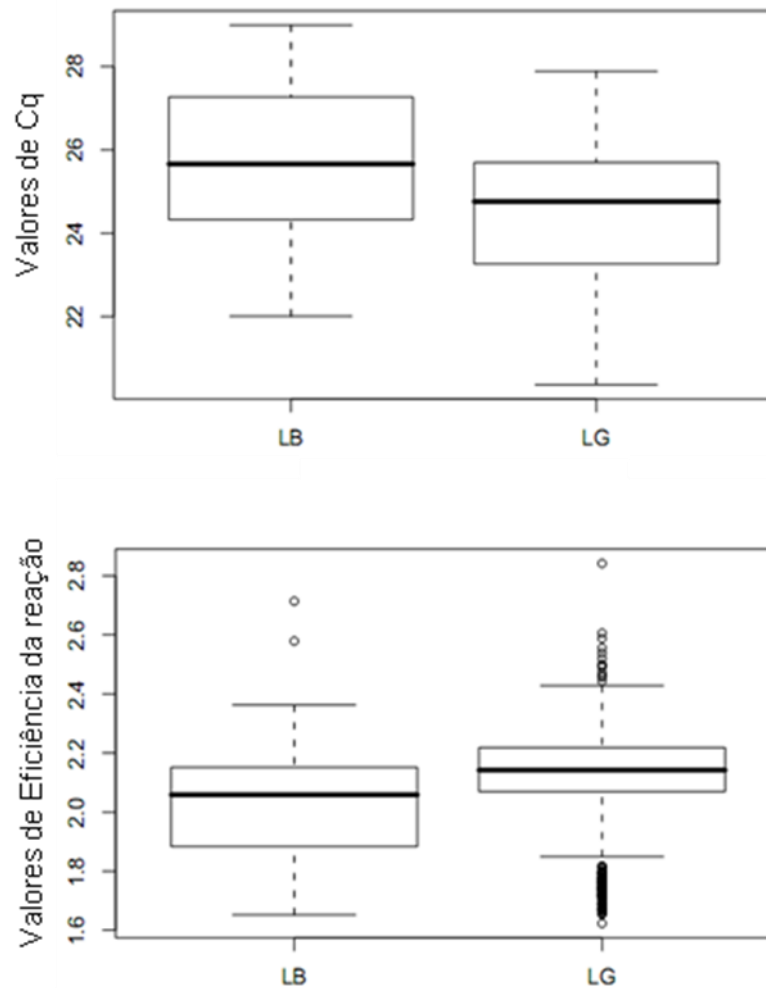


Figura 14 – Gráficos em *box-plot* da comparação dos valores de ciclo de quantificação (Cq) e de eficiência da reação em *L. braziliensis* (LB) e *L. guyanensis* (LG). A linha horizontal em negrito para cada espécie corresponde à mediana, a linha superior e inferior do quadrante corresponde a 50% dos valores daquele limite, enquanto a linha horizontal restante a 95%.

Tabela 14 – Ordem dos níveis de expressão gênica mais estáveis em cada grupo descrito abaixo.

Ordem dos genes com expressão mais estável	Grupo em estudo								
	LBFT Fase1	LBFT Fase2	LBCT Fase1	LBCT Fase2	LGFT Fase1	LGFT Fase2	LGCT Fase1	LGCT Fase2	Todos
1	TDR1	MRPA	GS	GS	TDR1	GS	MRPA	GS	GS
2	TR	TR	TDR1	TDR1	TR	TR	TR	TDR1	TDR1
3	MRPA	TDR1	GCS	AQP1	GS	TDR1	AQP1	AQP1	AQP1
4	GCS	GCS	AQP1	TR	MRPA	AQP1	GS	GCS	TR
5	GS	GS	MRPA	GCS	AQP1	MRPA	GCS	MRPA	MRPA
6	AQP1	AQP1	TR	MRPA	GCS	GCS	TDR1	TR	GCS

LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*, CT: Cura terapêutica; FT: Falha terapêutica; Fase 1: fase logarítmica tardia da curva de crescimento de promastigotas; Fase 2: fase estacionária da curva de crescimento de promastigotas.



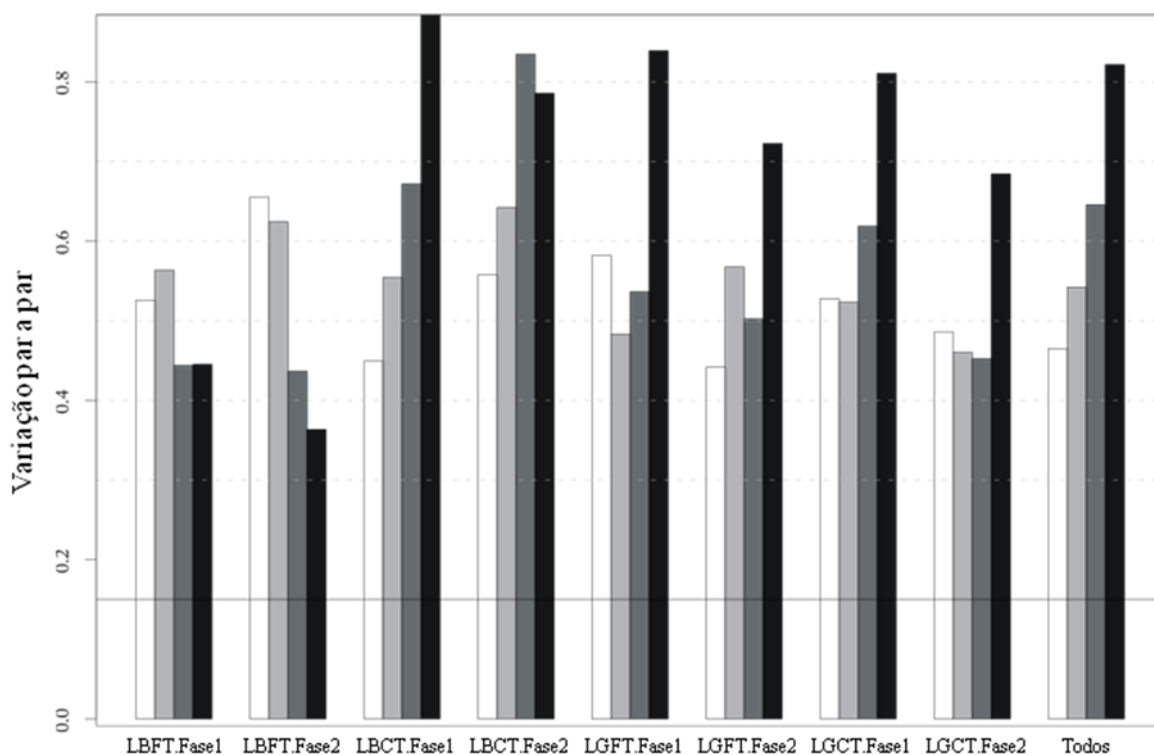


Figura 15 – Gráfico representando a determinação do número ótimo de genes controles para a normalização dos níveis de expressão gênica. Análise da variação par a par ( $V_{n/n+1}$ ) entre os fatores de normalização (NF) a cada adição de um gene controle: ■ variação entre o NF dos dois genes com expressão mais estável e o restante; ■ variação entre o NF dos três genes com expressão mais estável e o restante; ■ variação entre o NF dos quatro genes com expressão mais estável e o restante; □ variação entre o NF dos cinco genes com expressão mais estável e o restante. LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*, CT: Cura terapêutica; FT: Falha terapêutica; Fase 1: fase logarítmica tardia da curva de crescimento de promastigotas; Fase 2: fase estacionária da curva de crescimento de promastigotas; Todos: todas as amostras. O detalhamento dos grupos e a ordem dos genes com expressão mais estável encontram-se na tabela 14 (página 95).

As diferenças dos níveis de expressão normalizados entre as duas fases da curva de crescimento dos promatigotas em estudo não foram informativas, portanto apenas consideraram-se os fatores em relação à espécie e terapia e suas respectivas interações para o restante das análises. O gráfico representando todos os fatores e interações abordadas está descrito na figura suplementar 1. Foi observado que os níveis de expressão dos genes MRPA e  $\gamma$ -GCS permitem discriminar entre as duas espécies em estudo, uma vez que se encontram superexpressos nas amostras de *L. guyanensis* em relação às de *L. braziliensis* (Figuras 16). Quando considerado as interações de primeira ordem entre organismo e resposta terapêutica, pode-se observar uma superexpressão significativa em isolados de falha terapêutica de *L. guyanensis* para o gene  $\gamma$ -GCS (Figura 17). Nesta mesma espécie, em AQP1 foi encontrado um valor próximo do nível de significância ( $P = 0,057$ ) que expressa uma tendência que ele esteja sendo mais expresso em isolados de falha terapêutica.

Para a análise de agrupamentos, utilizando todos os dados de expressão normalizados em função logarítmica de base 2, foi escolhido como melhor distância a Manhattan e melhor algoritmo de ligação o *single linkage* (coeficiente de correlação cofenético de 0,78). As distâncias entre as amostras e grupos não foram suficientes para determinar agrupamentos concisos, portanto só foi possível observar um grande grupo compreendendo todas as amostras com a exceção de uma de *L. braziliensis* IOC/L 2889 da fase estacionária que ficou a parte (Figura 18). Todas as análises de agrupamento também foram realizadas em dados apenas de *L. braziliensis* ou *L. guyanensis*, contudo não foi observada nenhuma melhora na resolução dos grupos. O mesmo é observado realizando uma análise de escalonamento multidimensional através das distâncias par a par entre os dados em estudo, no qual a maioria das amostras está aglomerada uma por cima das outras (Figura 19). Uma análise de agrupamento por gene para cada amostra revela que não há relação aparente nos níveis de expressão entre os genes alvo (Figura 20).

Portanto, este tipo de análise não permitiu distinguir dentre os fatores em estudo (espécie, resposta terapêutica ou fase da curva de crescimento), contudo sugere que os genes alvo estão sendo expressos de forma independente.

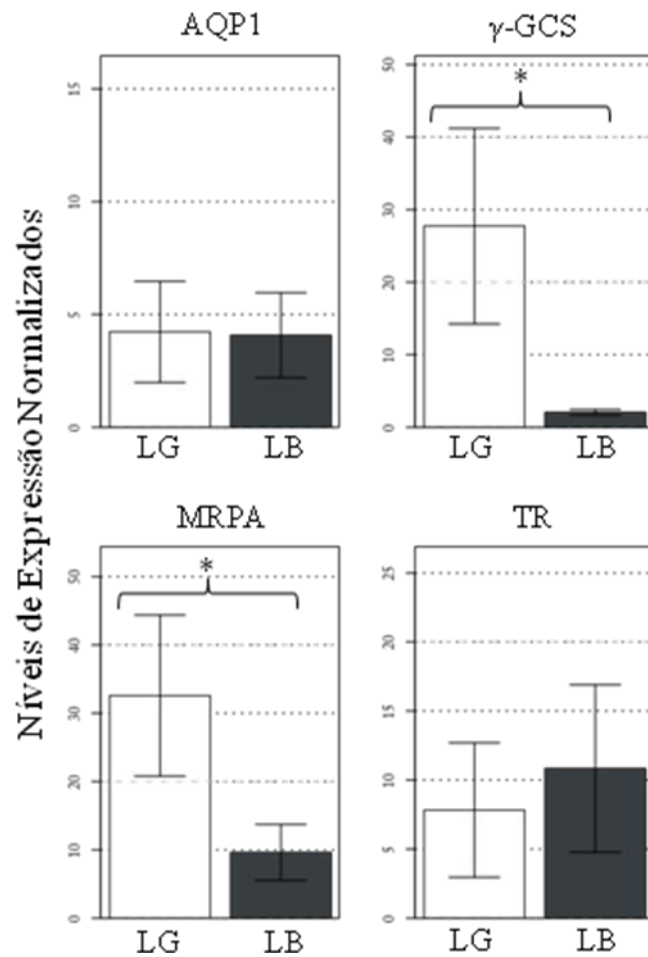


Figura 16 – Média dos níveis de expressão normalizados em promastigotas de *L. guyanensis* (LG) e *L. braziliensis* (LB) nos quatro genes alvo AQP1,  $\gamma$ -GCS, MRPA e TR. As barras correspondem ao erro padrão. \* Grupos significativamente diferentes entre si dentro de cada gene ( $P < 0,05$ ). Foram utilizados diferentes escalas para cada gene.

