

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE TRANSPORTADORES ABC E ANÁLISE
DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE ANTIMÔNIO EM POPULAÇÕES DE
Leishmania spp. DO NOVO MUNDO SENSÍVEIS E RESISTENTES
AO ANTIMONIAL TRIVALENTE**

por

Douglas de Souza Moreira

Belo Horizonte
Fevereiro/2012

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE TRANSPORTADORES ABC E ANÁLISE
DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE ANTIMÔNIO EM POPULAÇÕES DE
Leishmania spp. DO NOVO MUNDO SENSÍVEIS E RESISTENTES
AO ANTIMONIAL TRIVALENTE**

por

Douglas de Souza Moreira

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

Orientação: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Belo Horizonte
Fevereiro/2012

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

M835c Moreira, Douglas de Souza.
2012

Caracterização molecular de transportadores ABC e análise dos níveis intracelulares de antimônio em populações de *Leishmania* spp. do Novo Mundo sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente / Douglas de Souza Moreira. – Belo Horizonte, 2012.

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

Bibliografia: f.: 104 - 134

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

1. Leishmaniose/quimioterapia 2. *Leishmania*/efeitos de drogas 3. Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP/fisiologia I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE TRANSPORTADORES ABC E ANÁLISE
DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE ANTIMÔNIO EM POPULAÇÕES DE
Leishmania spp. DO NOVO MUNDO SENSÍVEIS E RESISTENTES
AO ANTIMONIAL TRIVALENTE**

por

Douglas de Souza Moreira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Presidente)

Dr. Luciano Andrade Moreira

Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Suplente: Dra. Marina de Moraes Mourão

Dissertação defendida e aprovada em: 16/02/2012

"(...) para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer."

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar sempre nas minhas escolhas e por estar ao meu lado, principalmente, nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais por terem me proporcionado o melhor presente no decorrer da minha vida: a EDUCAÇÃO. Vocês sempre serão um exemplo para mim! Agradeço também aos meus irmãos e sobrinha pela compreensão, paciência e apoio. Sei que posso contar com todos vocês quando for necessário.

À Dra. Silvane por ter me orientado durante esses anos. Muito obrigado pela enorme paciência, respeito, dedicação e por todos os ensinamentos nessa etapa. Jamais esquecerei a oportunidade que você me deu. Devo essa conquista a você!

Aos meus colaboradores da UFMG: Frédéric Frézard e Rubens do Monte Neto. Ao Rubens, meu muito obrigado pela eficiência e dedicação nas dosagens das minhas amostras, pelas dicas e pelos ensinamentos durante esse trabalho.

À minha colaboradora e amiga Juvana. Agradeço a você por ter me apresentado à Dra. Silvane, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelas palavras de motivação, conversas, brincadeiras, por sua alegria, pela companhia na bancada, pelos ensinamentos também. Aprendi bastante com você.

Agradeço a todos os integrantes do nosso grupo de pesquisa. Ao Rafael pelas nossas conversas, desabafos e caronas. À Laila, Nayara, Aízis e Joyce por terem me auxiliado em alguns experimentos. Ao Antônio, Fabiana, Ana Paula, Melina e Mariana Eduarda pela convivência, pelos momentos agradáveis, apoio, conversas, brincadeiras, paciência e pela força. Sou grato a todos vocês.

Aos meus amigos por estarem sempre presentes na minha vida. Obrigado pelas palavras de conforto, orações, brincadeiras, conversas, pelos momentos de alegria, diversão e por se lembrarem de mim, mesmo eu estando distante.

À Fernanda, responsável técnica da Plataforma de PCR em Tempo Real, pela prestação de serviços, conversas e dicas.

À Rosana por ter me auxiliado muitas vezes no descarte de resíduos e por procurar reagentes sempre que solicitado.

Agradeço à secretária do LPCM, Mara, pelos serviços prestados.

À Kênia pelos momentos de distração com suas revistas de caça-palavras, pelas conversas e brincadeiras.

À Rosana (limpeza) pelo agradável convívio, mesmo em um curto período de tempo.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, Diretor do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo apoio financeiro e estrutura para a realização deste trabalho.

Aos colegas de disciplinas do curso de pós-graduação, em especial, à Lídia por ter sido uma grande parceira durante essa fase. Aos professores do curso, obrigado pelos momentos de aprendizagem.

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

Aos funcionários do CPqRR que contribuíram de alguma maneira para a realização deste estudo.

À Plataforma de PCR em Tempo Real pelos serviços prestados.

Agradeço a todos que me auxiliaram de alguma forma durante essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTO ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Agradeço ao apoio financeiro das instituições CNPq, FAPEMIG, CPqRR, PDTIS/CPqRR, UNICEF/UNDP/World Bank/WHO/TDR, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Epidemiologia e formas clínicas das leishmanioses.....	22
1.1.1 Epidemiologia	22
1.1.2 Formas clínicas.....	22
1.1.2.1 Leishmaniose cutânea	23
1.1.2.2 Leishmaniose mucocutânea.....	24
1.1.2.3 Leishmaniose visceral	25
1.2 Ciclo biológico do parasito.....	27
1.3 Estrutura e organização genômica de <i>Leishmania</i>	28
1.4 Quimioterapia das leishmanioses.....	31
1.4.1 Antimoniais pentavalentes	32
1.4.2 Anfotericina B	33
1.4.3 Pentamidina	33
1.4.4 Miltefosina.....	34
1.4.5 Paramomicina	35
1.4.6 Sitamaquina	35
1.5 Mecanismo de ação dos antimoniais	36
1.6 Resistência aos antimoniais	38

1.7 Transportadores ABC.....	41
1.7.1 Gene MRPA.....	47
1.7.2 Gene MRP e Pgp.....	50
2 JUSTIFICATIVA.....	52
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo geral	55
3.2 Objetivos específicos	55
4 METODOLOGIA	56
4.1 Amostras de <i>Leishmania</i> spp.	57
4.2 Extração de RNA total	57
4.3 Extração de DNA.....	58
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	58
4.5 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida	59
4.6 Purificação do produto de PCR	60
4.7 Preparação de bactérias eletrocompetentes	60
4.8 Clonagem dos genes MRP, MRPA e SSU	60
4.9 RT-PCR quantitativo em tempo real.....	61
4.10 Southern blot.....	62
4.11 Eletroforese de Pulso Alternado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE) ...	63
4.12 Ensaio para estudo de amplificação extracromossomal.....	64
4.13 Sondas e ensaio de hibridização.....	64
4.14 Extração de proteínas totais.....	65
4.15 Dosagem de proteínas	65
4.16 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	65
4.17 Western blot	66
4.18 Análise densitométrica	67
4.19 Incorporação de Sb	67
4.20 Análise estatística	67

5 RESULTADOS.....	68
5.1 Localização cromossômica do gene MRPA	69
5.2 Amplificação extracromossomal do gene MRPA em <i>Leishmania</i> spp.....	71
5.3 Análise de amplificação do gene MRPA	73
5.4 Nível de mRNA dos genes MRP e MRPA	76
5.5 Nível de expressão da proteína Pgp	82
5.6 Análise do nível intracelular de antimônio	85
5.7 Resultados gerais.....	87
6 DISCUSSÃO	88
7 RESUMO DOS RESULTADOS	100
8 CONCLUSÃO	102
9 REFERÊNCIAS.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas clínicas das leishmanioses: cutânea (A), mucocutânea (B) e visceral (C)	26
Figura 2: Distribuição das leishmanioses cutânea (A) e visceral (B) no Velho Mundo e Novo Mundo.	26
Figura 3: Formas amastigotas infectando um macrófago (A) e promastigotas (B) de <i>L. (L.) amazonensis</i>	27
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	28
Figura 5: Drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses	32
Figura 6: Modo de ação e resistência ao antimônio pentavalente em forma amastigota de <i>Leishmania</i>	38
Figura 7: Diagrama de uma típica proteína transportadora ABC.....	43
Figura 8: Organização esquemática de proteínas ABC em protozoários parasitos .	44
Figura 9: Localização do gene PgpA no círculo H de <i>L. (L.) tarentolae</i>	48
Figura 10: Modelos de resistência à droga.....	51
Figura 11: Localização cromossômica do gene MRPA em diferentes populações sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R) de <i>Leishmania</i>	70
Figura 12: Amplificação extracromossomal em <i>L. (V.) braziliensis</i>	72
Figura 13: Análise de Southern blot do gene MRPA em amostras de <i>Leishmania</i> sensíveis (WTS) e resistentes ao SbIII (Sb-R).....	74