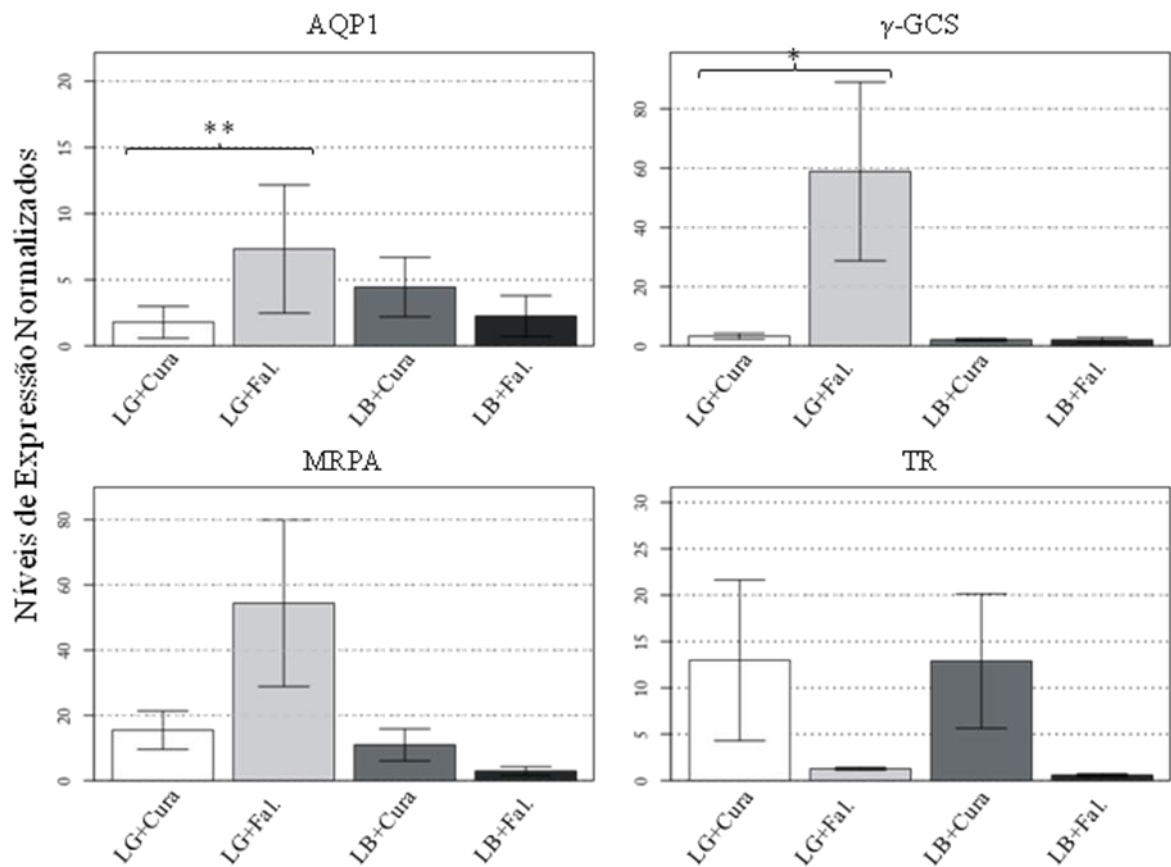


Figura 17 – Média dos níveis de expressão normalizados relacionado a interação de primeira ordem entre espécie (LB: *L. braziliensis*; LG: *L. guyanensis*) e resposta terapêutica (Cura e Fal. [Falha]) em promastigotas dos parasitos em estudo nos quatro genes alvo AQP1,  $\gamma$ -GCS, MRPA e TR. As barras correspondem ao erro padrão. \* Grupos significativamente diferentes entre si ( $P < 0,05$ ). \*\* Grupos significativamente diferentes entre si ( $P = 0,057$ ). Foram utilizados diferentes escalas para cada gene.

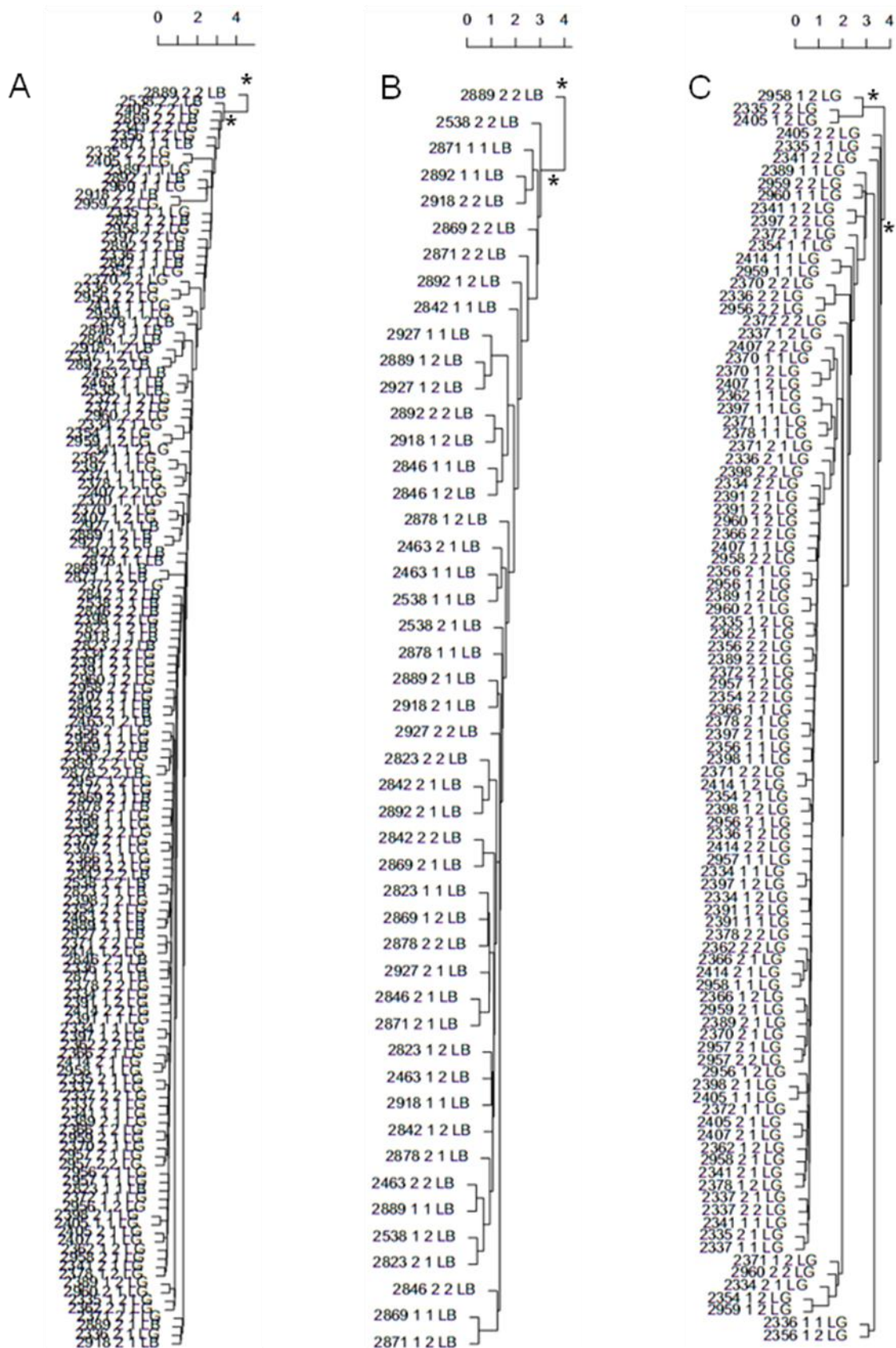


Figura 18 – Dendrogramas gerados pela análise de agrupamento hierárquico utilizando a distância de Manhattan e o método de ligação *single linkage* do conjunto de dados de expressão normalizados completo (A), apenas com amostras de *L. braziliensis* (B) e apenas com amostras de *L. guyanensis* (C). Abaixo ou acima da base de cada grupo determinado há um \*. Acima de cada dendrograma há uma escala (diferente dependendo do grupo amostral) representando a distância de Manhattan entre os diferentes grupos.

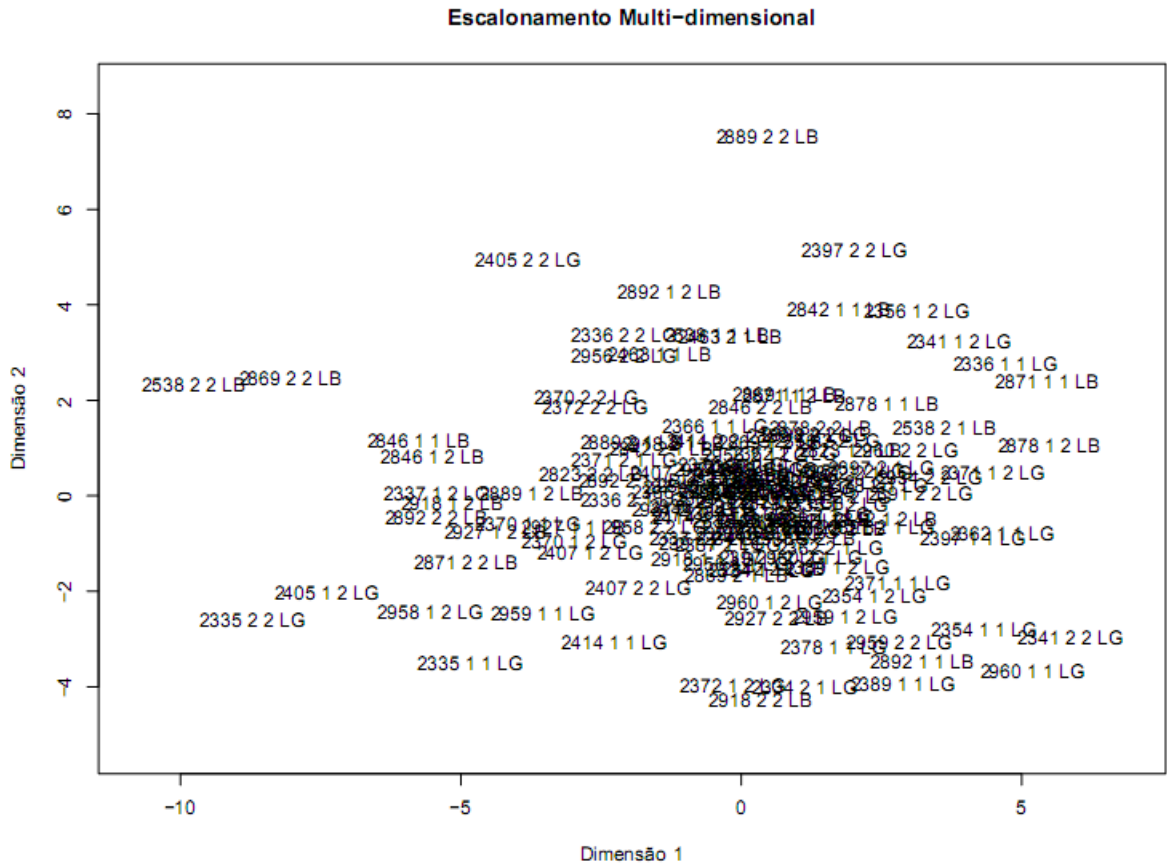


Figura 19 – Gráfico obtido pelo escalonamento multidimensional (Mapeamento de Sammon) para todos os dados de expressão normalizados. As dimensões 1 e 2 correspondem às coordenadas que melhor preservam pequenas distâncias entre pares de expressão amostral (distância de Manhattan ou *city-block*).

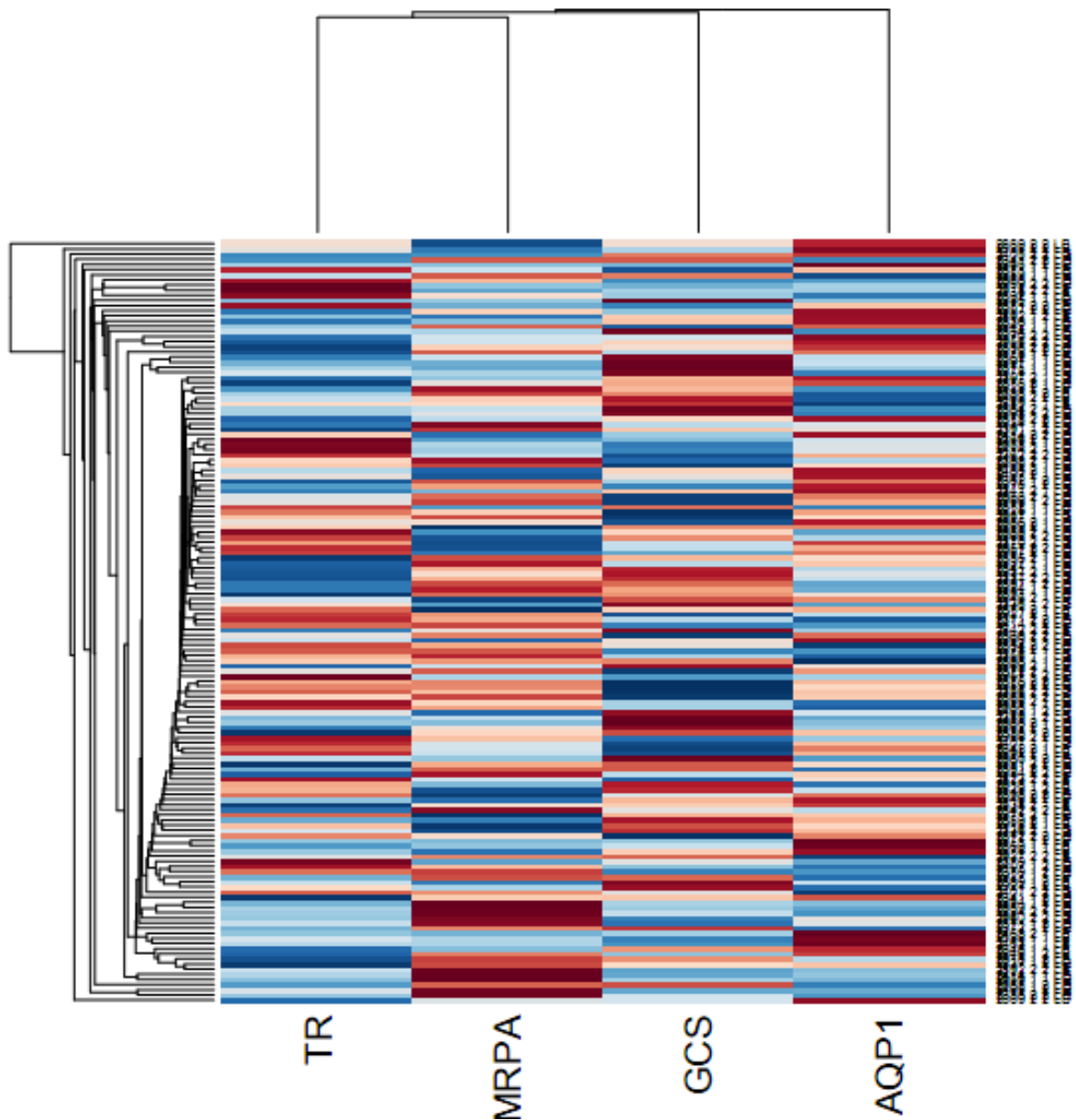


Figura 20 – Agrupamentos em formato *heatmap* utilizando a distância de Manhattan e o método de ligação *single linkage* do conjunto de dados de expressão normalizados demonstrando o perfil de expressão amostral em cada gene alvo. Cada linha corresponde ao perfil de expressão amostral e cada coluna ao perfil de expressão do determinado gene. Quanto mais vermelho escuro maior será o valor de expressão amostral no determinado gene e quanto mais azul escuro menor.

## 5. DISCUSSÃO

A *Leishmania* é um protozoário patogênico responsável por um diverso espectro de doenças no homem. A ausência de vacinas como método de prevenção para a leishmaniose torna a quimioterapia a principal estratégia no controle da doença, sendo os derivados do antimônio pentavalente utilizados como a primeira linha de drogas há mais de 60 anos. Parasitos que não respondem ao antimônio representam um sério problema de saúde pública. A resistência a drogas já alcançou proporções epidêmicas na Índia (Sundar, 2001; Sundar & Murray, 2005) e agora está emergindo no Irã (Hadighi *et al.*, 2006). De acordo com estudos *in vitro* e alguns mais recentes em isolados clínicos revelam que o fenótipo de resistência tem origem multifatorial (Gourbal *et al.* 2004; Singh, 2006). Até o presente momento, o método confiável para o monitoramento de isolados resistentes baseia-se em testes *in vitro* de infecção de amastigotas em macrófagos, os quais são tecnicamente laboriosos (Carter *et al.*, 2001; Lira *et al.*, 1999). Portanto, há uma necessidade urgente do desenvolvimento de métodos para monitorar a resposta à droga e a emergência de resistência na leishmaniose.

No Brasil, a leishmaniose cutânea constitui um importante problema de saúde pública, com cerca de 28.000 novos casos reportados anualmente pelo Ministério da Saúde (2007). Sete espécies de *Leishmania* causam a LC neste país, no qual a *L. braziliensis* e a *L. guyanensis* aparentam ser as mais prevalentes (Grimaldi *et al.*, 1989; Lainson & Shaw, 1987; Shaw, 1994). A leishmaniose causada por essas duas espécies abrange diferenças no número, tamanho e localização das lesões cutâneas, assim como no envolvimento linfático (Romero *et al.*, 2001b). Além disso, já foi demonstrada uma baixa taxa de cura terapêutica em pacientes infectados com parasitos de *L. braziliensis* na Bahia (50,8%) e com *L. guyanensis* no Amazonas (26,3%) (Romero *et al.*, 2001a).

Atualmente, técnicas de genotipagem e de análise de perfis de expressão gênica vêm sendo utilizadas para esclarecer os diferentes fenótipos observados em protozoários patogênicos (Neafsey *et al.*, 2008; Rochette *et al.*, 2008). No presente estudo, técnicas de seqüenciamento de DNA e PCR em tempo real quantitativo foram utilizadas para melhor elucidar a diversidade genética encontrada em *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no Brasil e sua associação com a resposta terapêutica.



Neste estudo foram obtidas seqüências de alta qualidade de quatro regiões alvo do genoma de *Leishmania*, escolhidas por estarem relacionadas à resistência a drogas. As seqüências consenso dos clones geradas compreenderam de 1 a 2 para os genes TR e MRPA e de 1 a 3 para AQP1 e HSP70 por amostra. Para explicar a existência de mais de uma seqüência por gene para cada amostra, algumas hipóteses foram formuladas: (i) o gene em estudo seria multicópia; (ii) estaria ocorrendo heterozigose, contudo isto não explica mais de 2 seqüências; (iii) poderia existir mais de uma população na cultura que estaria sendo expressa nas diferentes seqüências dos clones, uma vez que os isolados em estudo não foram clonados, e (iv) o polimorfismo encontrado é devido a erro na amplificação da Taq polimerase utilizada. O máximo foi realizado para refutar esta última hipótese, uma vez que se usou uma enzima de alta fidelidade e foi analisado apenas o consenso das seqüências dos clones geradas. Apesar da hipótese de reprodução clonal em *Leishmania* ser a mais aceita (Tibayrenc *et al.*, 1990), há casos excepcionais em que trocas genéticas podem ocorrer por hibridização entre diferentes espécies (Tibayrenc, 1996), além de já ter sido observado a existência de uma estrutura policlonal em isolados resistentes ao antimônio em *L. donovani* (Laurent *et al.*, 2007). Portanto, a terceira hipótese é válida para as quatro regiões em estudo.

Acredita-se que o gene TR seja cópia única no genoma de *Leishmania* (Taylor *et al.*, 1994), portanto a presença de 2 consensos poderia ser explicada pelo evento de heterozigose. O mesmo serve para o gene MRPA, contudo este gene já foi também encontrado em regiões extracromossomais circulares como no locus H (Anacleto *et al.*, 2003; Beverley, 1991; Haimeur *et al.*, 2000), portanto podendo ter mais de uma cópia por parasito. Para o gene AQP1, já foi observado em *L. major*, *L. infantum* e *L. tarentolae* que ele seria cópia única (Marquis *et al.*, 2005), enquanto que em *L. donovani* seria multicópia (Maharjan *et al.*, 2008). No gene HSP70 também foi observado um diverso número de cópias dependendo da espécie de *Leishmania* (Folgueira *et al.*, 2007; Zurita *et al.*, 2003). Então as três primeiras hipóteses são válidas para os genes MRPA, AQP1 e HSP70.

Baseado no seqüenciamento de 3 genomas de *Leishmania* observou-se um conteúdo G+C de 57 a 60%. Considerando apenas as regiões codificantes foram observados valores acima de 60% (Peacock *et al.*, 2007). A respeito dos genes em estudo o que mais se distanciou deste padrão foi o AQP1 que apresentou conteúdo G+C médio de 54,3%.

Analisando as seqüências geradas de ambas as espécies, os valores de diversidade genética em ordem crescente foram referentes ao gene HSP70, TR, AQP1 e MRPA. O mesmo não se repete quando cada espécie é analisada individualmente, no qual o gene AQP1 é o mais variável tanto em *L. braziliensis* como em *L. guyanensis*. Quando analisamos o número de haplótipos observados, o gene MRPA é o que possui o maior número em ambas as espécies. É importante mencionar que um pouco menos de 1/3 da região seqüenciada referente a este gene encontra-se na porção 3' não codificante. Portanto, grande parte da variabilidade encontrada é devido a essa região e não ao gene propriamente em si. Optou-se por essa abordagem de seqüenciamento parcial devido ao grande comprimento deste gene (~ 4.7kb) e foi escolhida a porção 3', uma vez que a regulação gênica em *Leishmania* é determinada principalmente pós-transcricionalmente por seqüências localizadas na região 3' não traduzida (revisado em Clayton & Shapira, 2007). Como já havia sido descrito que a região 3' do gene HSP70 é a mais variável em *L. braziliensis* (Amorim *et al.*, 1996; Zurita *et al.*, 2003) também se decidiu por analisar apenas esta porção do gene.

A eletroforese de multilocus enzimático (MLEE) é o método padrão para identificação de espécies de *Leishmania*. Contudo, a necessidade de isolamento e cultivo do parasito, o fato deste método somente detectar variação ao nível de aminoácidos e pequenas diferenças no ensaio poderem levar a variações na migração eletroforética das proteínas, nos leva ao desenvolvimento de técnicas mais rápidas e robustas para solucionar estes problemas. A tipagem molecular pelo seqüenciamento de DNA dos genes das mesmas enzimas utilizadas no MLEE tem sido utilizado para diferenciar espécies do subgênero *L. (Viannia)* (Tsukayama *et al.*, 2009) assim como analisar os genótipos presentes no complexo *L. donovani* (Mauricio *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007). Com este trabalho, demonstrou-se que genes relacionados à resistência a drogas também podem ser usados para discriminar duas espécies do subgênero *L. (Viannia)*, e que regiões não codificantes, como determinada após o gene MRPA, podem fornecer um maior número de informações, pois apresentam maiores taxas de mutação, uma vez que estão sobre menor pressão evolutiva (Kelchner, 2000).

Os genes AQP1, HSP70 e TR obtiveram valores de diversidade ( $\pi$ ) superiores em relação à origem geográfica do que a resposta terapêutica, o contrário ocorrendo no gene MRPA. Uma análise filogenética com diversos isolados de *L. donovani* utilizando genes relacionados a enzimas metabólicas revelou forte correlação dos

genótipos com a origem geográfica (Zemanová *et al.*, 2007). Entretanto, as diferenças encontradas entre organismos de diferentes origens em *L. braziliensis* não permitiram a formação de grupos distintos, sugerindo que este fator não é fundamental para explicar a diversidade observada. Todavia, o pequeno número de representantes do estado do Rio de Janeiro pode estar obscurecendo a presença de um genótipo característico para a região.

O estudo de evolução dos organismos depende dos padrões genéticos observados. Eventos de recombinação podem mimetizar efeitos de adaptação molecular e levar a aparente taxas de heterogeneidade (Worobey, 2001). Na análise filogenética, tais eventos são conhecidos por provocar a obtenção de árvores em formato de estrela e erros em testes de relógio molecular (Schierup & Hein 2000a,b). Em *Leishmania* poucos eventos de recombinação foram sugeridos (Kelly *et al.*, 1991; Laurent *et al.*, 2007; Lukes *et al.*, 2007). A determinação de tais eventos neste parasito levanta muitas discussões, uma vez que vão de encontro a teoria da reprodução clonal (Tibayrenc *et al.*, 1990). Portanto, é necessário cautela para afirmar que está ocorrendo o fenômeno de recombinação.