Figura 14: Southern blot do gene MRPA em populações de <i>Leishmania</i> sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R)	75
Figura 15: Amplificação do gene SSU (normalizador) por qPCR em diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	78
Figura 16: Amplificação do gene MRP por qPCR em diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	79
Figura 17: Amplificação do gene MRPA por qPCR em diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	80
Figura 18: Nível de mRNA dos genes MRP e MRPA em espécies de <i>Leishmania</i> sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R).....	81
Figura 19: Nível de expressão da proteína Pgp em <i>Leishmania</i> spp.	84
Figura 20: Níveis de SbIII em formas promastigotas de populações de quatro espécies de <i>Leishmania</i> sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R).....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Espécies de <i>Leishmania</i> encontradas em humanos.....	23
TABELA 2 – Distribuição do número de genes ABC por subfamílias em protozoários parasitos.....	45
TABELA 3 – Espécies utilizadas neste estudo.....	57
TABELA 4 – Iniciadores utilizados neste estudo.....	59
TABELA 5 – Síntese dos resultados encontrados neste estudo.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg – micrograma
µL – microlitro
µM – micromolar
ABC – ATP-binding cassette
ACR2 – antimoniato redutase
AG – adenina-guanina
APS – persulfato de amônio
AQP1 – aquagliceroporina
As – arsênio
AT – adenina-timina
ATP – adenosina trifosfato
BSA – albumina de soro bovino
°C – grau Celsius
CaCl₂ – cloreto de cálcio
CDC – Centro de Controle de Doenças
cDNA – DNA complementar
Ct – *cycle threshold*
Cys – cisteína
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – deoxinucleotídeo trifosfato
DTT – ditioneitol
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EROs – espécies reativas de oxigênio
F – forward (senso)
Fig. – figura
GSH – glutationa
h – hora
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCl – ácido clorídrico
HG – tampão Hepes, NaCl e glicose
HNO₃ – ácido nítrico
IC₅₀ – concentração inibitória de 50%

ICP-MS – espectrometria de massas com fonte de plasma de acoplamento indutivo

IPTG – isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

Kb – kilobases

KCl – cloreto de potássio

KDa – kilodáltons

kDNA – DNA do cinetoplasto

LaSbR – *Leishmania (Leishmania) amazonensis* resistente ao antimonial

LaWTS – *Leishmania (Leishmania) amazonensis* sensível ao antimonial

LB – Luria Bertani

LbSbR – *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistente ao antimonial

LbWTS – *Leishmania (Viannia) braziliensis* sensível ao antimonial

LC – leishmaniose cutânea

LgSbR – *Leishmania (Viannia) guyanensis* resistente ao antimonial

LgWTS – *Leishmania (Viannia) guyanensis* sensível ao antimonial

LicSbR – *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* resistente ao antimonial

LicWTS – *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* sensível ao antimonial

LMC – leishmaniose mucocutânea

LV – leishmaniose visceral

M – molar

MDR – resistência a múltiplas drogas

mg – miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

min – minutos

mL – mililitros

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

MRP – proteína associada à resistência a múltiplas drogas

MS – Ministério da Saúde

N₂ – nitrogênio

Na₂HPO₄ – fosfato de sódio dibásico

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato de sódio monobásico

NaOH – hidróxido de sódio

NBD – domínio de ligação a nucleotídeos

ng – nanograma
nm – nanômetro
O₂⁻ – ânion superóxido
OD – densidade óptica
ODC – ornitina decarboxilase
OH[•] – radical hiroxila
OMS – Organização Mundial da Saúde
pb – pares de bases
PBS – salina tamponada com fosfato
PBS-T – salina tamponada com Tween 20
PCR – reação em cadeia da polimerase
PFGE – eletroforese de pulso alternado
Pgp – fosfoglicoproteína
pH – potencial hidrogeniônico
pmoles – picomoles
Pol II – DNA polimerase II
PSG – tampão fosfato de sódio, cloreto de sódio e glicose
qPCR – PCR quantitativo em tempo real
R – reverse (anti-senso)
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotação por minuto
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase conjugada com a transcriptase reversa
s – segundos
SAG – estibogluconato de sódio
Sb – antimônio
SbIII – antimonial trivalente
Sb-Ts – antimônio-tiol
SbV – antimonial pentavalente
SDS – duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
seg – segundos
SL – *spliced leader* (sequência líder ou miniexon)
SOD – superóxido dismutase
SSC – tampão citrato de sódio

SSU – unidade menor do RNA ribossomal
TBE – tampão tris-borato EDTA, pH 8,0
TDR1 – tiol dependente redutase
TE – tampão tris-HCl e EDTA
TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TMD – domínio transmembrana
Tris – tri-hidroximetil amino metano
TSH – tripanotiona
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFs – Unidades Federadas
V – Volts
WHO – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)
xg – gravidade
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo
 α – alfa
 α [³²P]dCTP – deoxicitidina trifosfato marcado com fósforo radioativo
 β – beta
 γ – gama

RESUMO

Transportadores ABC (ATP-binding cassette) abrangem proteínas transmembrana, que utilizam a energia resultante da hidrólise de ATP, para transportar uma variedade de moléculas através de membranas biológicas, incluindo drogas quimioterapêuticas. Alguns membros dessa superfamília ABC estão associados com quimiorresistência através da superexpressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas (multidrug resistance associated protein – MRP). Uma dessas proteínas é a Pgp (P-glicoproteína), que está relacionada à resistência através da extrusão de compostos tóxicos da célula. O gene MRPA, um transportador da subfamília ABCC, está envolvido na resistência pelo sequestro do conjugado metal-tiol em vesículas próximas da bolsa flagelar da *Leishmania*. Neste estudo, formas promastigotas de populações sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente (SbIII) de quatro espécies de *Leishmania*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, foram analisadas quanto: a localização cromossômica, presença de amplificação extracromossomal e análise da amplificação do gene MRPA; níveis de mRNA dos genes MRPA e MRP; expressão da proteína Pgp e determinação do nível intracelular de SbIII. Ensaio de PFGE indicaram a associação de amplificação cromossomal e extracromossomal do gene MRPA com o fenótipo de resistência à droga nas espécies de *Leishmania* estudadas. Os resultados obtidos através de lise alcalina dos parasitos mostraram a presença de amplificação extracromossomal apenas na amostra resistente de *L. (V.) braziliensis*. Análises de Southern blot com as endonucleases *Bam*HI e *Hind*III indicaram a presença de polimorfismos na sequência do gene MRPA em algumas amostras de *Leishmania* analisadas. Adicionalmente, foi observada amplificação desse gene nas populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII. Ensaio de PCR quantitativo em tempo real mostraram aumento dos níveis de mRNA do gene MRPA nas populações resistentes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, comparado com seus respectivos pares sensíveis. Os níveis de mRNA do gene MRP estão aumentados em todas as populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII analisadas neste estudo. Os resultados de Western blot revelaram que a proteína Pgp está mais expressa nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Os dados obtidos de quantificação dos níveis intracelulares de SbIII por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite mostraram uma redução no acúmulo de SbIII, nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, quando comparadas às respectivas populações sensíveis. Nossos resultados indicam que os mecanismos de resistência ao antimônio são diferentes entre as espécies de *Leishmania* analisadas.