Diferentes algoritmos foram utilizados para testar a presença de recombinação genética, dentre os quais o Geneconv que é considerado um dos métodos mais robustos (Posada, 2002). Apenas o teste de Hudson & Kaplan (1985) detectou sinal de recombinação, contudo este método leva em consideração que não existam mutações recorrentes ou convergentes (Bruen *et al.*, 2006), eventos que certamente influenciam organismos com reprodução clonal. Tendo em vista esses resultados, não é possível comprovar eventos de recombinação nos genes AQP1, HSP70, MRPA ou TR em *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

Um padrão foi observado para os parasitos em relação a resposta terapêutica nas quatro regiões seqüenciadas. Os isolados oriundos de pacientes que não obtiveram sucesso ao tratamento apresentaram menores valores de  $\pi$ . Já foi demonstrado em *P. falciparum* que isolados resistentes estão sob influência de seleção de varredura (Volkman *et al.*, 2007), indicando a razão pelo qual se observa menor diversidade em isolados de falha terapêutica. Apesar dos valores estatísticos dos testes de Tajima e Fu e Li, descritos na tabela 13, serem predominantemente negativos, apenas alguns grupos, não necessariamente relacionados à falha, divergiram da teoria da evolução neutra. Já foi observado que em análises com poucas amostras, esses valores médios de D são comumente negativos (Charlesworth *et al.*, 1995). Um número amostral de pelo menos 50 é necessário para alcançar uma boa

resolução para detectar seleção por varredura. Além disso, a probabilidade de detectá-la é pequena, uma vez que caso seja recente pode ser difícil observar o surgimento de novas variantes, e se tiver ocorrido há muito tempo pode estar oculta devido ao acúmulo de novas variantes neutras (Simonsen *et al.*, 1995).

Apesar de o método de Tajima ser considerado mais robusto (Fu, 1997), com algumas exceções (Teshima *et al.*, 2006), apenas o teste de Fu e Li revelou no gene HSP70 uma seleção purificadora no conjunto de amostras de *L. braziliensis* e apenas nos isolados de cura terapêutica desta espécie. O mesmo já foi observado em seqüências de DNA humano (Yu *et al.*, 2001), no qual a rejeição da neutralidade encontrada pelo método de Fu e Li foi devida a alta proporção de variantes de baixa frequência. Esta hipótese está de acordo com os resultados observados para HSP70, pois 8 dos 9 polimorfismos encontrados para *L. braziliensis* correspondem a *singletons*. No gene TR, já foi constatado uma seleção purificadora para *L. guyanensis* e isolados de falha terapêutica desta espécie através de ambos os testes de Tajima e de Fu e Li, apesar de apresentar características semelhantes ao HSP70 como o grande número de *singletons*.

Avaliando apenas as diferenças entre as taxas de mutações sinônimas e não sinônimas, os isolados de falha terapêutica de *L. braziliensis* estão submetidos a seleção negativa e purificadora de acordo com os quatro genes, contudo as diferenças foram mínimas. Este tipo de seleção apresenta um forte efeito nas substituições de aminoácidos (Ohta, 1995) e um estudo mais recente revela que essas taxas de mutação quase sempre são mais sensíveis para detectar algum tipo de seleção do que os dados de frequência alélicos, utilizados, por exemplo, no teste de Tajima (Zhai *et al.*, 2009). Portanto, os dados sugerem que alguns genes relacionados a resistência estariam sob efeito de seleção purificadora, contudo um maior número de amostras é necessário para fortalecer esta hipótese.

De modo a avaliar se uma determinada proteína pode ser utilizada como alvo de drogas é importante primeiro compreender a natureza dos polimorfismos encontrados em populações de parasitos, uma vez que um dos grandes motivos do surgimento de resistência a drogas é devido a mutações pontuais em proteínas alvo (Arav-Boger & Shapiro, 2005). A descoberta de aquaporinas em protozoários e a detecção de diferenças estruturais entre elas e as homólogas em mamíferos revelou um cenário estratégico promissor contra infecções parasitárias (Beitz, 2005). Já foi demonstrado que AQP1 em *L. major* apresenta múltiplas funções fisiológicas,

estando envolvidas no transporte de solutos, osmotaxia e regulação do volume celular (Figarella *et al.*, 2007).

Apesar de não ter sido encontrado polimorfismo entre isolados resistentes e sensíveis ao SbIII no gene AQP1 em *L. major* e *L. tarentolae* (Marquis *et al.*, 2005), no presente trabalho, foram encontrados 9 polimorfismos em *L. braziliensis* e 3 em *L. guyanensis*, dentre os quais 4 levaram a mutações não sinônimas nesta primeira espécie e 3 na segunda. Num estudo com 65 isolados de *Plasmodium falciparum*, foram detectados apenas 2 mutações não sinônimas e ainda em regiões funcionais não relevantes da proteína (Bahamontes-Rosa *et al.*, 2007). Logo a seqüência do gene AQP1 de ambas as espécies em estudo de *Leishmania* mostraram-se mais polimórficas do que *P. falciparum*. Uma abordagem interessante seria avaliar se as mutações encontradas são relevantes para a manutenção da estrutura protéica.

Através de uma intensa análise mutacional sítio dirigida, foi observado que uma região extracelular característica da proteína AQP1 em *Plasmodium*, o C-loop encontrado entre as hélices transmembranas 3 e 4, é responsável pela permeabilidade de água (Beitz *et al.*, 2004). Coincidentemente, a região que apresenta maior diversidade genética em ambas as espécies de *Leishmania* está justamente entre as hélices 3 e 4 (Figura 8). Em *L. braziliensis* foram encontradas as mutações não sinônimas compartilhadas por alguns isolados em Ala66Asp, Leu127Phe e Val150Ala, e em *L. guyanensis* em Leu27Phe e Ser157Thr. A estrutura tridimensional de AQP1 em *P. falciparum* revelou que uma mudança de ácido glutâmico na posição 125 para serina interrompe o transporte de água (Beitz *et al.*, 2004; Newby *et al.*, 2008). Alterações na Glu152 em *L. major*, homóloga a Glu125 em *P. falciparum*, afetam significativamente a osmotaxia e a regulação do volume celular, sugerindo importante atividade fisiológica (Uzategui *et al.*, 2008). Além disso, mutações na Glu152 para glutamina, ácido aspártico ou alanina provocaram uma diminuição na sensibilidade de *L. major* a As(III) e Sb(III), expressa pela diminuição no acúmulo desses metalóides no parasito. Portanto, as mutações aqui observadas, em particular na região do C-loop em *L. braziliensis* (Val150Ala) e *L. guyanensis* (Ser157Thr), merecem devida atenção para futuros trabalhos no que concerne a importância de mutações pontuais no envolvimento do fenótipo de resistência a drogas.

A proteína HSP70 é um componente central das vias celulares envolvidas com chaperonas moleculares e processos de dobramento de proteínas (revisado em Mayer & Bukau, 2005). A função dessa proteína em *Leishmania* é considerada vital

na diferenciação da forma promastigota ou amastigota (Clos & Krobitch, 1999), e seu respectivo gene vem sendo utilizado como meio de identificação das diferentes espécies neotropicais através da técnica de PCR-RFLP (Garcia *et al.*, 2004, 2007).

O gene HSP70 apresentou-se bem conservado em ambas as espécies em estudo. Em *L. guyanensis* foi observado apenas uma mutação única no isolado IOC/L 2336, assim como uma deleção de um motivo de microssatélite CG. Este alto grau de conservação foi também observado em isolados de *Cryptosporidium* sp. de ovelhas, os quais não apresentaram variação na seqüência nucleotídica (Santín & Fayer, 2007). Contudo, num estudo com 122 isolados clínicos de *Trichomonas vaginalis* foi observado uma diversidade genética substancial no gene HSP70 (Meade *et al.*, 2009).

Já em *L. braziliensis* observou-se um polimorfismo compreendido na posição 1735 do gene HSP70 o qual apresentou uma chance 7,3 vezes maior de um determinado isolado estar associado à falha terapêutica, caso exista uma guanina no lugar de uma adenina. Utilizando-se a técnica de PCR-RFLP no gene HSP70, não foi possível determinar uma associação das diferenças genéticas com a manifestação clínica nesta mesma espécie (Garcia *et al.*, 2005), assim como a susceptibilidade a droga em isolados clínicos de *Trichomonas vaginalis* (Hussien *et al.*, 2005). Portanto, a utilização da técnica de seqüenciamento de DNA revelou uma variabilidade importante associada a resposta terapêutica que deve ser melhor estudada com a introdução de mais isolados de falha para confirmar a análise.

Proteínas ABC compreendem uma grande família protéica presente em tanto procariotos como eucariotos, dos quais muitos estão relacionados a resistência a drogas (Higgins, 2001). Quando descoberta, a proteína MRPA era a mais divergente dentre as proteínas ABC eucarióticas (Ouellette *et al.*, 1990). Atualmente, já está clara a importância do MRPA na resistência a metalóides, o seu respectivo gene é freqüentemente amplificado e superexpresso em isolados de *Leishmania* resistentes ao antimônio (Haimeur *et al.*, 2000; Mittal *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2007) e já foi demonstrado que mutantes nulos deste gene apresentam alta sensibilidade a droga (Papadopoulou *et al.*, 1996).

A região seqüenciada referente ao gene MRPA apresentou-se bem conservada em *L. guyanensis*, 3 das 4 mutações encontradas foram *singletons*. Ocorreu apenas uma mutação não sinônima (Ala1136Pro) entre o domínio transmembrana e o de ligação ao ATP na amostra IOC/L 2372 oriundo de um paciente que apresentou falha terapêutica. Na espécie *L. braziliensis* já foi observado um número bem

superior de polimorfismos, nos quais 8 eram compartilhados entre algumas amostras e desses 7 encontram-se na região codificante. As regiões fora dos domínios foram as que apresentaram maior diversidade genética, estando de acordo com a literatura, pois essas são as regiões menos conservadas (Gottesman & Pastan, 1993). Dentre as 3 mutações não sinônimas compartilhadas (Asn1250Asp, Ser1481Asn e Ala1492Ser) duas encontram-se no domínio de ligação ao ATP. Apesar de esse domínio ser mais conservado do que o transmembrana (Pérez-Victoria *et al.*, 2001), já foi determinado que mutações em alguns aminoácidos carregados nesta última região alteram o transporte e especificidade ao substrato em MRPA de humanos (Haimeur *et al.*, 2004). Diversas mutações pontuais relacionadas ao fenótipo de resistência a drogas são conhecidas em proteínas ABC no homem (Choudhuri & Klaassen, 2006), contudo pouco ainda se sabe sobre a diversidade genética delas em tripanosomatídeos. Na malária já foram observadas algumas mutações pontuais relacionadas a resistência a cloroquina no gene MDR1 (Sidhu *et al.*, 2005), outro transportador ABC, enquanto que no parasito *Trypanosoma congolense*, a presença de uma inserção no gene de um transportador ABC esteve presente em todos os isolados resistentes ao cloreto de isometamidium estudados (Delespaux *et al.*, 2005). Contudo, nem sempre o polimorfismo encontrado nessas proteínas expressa uma mudança na atividade transportadora e conseqüentemente no fenótipo de resistência, como foi descrito para o gene MDR1 em *Candida albicans* (Haque *et al.*, 2007).

Pelo perfil observado da diversidade genética em *L. guyanensis*, mais esforços devem ser empregados em regiões não codificantes, uma vez que o gene parcial de MRPA apresentou-se bem conservado. Duas mutações não sinônimas, Asn1250Asp e Ser1481Asn, presentes em alguns isolados de *L. braziliensis* oriundos de pacientes que apresentaram falha terapêutica, levantam suspeitas da sua relevância na atividade da proteína MRPA. Estudos futuros avaliando a importância dessas mutações na estrutura protéica podem ajudar a esclarecer uma possível associação ao fenótipo de resistência a drogas. Além disso, comparar a seqüência completa do gene MRPA em diferentes isolados de *L. braziliensis* pode conduzir a informação relevante para melhor entender a diversidade biológica desses parasitos.

A tripanotiona redutase é uma flavoproteína oxidoreductase dependente de NADPH que é essencial para a manutenção da tripanotiona em tripanosomatídeos, tendo importante papel em processos de detoxificação (Fairlamb, 1992). A incapacidade de gerar mutantes nulos para esta enzima em *Leishmania* fortalece a

sua importância vital no metabolismo do parasito (Dumas *et al.*, 1997). Além disso, reduzindo a atividade desta enzima, por exemplo, inativando um dos alelos, foi observado um aumento na sensibilidade ao estresse oxidativo tanto em *Leishmania* (Dumas *et al.*, 1997; Tovar *et al.*, 1998) como em *Trypanosoma* (Krieger *et al.*, 2000). Logo, a tripanotiona redutase representa um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas drogas.