ABSTRACT

ATP-binding cassette (ABC) transporters comprise transmembrane proteins that use energy from ATP hydrolysis to transport a variety of molecules across biological membranes, including chemotherapeutic drugs. Some members of this ABC superfamily are associated with chemoresistance by overexpression of multidrug resistance associated proteins (MRP). One of these proteins is the Pgp (P-glycoprotein), which is associated with resistance by extruding toxic compounds outside the cell. The MRPA gene, a transporter of ABCC subfamily, is involved in the resistance by sequestering metal-thiol conjugate in vesicles close to the flagellar pocket of *Leishmania* parasite. In this study, promastigote forms of susceptible and trivalent antimony (SbIII)-resistant populations of four *Leishmania* species, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum chagasi*, were analyzed for: chromosomal location, presence of extrachromosomal amplification and analysis of amplification of the MRPA gene; the mRNA levels of MRPA and MRP genes; Pgp protein expression and determination of intracellular SbIII level. PFGE analysis indicated the association of chromosomal and extrachromosomal amplification of MRPA gene with SbIII-resistance phenotype in *Leishmania* species studied. The results obtained by alkaline lysis of these *Leishmania* samples showed the presence of extrachromosomal amplification only in the SbIII-resistant *L. (V.) braziliensis* population. Southern blot analysis with the endonucleases *Bam*HI and *Hind*III indicated the presence of polymorphisms in the sequence of MRPA gene in some *Leishmania* samples analyzed. Additionally, we observed amplification of this gene in all SbIII-resistant *Leishmania* populations analyzed. Real-time quantitative RT-PCR assays showed increased levels of mRNA MRPA gene in SbIII-resistant populations of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* compared to their respective susceptible counterparts. The levels of mRNA MRP gene are increased in all SbIII-resistant *Leishmania* populations analyzed in this study. Western blot analysis revealed that Pgp protein is more expressed in SbIII-resistant *L. (V.) guyanensis* and *L. (L.) amazonensis* populations. The intracellular level of SbIII quantified by graphite furnace atomic absorption spectrometry showed a reduction in the accumulation of Sb in SbIII-resistant *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* populations when compared to their respective susceptible populations. Our results indicate that the mechanisms of antimony-resistance are different between species of *Leishmania* analyzed.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e formas clínicas das leishmanioses

1.1.1 Epidemiologia

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida; Família Trypanosomatidae). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), elas são doenças classificadas como negligenciadas e representam um grande problema de saúde pública em diversos países do mundo. Os protozoários dessa família são organismos unicelulares flagelados, cuja característica principal é a presença do cinetoplasto, organela próxima à base do flagelo que contém sequências repetidas de DNA (kDNA) (Balaña-Fouce *et al.*, 1998).

As leishmanioses apresentam alta morbidade e mortalidade em vários países do mundo (WHO, 2011). De acordo com a OMS, as leishmanioses estão entre as seis maiores doenças tropicais nos países em desenvolvimento, sendo endêmicas em 88 países (66 no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo) e de notificação obrigatória em apenas 32 países (Desjeux, 2004). Elas acometem principalmente o norte da África, Ásia, Mediterrâneo e América Latina (Ashford, 1992; Desjeux, 1996). Estima-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados com *Leishmania* (Desjeux, 1996) e que cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão da doença tanto no Novo quanto no Velho Mundo (Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005). A incidência anual dessa doença é de dois milhões de casos, com estimativa de 70.000 mortes (Murray *et al.*, 2005). No Brasil, foram notificados, no período de 1990 a 2007, 561.673 casos de leishmanioses (Brasil, s.d.).