O segundo gene em estudo mais conservado foi o TR. Em *L. guyanensis*, foram observadas apenas 4 *singletons*. Cinco dos seis polimorfismos encontrados em *L. braziliensis* foram compartilhados entre alguns isolados e apenas 3 desses levaram a mutações não sinônimas. Entretanto, essas mutações não estão presentes em algum sítio ativo da enzima (Taylor *et al.*, 1994) ou em regiões invariáveis do alinhamento de seqüências de aminoácidos de tripanosomatídeos (Castro-Pinto *et al.*, 2008). Esses resultados corroboram os de Rojas *et al.* (2007), no qual foi observada uma baixa diversidade no gene TR de *Trypanosoma cruzi*, não sendo possível associar os genótipos encontrados com a origem geográfica. Contudo, outro estudo com 31 cepas do próprio *T. cruzi* observou uma maior diversidade genética com 11 de 46 polimorfismos provocando mudanças na seqüência de aminoácidos, embora não tenham sido observadas mutações não sinônimas em regiões importantes para a atividade enzimática (Machado & Ayala, 2002). Num trabalho adicional avaliando a diversidade nucleotídica do gene TR em apenas 5 clones genômicos de outro tripanosomatídeo (*Crithidia fasciculata*), foram observadas mais mutações pontuais do que em *Leishmania*, embora apenas 1 dos 14 polimorfismos tenha provocado uma mudança no tipo de aminoácido (Field *et al.*, 1992). No presente trabalho, a baixa variabilidade genética encontrada nos isolados clínicos para TR de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* não permite utilizá-la como ferramenta para avaliar a resposta terapêutica.

De acordo com a análise de agrupamentos hierárquicos, todos os genes em estudo são capazes de diferenciar *L. braziliensis* de *L. guyanensis* como grupos distintos. A divergência observada entre os grupos formados de cada gene sugere que esses genes encontram-se sob diferentes pressões seletivas, nos quais apenas os mais conservados (TR e HSP70) conseguiram agrupar pelo menos uma seqüência consenso das amostras oriundas de pacientes que apresentaram falha terapêutica num único grupo misturado com outras de cura. Está bem claro que em *L. braziliensis* foi possível obter um dendrograma com maior resolução para todos os genes. Já para *L. guyanensis* pouca informação pode ser explorada, uma vez que



no geral apenas dois grupos não relacionados a resposta terapêutica foram observados para cada gene. Esses dados corroboram estudos prévios (Cupolillo *et al.*, 1994) e reforçam a idéia de que existem populações de *L. guyanensis* distintas circulando em algumas regiões como Brasil (Romero *et al.*, 2001a, 2002), Colômbia (Saravia *et al.*, 1998), Peru (Arevalo *et al.*, 2007), Venezuela (Bonfante-Garrido *et al.*, 1992; Delgado *et al.*, 1997), Equador (Calvopina *et al.*, 2006) e Guiana Francesa (Rotureau *et al.*, 2006). Uma maior variação intra-específica já havia sido observada para *L. braziliensis* em relação a *L. guyanensis* (Cupolillo *et al.*, 1995; 1998). A capacidade de *L. braziliensis* para uma maior reorganização genômica, devido a descoberta de retrotransposons putativos e uma maquinaria de RNAi, explica em parte a sua plasticidade genética (Smith *et al.*, 2007). Agora cabe a pesquisas futuras entender melhor o porquê da maior homogeneidade encontrada em espécimes de *L. guyanensis*. Os isolados avaliados neste estudo foram todos obtidos de pacientes que contraíram a doença no Brasil, onde observamos que o ciclo de transmissão das duas espécies apresenta características bem distintas, com *L. guyanensis* apresentando um ciclo essencialmente silvestre, praticamente restrito a calha norte do Rio Amazonas e com o predomínio de transmissão por apenas uma espécie vetora, *Lutzomyia umbratilis*, embora associado a diferentes espécies de mamíferos edentados. Em contrapartida, *L. braziliensis* está amplamente distribuída no país, envolvendo ciclos de transmissão urbana (doméstica e peri-doméstica) e silvestre, apresentando uma série de espécies incriminadas como vetores deste parasito e algumas espécies de mamíferos como hospedeiros vertebrados, como canídeos, roedores e marsupiais.

Embora vários estudos mostrem a capacidade de diferentes marcadores em discriminar entre as diversas espécies de *Leishmania*, incluindo as aqui estudadas (Cupolillo *et al.*, 2000), o pequeno número de genes espécie-específicos até hoje determinados na comparação dos três genomas completos de *Leishmania* sugere que a razão da sua diversidade fenotípica natural, relacionada às suas diferentes manifestações clínicas, encontra-se além do DNA do parasito (Peacock *et al.*, 2007). Portanto, o perfil de expressão gênica pode representar um papel fundamental na caracterização desses distintos fenótipos em *Leishmania*.

A forma predominante no hospedeiro vertebrado é a amastigota, enquanto no hospedeiro invertebrado a promastigota. Portanto, acredita-se que estudos sobre os mecanismos de resistência a drogas na forma amastigota devem melhor mimetizar como o parasito escapa a droga na infecção natural no homem. Além disso, já foi

descrito que as diferentes formas de vida do parasito respondem distintamente ao SbV (Ephros *et al.*, 1997, 1999). Contudo, a obtenção das formas amastigotas *in vitro* pode ser muitas vezes cara e demorada. Como em muitas regiões endêmicas da leishmaniose não dispõem de laboratórios bem equipados, a utilização de marcadores epidemiológicos na forma amastigota pode ser inviável na prática. Portanto, decidiu-se estudar a forma promastigota do parasito, que apresenta fácil cultivo e manipulação.

Dentre os genes estudados, o GS e o TDR1 foram os que apresentaram níveis de expressão mais estáveis e, portanto, foram utilizados como normalizadores. Um estudo de expressão gênica realizado em *L. braziliensis* isolados de pacientes com diferente resposta terapêutica no Peru observou esses mesmos genes como normalizadores num conjunto com 14 genes analisados relacionados a resistência a drogas (Vanessa Aduai, Jorge Arevalo e Jean-Claude Dujardin, comunicação pessoal).

Dependendo do gene em estudo, já foi demonstrado que os níveis de expressão em promastigotas podem variar de acordo com o momento da sua fase de crescimento (Decuypere *et al.*, 2008). Como já discutido em outros trabalhos, as diferenças observadas nos valores de expressão em *Leishmania* são geralmente menores do que em outros eucariotos (Akopyants *et al.*, 2004; Duncan, 2004). Portanto, a utilização de múltiplas medidas de expressão observadas durante o desenvolvimento da forma promastigota pode fornecer a quantidade de dados necessária para revelar as diferenças nos perfis de expressão em amostras de *Leishmania*.

O estudo de dois pontos (fase logarítmica tardia e estacionária) da curva de crescimento de promastigotas não revelou diferenças significativas nos perfis de expressão. Portanto, os resultados sugerem que a diferença entre essas duas fases é estreita em *Leishmania* do subgênero *L. (Viannia)*, contudo não elimina a possibilidade de que grandes diferenças possam ser observadas quando fases mais distantes da curva de crescimento do parasito sejam estudadas, como relatado em Decuypere *et al.* (2008).

No presente trabalho, os genes MRPA e  $\gamma$ -GCS são distintamente expressos quando comparados todos os perfis das amostras de *L. guyanensis* contra os das de *L. braziliensis*. Já foi demonstrado na maioria dos isolados clínicos estudados que os pacientes infectados com *L. guyanensis* apresentaram menores taxas de cura em relação às infecções por *L. braziliensis* (Romero *et al.*, 2001a). O fato de os genes

mencionados acima estarem superexpressos em *L. guyanensis* pode contribuir para o fato relatado. Apesar de não ter sido observado variação significativa em relação à resposta terapêutica para o gene MRPA em ambas as espécies, já foi descrito que o gene MRPA sofre amplificação gênica tanto na forma amastigota (Mukherjee *et al.*, 2007) como na promastigota (Mittal *et al.*, 2007), assim como está superexpresso (Singh *et al.*, 2007), em isolados resistentes naturais. O papel do gene  $\gamma$ -GCS será melhor detalhado abaixo.

O fenômeno de falha terapêutica é complexo e envolve uma série de fatores relacionados a interação parasito, hospedeiro e droga. Já o fenótipo de resistência a drogas no parasito não leva em consideração a interação com o hospedeiro. Nem sempre ambos os fenômenos são observados concomitantemente (Abdo *et al.*, 2003; Rijal *et al.*, 2007). Então seria interessante realizar estudos futuros de infecção *in vitro* em macrófagos para avaliar a correlação da resposta terapêutica com a resistência a drogas em isolados naturais do Brasil.

Analisando apenas as amostras de *L. braziliensis* não foi possível observar diferenças significativas nos valores de expressão normalizados dentre os fatores analisados para nenhum dos genes alvo. Talvez a variação dos níveis de expressão entre os diferentes isolados desta espécie seja estreita ao ponto de ser difícil diferenciar entre a variação técnica e a biológica de acordo com os métodos atuais, ou devido ao pequeno número de amostras oriundas de falha terapêutica não foi possível distribuir apropriadamente a variabilidade observada.

Na espécie *L. guyanensis* o gene  $\gamma$ -GCS está superexpresso em isolados de falha terapêutica, enquanto há uma tendência do gene AQP1 também estar superexpresso na falha. O aumento da expressão do gene  $\gamma$ -GCS implica numa maior produção de tripanotona, que apresenta função de destoxificação celular. Em promastigotas de *L. donovani* isolados de pacientes que não responderam ao tratamento com antimônio pentavalente foi observado um aumento na concentração de tiol no parasito (Mittal *et al.*, 2007), que poderia ser devido a um aumento da expressão de enzimas relacionadas a biosíntese de tripanotona, como a  $\gamma$ -GCS. Outros estudos em isolados resistentes a drogas demonstraram um aumento na expressão de  $\gamma$ -GCS em parasitos resistentes e uma diminuição da expressão deste gene no macrófago hospedeiro (Carter *et al.*, 2006). Na forma amastigota de alguns isolados resistentes também foi observado uma superexpressão do gene  $\gamma$ -GCS acompanhado ao ODC (Mukherjee *et al.*, 2007), ambas são enzimas limitantes da biosíntese de tripanotona, contrariando o trabalho de Decuypere *et al.* (2005), que

observou uma diminuição da expressão desses genes na forma amastigota de isolados resistentes. Apesar de ter sido proposto diferentes mecanismos de fuga a droga em isolados resistentes naturais e *in vitro* de *Leishmania* (revisado em Ashutosh *et al.*, 2007), também já foi observado um aumento da expressão de  $\gamma$ -GCS em mutantes resistentes deste parasito (Guimond *et al.*, 2003).

Em tripanosomatídeos o gene AQP1 codifica uma proteína com multidomínios transmembranas com capacidade de transportar água, glicerol, metalóides, dentre outros solutos (Beitz, 2005). Acredita-se que ela esteja relacionada ao estresse osmótico, sendo sua expressão continuamente ajustada de acordo com o ambiente que o parasito é submetido. Como esta proteína transportadora é capaz de promover o influxo da forma ativa da droga (SbIII), uma diminuição da expressão deste gene poderia contribuir para um fenótipo de resistência (Gourbal *et al.*, 2004; Marquis *et al.*, 2005). Já foi observado uma diminuição da expressão de AQP1 em amastigotas resistentes a SbIII (Decuypere *et al.*, 2005). Contudo, um aumento na expressão deste gene vai de encontro a um bom mecanismo de fuga do parasito a droga, como observado no presente trabalho. Em promastigotas de isolados naturais de *L. donovani* também já foi observado um aumento na expressão de AQP1 e  $\gamma$ -GCS após o início da fase estacionária do crescimento do parasito (Decuypere *et al.*, 2008). Além disso, apesar de já ter sido observado que isolados resistentes naturais apresentam uma redução no influxo de SbIII, não houve correlação com o gene AQP1, uma vez que existia um maior número de cópias nos isolados resistentes e não foi observado diferenças significativas nos níveis de expressão (Maharjan *et al.*, 2008). Portanto, os mecanismos pelo o qual o parasito escapa a droga parece nem sempre seguir o mesmo caminho.

Portanto, os resultados obtidos revelam o potencial da utilização do perfil de expressão do gene  $\gamma$ -GCS em promastigotas para realizar o prognóstico da leishmaniose cutânea causada pelo agente etiológico *L. guyanensis* no Brasil. Como neste país já foram descritas mais 5 outras espécies (*L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenbergi* e *L. amazonensis*) associadas com a doença, seria importante explorar também os perfis de expressão desses outros agentes etiológicos, principalmente o de *L. amazonensis* uma vez que é o único representante do subgênero *L. (Leishmania)* causando a doença no país, além de ser responsável pela forma difusa da doença. Além disso, seria importante analisar um maior número de isolados de cada espécie para fortalecer e validar os resultados observados.

A análise de agrupamento realizada para as amostras em estudo em relação ao perfil de expressão de cada gene esclarece que os genes alvo estão sendo expressos de forma independente. A ausência de associação dos grupos formados com a análise das seqüências nucleotídicas obtidas e com os perfis de expressão dos genes AQP1, MRPA e TR, revela que não há uma relação direta dos polimorfismos observados com as diferenças na expressão desses genes. Logo, outros fatores ainda desconhecidos devem estar atuando no controle da expressão dos genes em estudo em *Leishmania*. Devido a ausência de um mecanismo de controle da expressão gênica em *Leishmania*, é observado exclusivamente regulação pós-transcricional (revisado em Clayton & Shapira, 2007), o qual envolve primariamente a seqüência da região 3' não traduzida que é responsável por determinar a abundância do RNAm através da modulação da sua estabilidade (Aly *et al.*, 1994; Charest *et al.*, 1996; Holzer *et al.*, 2008) ou da eficiência da tradução (Boucher *et al.*, 2002; Larreta *et al.*, 2004). É conhecido que a regulação de transcritos do gene amastina em *Leishmania* é mediada por regiões definidas dentro da 3'-UTR que apresenta diferenças no tamanho e composição da seqüência nucleotídica (McNicoll *et al.*, 2005). Portanto, uma segunda abordagem com o objetivo de seqüenciar apenas as regiões 3'-UTR dos genes em estudo pode esclarecer uma associação com a abundância de RNAm observada.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ As seqüências dos genes AQP1, HSP70, MRPA e TR sugerem uma maior variabilidade intra-específica para *L. braziliensis* em relação a *L. guyanensis*. Um polimorfismo observado no gene HSP70 parece estar relacionado à falha terapêutica em *L. braziliensis*. Algumas mutações não sinônimas observadas ainda merecem devida atenção em futuros estudos para validar a sua importância.
- ✓ O perfil de expressão gênica observado dos genes MRPA e  $\gamma$ -GCS permite discriminar entre as duas espécies em estudo. Além disso, o gene  $\gamma$ -GCS apresenta potencial para ser utilizado no prognóstico da leishmaniose cutânea causada por *L. guyanensis*, uma vez que se encontra superexpresso em isolados de falha terapêutica.
- ✓ A análise de agrupamentos tanto para os dados de seqüências de DNA como para os perfis de expressão gênica não determinou grupos relacionados à resposta terapêutica nos isolados clínicos estudados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdo MG, Elamin WM, Khalil EA, Mukhtar MM. Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and in vitro correlation. *East Mediterr Health J.* 2003; 9(4): 837-43.

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; 136: 71–86.

Allen S, Neal RA. The in vitro susceptibility of macrophages infected with amastigotes of *Leishmania* spp. to pentavalent antimonial drugs and other compounds with special relevance to cutaneous isolates. In: Hart DT, ed. *Leishmaniasis*. New York: Plenum Press, 1989. p. 711–20.

Al-Jawabreh A, Diezmann S, Müller M, Wirth T, Schnur LF, Strelkova MV, Kovalenko DA, Razakov SA, Schwenkenbecher J, Kuhls K, Schönian G. Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania (Leishmania) major* by microsatellite analysis. *BMC Evol Biol.* 2008; 8: 183.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(2): 334-59.

Aly R, Argaman M, Halman S, Shapira M. A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic acids research.* 1994; 22(15): 2922-2929.

Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, de Almeida ML. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones.* 1996; 1(3): 177-87.

Anacleto C, Abdo MC, Ferreira AV, Murta SM, Romanha AJ, Fernandes AP, Moreira ES. Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell line. *Parasitol Res.* 2003; 90: 110–118.

Anderson JC, Romero-Abal ME, Jainike J. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. *Parasitology.* 1993; 107: 319–334.

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35: W71-W74.

Arav-Boger R, Shapiro TA. Molecular mechanisms of resistance in anti-malarial chemotherapy: the unmet challenge. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 565–85.

Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban area of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1981; 76: 279–86.

Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75:537–41.

- Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007; 195(12): 1846-51.
- Arevalo J, Ward IB, Miller R, Meng TC, Najjar E, Alvarez E, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis*. 2001; 33: 1847–1851.
- Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 115: 189–198.
- Ashford R, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today*. 1992; 8: 104–105.
- Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol*. 2007; 56(Pt 2): 143-53.
- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, Portal AC, Max G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol*. 2007; 93(3): 688-93.
- Bahamontes-Rosa N, Wu B, Beitz E, Kremsner PG, Kun JF. Limited genetic diversity of the *Plasmodium falciparum* aquaglyceroporin gene. *Mol Biochem Parasitol*. 2007; 156: 255–257.
- Banūls AL, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol*. 1999; 29(8): 1137-47.
- Beitz E. Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol Cell*. 2005; 97: 373–383.
- Beitz E, Pavlovic-Djuranovic S, Yasui M, Agre P, Schultz JE. Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 1153–1158.
- Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL: Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 143(2): 125-134.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*. 1988; 10(3): 560-86.
- Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, Kuzoe F, Pang L, Weerasuriya K, Bryceson AD. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ*. 1998; 76: 25–32.
- Berman JD, Gallalee JV, Best JM. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol*. 1987; 36: 197–201.
- Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 27: 916–920.
- Berman JD, Wyler DJ. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1980; 142: 83–6.



- Bermúdez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, Chappuis F. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006; 100(7): 591-600.
- Berry A, Benoit-Vical F, Fabre R, Cassaing S, Magnaval JF. PCR-based methods to the diagnosis of imported malaria. *Parasite*. 2008; 15(3): 484-8.
- Beverley SM. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*. 1991; 45: 417–444.
- Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(2): 158-166.
- Bonfante-Garrido R, Meléndez E, Barroeta S, de Alejos MA, Momen H, Cupolillo E, McMahan-Pratt D, Grimaldi G Jr. Cutaneous leishmaniasis in western Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992; 86(2): 141-8.
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou B: A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem*. 2002; 277(22): 19511-19520.
- Bray PG, Barrett MP, Ward SA, Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol*. 2003; 19: 232–239.
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 8: 828–831.
- Britto C, Cardoso A, Silveira C, Macedo V, Fernandes O. Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina (B Aires)*. 1999; 59(Suppl. 2): 176–178.
- 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; 222: 107-117.
- Brochu C, Haimeur A, Ouellette M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Stress Chaperones*. 2004; 9(3): 294-303.
- Brown SM. *Bioinformatics: a biologist's guide to biocomputing and the internet*. Natick: Eaton Publishing, Massachusetts, USA. 188 pp. 2000.
- Bruen TC, Philippe H, Bryant D. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics*. 2006; 172(4): 2665-81.
- Burguera JL, Burguera M, Petit de Pena Y, Lugo A, Anez N. Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimonate. *J Trace Elem Med Biol*. 1993; 10: 66–70.
- Callahan HL, Beverley SM. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem*. 1991; 266: 18427–18430.
- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(4): 818-22.

- Callahan HL, Roberts WL, Rainey PM, Beverley SM. The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 68: 145–149.
- Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomez EA, Korenaga M, Barroso PA, Mimori T, Cooper PJ, Nonaka S, Hashiguchi Y. *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: relationships with geographic distribution and clinical presentation. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 139.
- Carter KC, Hutchison S, Henriquez FL, Légaré D, Ouellette M, Roberts CW, Mullen AB. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite (gamma)-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(1): 88-95.
- Carter KC, Mullen AB, Sundar S, Kenney RT. Efficacies of vesicular and free sodium stibogluconate formulations against clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 3555–3559.
- Carter NS, Drew ME, Sanchez M, Vasudevan G, Landfear SM, Ullman B. Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant. *J Biol Chem.* 2000; 275(27): 20935-41.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994; 56: 315–25.
- Carvalho ML, de Andrade AS, Fontes CJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop.* 2006; 98(3): 277–85.
- Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Braz J Pharm Sci.* 2000; 36: 69–96.
- Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78(1):122-32.
- Castro-Pinto DB, Genestra M, Menezes GB, Waghbi M, Gonçalves A, De Nigris Del Cistia C, Sant'Anna CM, Leon LL, Mendonça-Lima L. Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. *Arch Microbiol.* 2008; 189(4): 375-84.
- Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI), Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico, Ano V, N° 1. 2005.
- Charest H, Zhang WW, Matlashewski G. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote- specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3' - untranslated region. *J Biol Chem.* 1996; 271: 17081–90.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Morgan MT. The pattern of neutral molecular variation under the background selection model. *Genetics.* 1995; 141(4): 1619-32.
- Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol.* 2006; 25(4): 231-59.

- Christensen HA, Arias JR, de Vasquez AM, de Freitas RA. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the central Amazon of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31(2): 239-42.
- Clayton C, Shapira M: Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 156(2): 93-101.
- Clos J, Krobitsch S. Heat shock as a regular feature of the life cycle of *Leishmania* parasites. *American Zoologist.* 1999; 39: 848–856.
- Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 130: 83–90.
- Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(8): 3030-2.
- Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science.* 1992; 257: 1050–82.
- Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetch S, Davies C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(5): 612-9.
- Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 89: 149–159.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1): 111-26.
- Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72(2): 132-41.
- Cunningham ML, Fairlamb AH. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterization and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem.* 1995; 230: 460–468.
- Cunningham ML, Zvelebil MJ, Fairlamb AH. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *Eur J Biochem.* 1994; 221: 285–295.
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7): 3126-32.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(3):296-311.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997; 91(6): 617-26.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995; 73:145–155.

- Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 663–668.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000; 16: 142–144.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(4): 352-6.
- da Silva, OS, Grunewald J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(5): 579-82.
- Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs*. 1998; 56(6): 1009-18.
- Dávila AM, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94: 651–654.
- de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97(4): 387-90.
- Decuyper 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: 4616–4621.
- Decuyper S, Vanaerschot M, Rijal S, Yardley V, Maes L, de Doncker S, Chappuis F, Dujardin JC. Gene expression profiling of *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*: overcoming technical variation and exploiting biological variation. *Parasitology*. 2008; 135(2): 183-94.
- Dedet JP. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 43: 25–8.
- Delespaux V, Chitanga S, Geysen D, Goethals A, van den Bossche P, Geerts S. SSCP analysis of the P2 purine transporter TcoAT1 gene of *Trypanosoma congolense* leads to a simple PCR-RFLP test allowing the rapid identification of diminazene resistant stocks. *Acta Trop*. 2006; 100, 96–102.
- Delespaux V, Geysen D, Majiwa PA, Geerts S. Identification of a genetic marker for isometamidium chloride resistance in *Trypanosoma congolense*. *Int J Parasitol*. 2005; 35: 235–243.
- Delespaux V, de Koning HP. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist Updat*. 2007; 10: 30–50.
- Delgado O, Cupolillo E, Bonfante-Garrido R, Silva S, Belfort E, Grimaldi Júnior G, Momen H. Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(5): 581-2.
- Demicheli C, Frézard F, Lecouvey M, Garnier-Suillerot A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1570(3): 192-8.
- Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase TDR1. *Biochem J*. 2004; 381(Pt 2): 405–412.

- Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Derm.* 1996; 14: 417–23.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95: 239–243.
- Desjeux P. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Wkly Epidemiol Rec.* 2002; 77: 365–370.
- Dey S, Ouellette M, Lightbody J, Papadopoulou B, Rosen BP. An ATP-dependent As(III) glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 2192-7.
- Dey S, Papadopoulou B, Haimour A, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP, Ouellette M. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 67: 49-57.
- Dooijes D, Chaves I, Kieft R, Dirks-Mulder A, Martin W, Borst P. Base J originally found in kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 3017–3021.
- Duesberg P, Li R, Sachs R, Fabarius A, Upender MB, Hehlmann R: Cancer drug resistance: the central role of the karyotype. *Drug Resist Updat.* 2007; 10: 51-58.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* 1997; 16: 2590–2598.
- Duncan R. DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol.* 2004; 20: 211–215.
- El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulou B, Legare D, Ouellette M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 1988–1993.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N: Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* 2005; 309(5733): 404-409.
- Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 278–282.
- Ephros M, Waldman E, Zilberstein D. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1064–1068.
- Escalante AA, Cornejo OE, Rojas A, Udhayakumar V, Lal AA. Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2004; 20:388-395.
- Ewing B, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Res.* 1998a; 8: 186-194.

- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res.* 1998b; 8(3): 175-85.
- Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 1992; 46: 695–729.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 66(2): 261-71.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.* 3ª Edição. EMBRAPA-CENARGEN. 220pp. 1998.
- Figurella K, Uzcategui NL, Zhou Y, LeFurgey A, Ouellette M, Bhattacharjee H, Mukhopadhyay R. Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Mol Microbiol.* 2007; 65: 1006–1017.
- Field H, Cerami A, Henderson GB. Cloning, sequencing, and demonstration of polymorphism in trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 50:47-56.
- Flohe L, Budde H, Hofmann B. Peroxiredoxins in antioxidant defense and redox regulation. *BioFactors.* 2003; 19: 3–10.
- Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology.* 2007; 134(Pt 3): 369-77.
- Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 913–916.
- Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 1997; 147: 915–925.
- Garcia AL, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, QuispelTintaya KW, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2294-2297.
- Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol.* 2005; 5(2): 109-16.
- Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101(4):368-71.
- Genest PA, Haimeur A, Légaré D, Sereno D, Roy G, Messier N, Papadopoulou B, Ouellette M. A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 2008; 158(1): 95-9.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2007; 7: 7.

- Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Res.* 1998; 8: 195-202.
- Gordon D, Desmarais C, Green P. Automated Finishing with Autofinish. *Genome Res.* 2001; 11(4): 614-625.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 385-427.
- 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: 31010–31017.
- Goyeneche-Patino DA, Valderrama L, Walker J, Saravia NG. Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(12): 4503-6.
- Grimaldi G Jr., David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 36: 270-287.
- Grimaldi G Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 230-250.
- Grimaldi G Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 41: 687-725.
- Grogl M, Oduola AM, Cordero LD, Kyle DE. *Leishmania* spp.: Development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol.* 1989; 69: 78–90.
- Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47: 117–26.
- Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J.* 1997; 16: 3057–3065.
- 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, Légaré 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.
- Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 2006; 3(5):e162
- Haile S Papadopoulou, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 2007, 10: 569-577.
- 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: 131-5.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 1375–1385.

- Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Poulin R, Ouellette M. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol*. 1999; 34(4): 726-35.
- Haimeur A, Ouellette M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1689-94.
- Halkidi M, Batistakis Y, Vazirgiannis M. On clustering validation techniques. *J. Intell. Inform. Syst.*, 2001; 17: 107–145.
- Haque A, Rai V, Bahal BS, Shukla S, Lattif AA, Mukhopadhyay G, Prasad R. Allelic variants of ABC drug transporter Cdr1p in clinical isolates of *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 352: 491–497.
- Havryliuk T, Orjuela-Sánchez P, Ferreira MU. *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of multiple-clone infections. *Exp Parasitol*. 2008; 120(4): 330-6.
- Hayton K, Su XZ. Genetic and biochemical aspects of drug resistance in malaria parasites. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2004, 4: 1-10.
- Hendricks LD, Wood DE, Hadjuk ME. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitol*. 1978; 76: 309-316.
- Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res Microbiol*. 2001; 152: 205–210.
- Holzmuller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, Lemesre JL. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect Immun*. 2002; 70: 3727–3735.
- Holzmuller P, Sereno D, Lemesre JL. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4406–4409.
- Hudson RR, Kaplan NL. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics*. 1985; 111(1): 147-64.
- Huson DH, Bryant D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol Biol Evol*. 2006; 23(2): 254-267.
- Hussien EM, El-Sayed HZ, El-Moamly AA, Helmy MM, Shaban MM. Molecular characterization of Egyptian *Trichomonas vaginalis* clinical isolates by HSP70 restriction fragment length polymorphism. *J Egypt Soc Parasitol*. 2005; 35(2): 699-710.
- Ibrahim ME, Hag-Ali M, el-Hassan AM, Theander TG, Kharazmi A. Leishmania resistant to sodium stibogluconate: Drug-associated macrophage-dependent killing. *Parasitol Res*. 1994; 80: 569–574.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33: e56.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson



DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasc AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ: The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005; 309(5733): 436-442.

Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, Mebrahtu YB, Lawyer PG, Were JB, Reed SG, Panisko DM, Limmer BL. Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* spp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 43(5): 464-80.

Jiménez M, Alvar J, Tibayrenc M. *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too; epidemiological implications. *AIDS*. 1997; 11: 569–73.

Kelchner SA. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann MO Bot Gard*. 2000; 87: 482-498.

Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJ, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 46(2): 253-63.

Kerr SF. Molecular trees of trypanosomes incongruent with fossil records of hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 25–30.

Kerr SF. Palaeartic origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95: 75–80.

Knoll AH, Javaux EJ, Hewitt D & Cohen P. Eukaryotic organisms in proterozoic oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361: 1023–1038.

Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*. 2001; 11(6): 725-32.

Koffi M, Solano P, Barnabé C, de Meeûs T, Bucheton B, Cuny G, Jamonneau V. Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* s.l. using microsatellite typing: new perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infect Genet Evol*. 2007; 7(6): 675-84.

Kothari H, Kumar P, Sundar S, Singh N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. *Parasitol Int*. 2007; 56(1):77-80.

Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol*. 2000; 35: 542–552.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. *The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology*, Academic Press, London; 1987. pp. 1–120.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23: 2947-2948.

- Larreta R, Soto M, Quijada L, Folgueira C, Abanades DR, Alonso C, Requena JM. The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol.* 2004; 5: 3.
- Laurent T, Rijal S, Yardley V, Croft S, De Doncker S, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Schönian G, Kuhls K, Chappuis F, Dujardin JC. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally resistant clinical isolates from Nepal. *Infect Genet Evol.* 2007; 7(2): 206-12.
- Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 2002; 9: 53–64.
- Légaré D, Papadopoulou B, Roy G, Mukhopadhyay R, Haimeur A, Dey S, Grondin K, Brochu C, Rosen BP, Ouellette M. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite resistant *Leishmania* species. *Exp Parasitol.* 1997; 87: 275–282.
- Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M. The *Leishmania* ABC protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 26301-7.
- Leprohon P, Légaré D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell.* 2006; 5(10): 1713-25.
- Leprohon P, Légaré D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette M. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* 2009; *in press.* doi:10.1093/nar/gkn1069.
- Levene H. In: *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, I. Olkin *et al.* eds., Stanford University Press, pp. 278-292. 1960.
- Li H, Zhang Y, Zhang YP, Fu YX. Neutrality tests using DNA polymorphism from multiple samples. *Genetics.* 2003; 163(3): 1147-51.
- Lira R, Sunder S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sack D. Evidence that the high incidence of treatment failure in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 1999; 180: 564–567.
- Lovmar L, Ahlford A, Jonsson M, Syvänen A. Silhouette scores for assessment of SNP genotype clusters. *BMC Genomics.* 2005; 6: 35.
- Lucumi A, Robledo S, Gama V, Saravia NG. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(8): 1990-5.
- Lugo de Yarbuh A, Añez N, Petit de Peña Y, Burguera JL, Burguera M. Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with *Leishmania garnhami* and treated with meglumine antimoniate. *Ann Trop Med Parasitol.* 1994; 88: 37–41.
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 9375–9380.

Ma G, Khan SI, Jacob MR, Tekwani BL, Li Z, Pasco DS, Walker LA, Khan IA. Antimicrobial and antileishmanial activities of hipocrellins A and B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 8(11): 4450–4452.

Machado CA, Ayala FJ. Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 121(1): 33-47.

Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R. Role of aquaglyceroporin (AQP1) gene and drug uptake in antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(1): 69-75.

Manson-Bahr PEC. *Manson's Tropical Diseases*. 20<sup>th</sup> Ed.; W. B. Sanders. Filadélfia, EUA. 1996. pp. 206-217.

Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol.* 2005; 57: 1690–1699.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espúndia” Escomel 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80: 859–76.

Martin DP, Williamson C, Posada D. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics.* 2005; 21: 260–262.

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

Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, Dedet JP, Lukes J, Miles MA. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* 2006; 36: 757–769.

Mayr E. *Populações, Espécies e Evolução*. Companhia Editora Nacional. Universidade de São Paulo. 1970. 485pp.

McNicoll F, Muller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dubé M, Papadopoulou B. Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem.* 2005; 280: 35238–46.

Meade JC, de Mestral J, Stiles JK, Secor WE, Finley RW, Cleary JD, Lushbaugh WB. Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by EcoRI restriction fragment length polymorphism of heat-shock protein 70 genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80(2): 245-51.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasil. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2<sup>a</sup> Edição. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 pp. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).

Mishra M, Biswas UK, Jha DN, Khan AB. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kalaazar. *Lancet.* 1992; 340: 1256–1257.

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

- Mittal MK, Rai S, Ashutosh, Ravinder, Gupta S, Sundar S, Goyal N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(4): 681-8.
- Moore E, O'Flaherty D, Heuvelmans H, Seaman J, Veeken H, Wit S, Davidson RN. Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull World Health Organ.* 2001, 79: 388-393.
- Moreira ES, 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(9): 720-6.
- Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Isley D: A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis.* 2000; 21: 128-134.
- Mukhopadhyay R, Rosen BP. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect.* 2002; 110: 745–748.
- 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; 59(2): 204-11.
- Muniz-Junqueira MI, de Paula-Coelho VN. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(12): 1633-8.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005; 366(9496): 1561-77.
- Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J Infect Dis.* 1985; 152: 64–73.
- 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): 637-42.
- Neafsey DE, Schaffner SF, Volkman SK, Park D, Montgomery P, Milner DA Jr, Lukens A, Rosen D, Daniels R, Houde N, Cortese JF, Tyndall E, Gates C, Stange-Thomann N, Sarr O, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Ferreira MU, Moraes SD, Dash AP, Chitnis CE, Wiegand RC, Hartl DL, Birren BW, Lander ES, Sabeti PC, Wirth DF. Genome-wide SNP genotyping highlights the role of natural selection in *Plasmodium falciparum* population divergence. *Genome Biol.* 2008; 9(12): R171.
- Newby ZE, O'Connell J 3rd, Robles-Colmenares Y, Khademi S, Miercke LJ, Stroud RM. Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Struct Mol Biol.* 2008; 15: 619–625.
- Noyes H. Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998; 93: 657–661.
- Ohta T. Synonymous and nonsynonymous substitutions in mammalian genes and the nearly neutral theory. *J Mol Evol.* 1995; 40(1): 56-63.

- Oliveira CD, Morais MH, Machado-Coelho GL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cad Saude Publica*. 2008; 24(12): 2953-8.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57: 651–655.
- 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.
- Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 64: 187–93.
- Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. 2008; 26(14): 1709-24.
- Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Olivier M, Ouellette M. Gene disruption of the P-glycoprotein related gene pgpa of *Leishmania tarentolae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 224(3): 772-8.
- Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Ouellette M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene ltpgpA to oxyanion resistance. *J Biol Chem*. 1994; 269: 11980–11986.
- 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, Rabinowitsch 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: 839–847.
- Pérez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol*. 2001; 4(3): 159-66.
- Perrotey S, Mahamdallie SS, Pesson B, Richardson KJ, Gallego M, Ready PD. Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. *Parasite*. 2005; 12: 283–291.
- Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE: Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 3018-3022.
- Poinar G Jr., Poinar R. Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp. (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*. 2004; 155: 305–310.
- Poinar JG. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 635–637.
- Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003; 2: 14.
- Posada D. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Mol Biol Evol*. 2002; 19: 708–717.

Rath S, Trivellin A, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal P, Junior HFA, Tempone AG. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado de Arte. *Quim Nova*. 2003; 26: 550–557

Rebrikov DV, Trofimov D. Yu. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2006; 42(5): 520-8.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(9): 581-96.

Restrepo-Pineda E, Arango E, Maestre A, Do Rosário VE, Cravo P. Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to Pfmdr1 and Pfcr. *Parasitology*. 2008; 135(5): 547-53.

Rijal S, Yardley V, Chappuis F, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Boelaert M, De Doncker S, Croft S, Dujardin JC. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome? *Microbes Infect*. 2007; 9(4): 529-35.

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.

Ritz C, Spiess AN. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics*. 2008; 24: 1549-1551.

Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37: 1842–1846.

Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol*. 1999; 85(2): 360-6.

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 ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004; 430: 463–67.

Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human *Leishmania (Viannia)* Infection. *J Infect Dis*. 2006; 193(10): 1375-83.

Rojas W, Caro MA, Lopera JG, Triana O, Dib JC, Bedoya G. Análisis de polimorfismos en los genes tripanotión reductasa y cruzipaina en cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi*. *Biomedica*. 2007; 27 Suppl 1: 50-63.

Romano E. Extração de DNA de tecidos Vegetais. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC, eds. *Manual de Transformação de genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenagen, cap. 11, p. 163-177. 1998.

Romero GA, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO. 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*. 2001a; 65: 456–465.

- Romero GA, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis*. 2001b; 32(9): 1304-12.
- Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO, Shaw JJ. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. *Acta Trop*. 2002; 82(1): 25-9.
- Rosen BP. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002; 133: 689-693.
- Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Bastien P: Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)<sub>n</sub> loci. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65: 271-282.
- Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppié P, Curtet I, Dedet JP, Carme B. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(2): 468-73.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003; 19: 2496-2497.
- Rozas M, De Doncker S, Adai V, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin JC. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis*. 2007; 195(9): 1381-8.
- Salant H, Markovics A, Spira DT, Hamburger J. The development of a molecular approach for coprodiagnosis of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*. 2007; 146(3-4): 214-20.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Santín M, Fayer R. Intragenotypic variations in the *Cryptosporidium* sp. cervine genotype from sheep with implications for public health. *J Parasitol*. 2007; 93(3): 668-72.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*. 2008; 103(1): 1-10.
- Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 42: 51-5.
- Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, Stich RW, Jittapalapong S. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. *J Med Microbiol*. 2007; 56(Pt 8): 1118-21.
- Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59(1): 86-94.
- Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev*. 2006; 86(4): 1179-236.

- Schierup MH, Hein J. Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics*. 2000a; 156: 879–891.
- Schierup MH, Hein J. Recombination and the molecular clock. *Mol Biol Evol*. 2000b; 17: 1578–1579.
- Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, OuaiSSI 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; 42: 3097–3102.
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, OuaiSSI A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2064–2069.
- Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel intracellular Sb(V) reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2001; 276: 3971–6.
- Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965; 52(3, 4): 591–611.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89:471–8.
- Shortt HE. Recent research on kala-azar in India. *Trans Roy Soc Trop M Hyg*. 1945; 39: 13–41.
- Sidhu AB, Valderramos SG, Fidock DA. pfm<sub>1</sub> mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2005; 57(4) :913–26.
- Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002; 9(1): 43–50.
- Simonsen KL, Churchill GA, Aquadro CF. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*. 1995; 141(1): 413–29.
- Simpson L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. *Ann Rev Microbiol*. 1987; 41: 363–380.
- Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res*. 2006; 123(3): 411–22.
- 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; 134(Pt 6): 777–87.
- Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 1173–1186.
- Smith M, Blanchette M, Papadopoulou B. Improving the prediction of mRNA extremities in the parasitic protozoan *Leishmania*. *BMC Bioinformatics*. 2008, 9: 158.



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: 1266–72.

Soto JM, Toledo JT, Gutierrez P, Arboleda M, Nicholls RS, Padilla JR, Berman JD, English CK, Grogl M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 66: 147–151.

Sousa OE, Samudio F, de Juncá C, Calzada JE. Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(4): 455-7.

Steck EA. *Chemotherapy of Protozoan Diseases*. Walter Reed Army Institute of Research, U. S., Government Printing Office: Washington, D. C. 1972.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001; 6: 849–54.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1739–1746.

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: 1104–7.

Sundar S, Murray HW. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ*. 2005; 83(5): 394-5.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007; 24: 1596-1599.

Taylor MC, Kelly JM, Chapman CJ, Fairlamb AH, Miles MA. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 64: 293–301.

Teixeira AC, Paes MG, Guerra J de O, Prata A, Silva-Vergara ML. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008; 50(3): 157-60.

Teshima KM, Coop G, Przeworski M. How reliable are empirical genomic scans for selective sweeps? *Genome Res*. 2006; 16: 702–712.

Thakur CP. Drug resistance in kala-azar: an overview. In: Gupta S, Sood OP, eds. *Proceedings of round table conference series*. N° 5. New Delhi: Ranbaxy Science Foundation; 1999. p. 27–33.

Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sinha GP, Messick C, Olliaro P. Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-II clinical study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94: 432–433.

Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Kumar N, Kumar P, Hassan SM, Narain S, Roy RK. Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998; 92(5): 561-9.

- Tibayrenc M. 1996. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annu Rev Microbiol.* 1996; 50: 401–429.
- Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998; 28(1): 85-104.
- Tibayrenc M. Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 575–580.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(7): 2414-8.
- Torres C, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* 2004; 54: 632–646.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Res.* 2000; 10: 967-981.
- Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. Down regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a transdominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 5311-5316.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson ID. Molecular epidemiology: a multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *Int J Parasitol.* 2005; 35(11-12): 1295-307.
- Tsukayama P, Lucas C, Bacon DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 2009; 39(3): 355-62.
- Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61(1): 23-30.
- 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.
- Uzcategui NL, Zhou Y, Figarella K, Ye J, Mukhopadhyay R, Bhattacharjee H. Alteration in glycerol and metalloid permeability by a single mutation in the extracellular C-loop of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1. *Mol Microbiol.* 2008; 70(6): 1477-86.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman A. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3: RESEARCH0034.
- Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Momen H, Grimaldi G Jr., Alencar JE. Epidemiological studies on American leishmaniasis in Ceara State, Brazil. Molecular characterization of the *Leishmania* isolates. *Ann Trop Med Parasitol.* 1988; 82: 547–554.
- Velmurugan GV, Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol.* 2008; 155(3-4): 314-8.

- Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1220–1223.
- Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA Jr, Daily JP, Sarr O, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Duraisingh MT, Lukens A, Derr A, Stange-Thomann N, Waggoner S, Onofrio R, Ziaugra L, Mauceli E, Gnerre S, Jaffe DB, Zainoun J, Wiegand RC, Birren BW, Hartl DL, Galagan JE, Lander ES, Wirth DF. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2007; 39(1):113-9.
- Wasunna MK, Rashid JR, Mbui J, Kirigi G, Kinoti D, Lodenyo H, Felton JM, Sabin AJ, Albert MJ, Horton J. A phase II dose-rising study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73: 871–876.
- Weina PJ, Neafie RC, Wortmann G, Polhemus M, Aronson NE. Old world leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(11): 1674-80.
- Wellems T, Plowe C. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis.* 2001; 184: 770-776.
- Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pagès M, Jauffret Y, Dedet JP, Bastien P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 1688-1694.
- Worobey M. A novel approach to detecting and measuring recombination: new insights into evolution in viruses, bacteria, and mitochondria. *Mol Biol Evol.* 2001; 18: 1425–1434.
- World Health Organization. *Strategic Direction for Research.* February, p.1-5, 2002.
- 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: 39925–39932.
- Wyllie S, Fairlamb AH. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71: 257–267.
- Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH. Roles of trypanothione S-transferase and trypanothione peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(4):1359-65.
- Xiao S, Knoll AH, Kaufman AJ, Yin L & Zhang Y. Neoproterozoic fossils in Mesoproterozoic rocks? *Precambrian Res.* 1997; 84: 197–220.
- Yan S, Li F, Ding K, Sun H. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. *J Biol Inorg Chem.* 2003a; 8: 689–697.
- Yan S, Wong I L, Chow LM, Sun H. Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation. *Chem Commun (Camb).* 2003b; 2: 266–267.
- Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, Miranda C, Llanos-Cuentas A, Chappuis F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(2): 272-5.

Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adai V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis.* 2006; 194:1168–75.

Yu N, Zhao Z, Fu YX, Sambuughin N, Ramsay M, Jenkins T, Leskinen E, Patthy L, Jorde LB, Kuromori T, Li WH. Global patterns of human DNA sequence variation in a 10-kb region on chromosome 1. *Mol Biol Evol.* 2001; 18(2): 214-22.

Zemanová E, Jirku M, Mauricio IL, Horak A, Miles MA, Lukes J. The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int J Parasitol.* 2007; 37(2): 149-60.

Zhai W, Nielsen R, Slatkin M. An investigation of the statistical power of neutrality tests based on comparative and population genetic data. *Mol Biol Evol.* 2009; 26(2): 273-283.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000; 7(1-2): 203-14.

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: 37445–37451.

Zurita AI, Rodríguez J, Piñero JE, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, Valladares B. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70 (513–663). *J Parasitol.* 2003; 89(2): 372-8.

## 8. ANEXOS

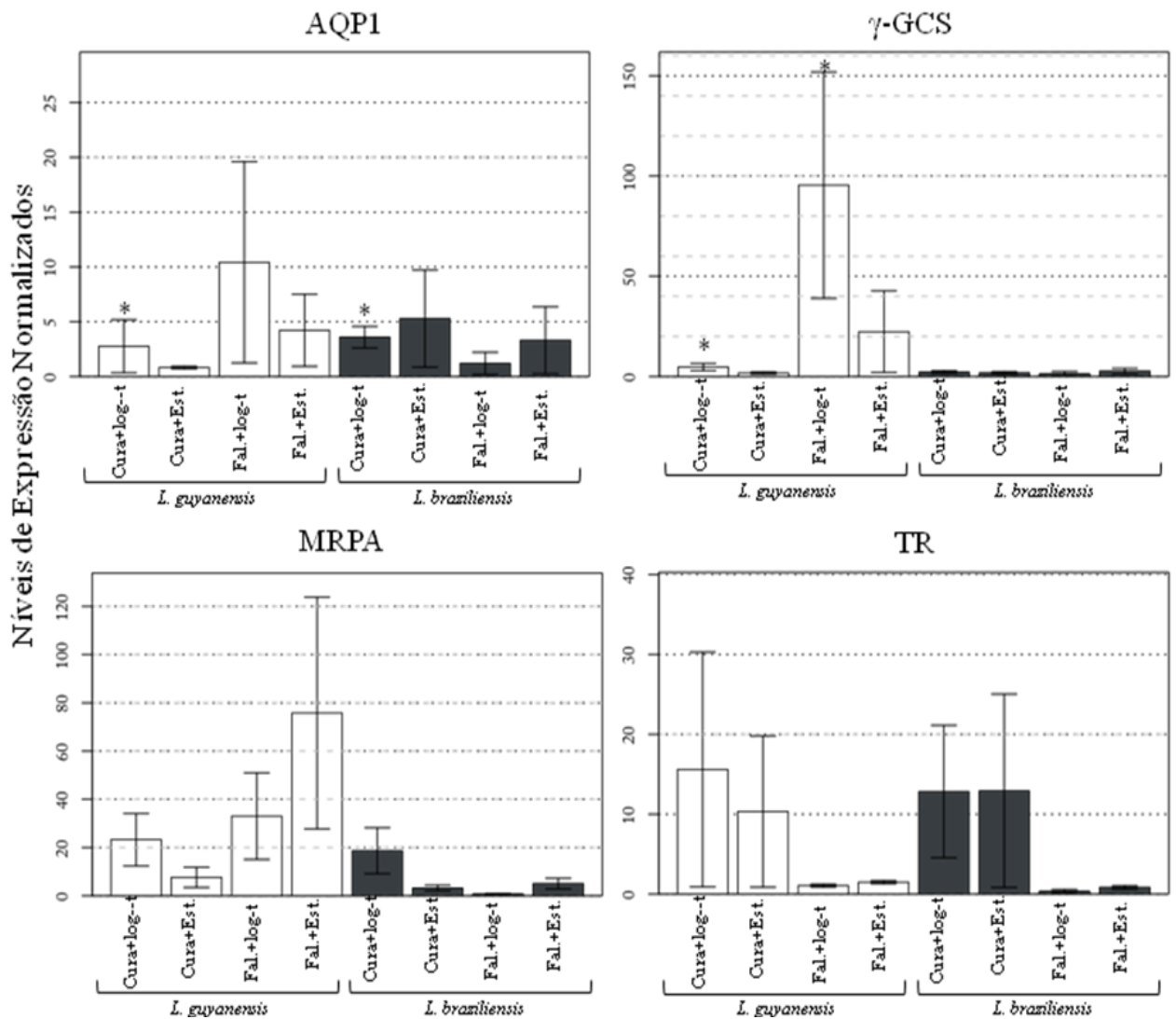


Figura Suplementar 1 – Média dos níveis de expressão normalizados para a interação de segunda ordem (espécie: resposta terapêutica: fase da curva de crescimento) nos quatro genes alvo AQP1,  $\gamma$ -GCS, MRPA e TR. As barras correspondem ao erro padrão. Cura: isolados de cura terapêutica; Fal.: isolados de falha terapêutica; log-t: fase logarítmica tardia da curva de crescimento de promastigotas; Est.: fase estacionária da curva de crescimento de promastigotas. \* Grupos significativamente diferentes entre si dentro de cada gene ( $P < 0,05$ ). Foram utilizados diferentes escalas para cada gene.