1.1.2 Formas clínicas

Várias espécies de *Leishmania* são patógenos humanos (Tabela 1) e responsáveis por uma das três formas clínicas da doença, que inclui cutânea, mucocutânea e visceral (Ouellette *et al.*, 2004). Essas manifestações clínicas abrangem uma diversidade de sinais, sintomas e graus de virulência, e dependem das espécies de parasitos, fatores genéticos e resposta imune do hospedeiro (Herwaldt 1999; Murray *et al.*, 2005; Reithinger, 2007).

TABELA 1 – Espécies de *Leishmania* encontradas em humanos

Subgênero	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	<i>Viannia</i>	<i>Viannia</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
	<i>L. chagasi</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. pifanoi</i> ^a	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. garnhami</i> ^a	<i>L. lainsoni</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b	
Tropismo principal	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

^a Status das espécies em discussão.

^b Posição taxonômica em discussão.

Fonte: WHO, 2010.

1.1.2.1 Leishmaniose cutânea

Diversas espécies de *Leishmania* podem causar leishmaniose cutânea (LC) em crianças e adultos, principalmente *L. (Leishmania) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* (Velho Mundo); *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (região do Mediterrâneo e mar Cáspio); *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) guyanensis* (Novo Mundo). LC é a forma mais comum da doença e abrange uma diversidade de manifestações clínicas. A infecção cutânea pode permanecer subclínica ou tornar-se clinicamente aparente, após variável período de incubação, que dura em média várias semanas. Inicialmente, uma pápula é formada no local da picada pelo flebotomíneo, desenvolve-se um nódulo e, geralmente, úlceras são produzidas após 1-3 meses, nas partes expostas do corpo, como face, braços e pernas (Fig. 1A) (Dowlati, 1996; Machado *et al.*, 2002; Magill, 2005). No Velho Mundo, podem ser desenvolvidas lesões planas, hiperqueratósicas ou semelhantes a verrugas. Entretanto, a maioria das lesões são pápulas, nódulos ou nódulo-úlceras (Dowlati, 1996), enquanto lesões

ulcerativas são mais comuns no Novo Mundo (Palacios *et al.*, 2001). Os indivíduos podem ter mais de uma lesão primária, lesões satélites, linfagite nodular (comum em infecções causadas por *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*), adenopatia regional (infecção por *L. (V.) braziliensis*), lesões com prurido, dor e desenvolver infecção bacteriana secundária (Herwaldt, 1999). A infecção por espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, como *L. (L.) major* ou *L. (L.) tropica*, ou espécies do Novo Mundo como *L. (L.) mexicana*, podem causar lesões cutâneas localizadas que, geralmente, podem evoluir para cura espontânea, resultando em imunidade ao longo da vida (Desjeux, 1996). Na LC Americana, muitas lesões podem curar espontaneamente formando um novo epitélio após alguns meses. Neste caso, origina cicatrizes típicas com o centro despigmentado e borda pigmentada com afinamento da pele (Reithinger, 2007). Determinantes da história natural e patogenicidade da LC não são totalmente compreendidos, mas inclui fatores relacionados ao comportamento do vetor, a virulência do parasito, a imunidade inata e adquirida do hospedeiro (Herwaldt *et al.*, 1992; Weigle e Saravia, 1996).

Dados da OMS indicam uma incidência mundial de LC de 1,5 milhão de casos por ano, sendo que 90% ocorrem no Afeganistão, Brasil, Peru, Arábia Saudita, Irã e Síria (Fig. 2A) (Richens, 2004). No Brasil, LC é um importante problema de saúde pública, com mais de 20.000 casos relatados anualmente ao Ministério da Saúde (Brasil, 1997), e seis espécies de *Leishmania* causam a doença, sendo *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* com maior prevalência (Lainson e Shaw, 1987; Grimaldi *et al.*, 1989; Shaw, 1994). Ao analisar a evolução dessa forma de leishmaniose no Brasil, observa-se uma expansão geográfica. No início da década de 80, foram registrados casos autóctones em 19 Unidades Federadas (UFs) e, no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todas as UF's do país. A região Norte apresenta a maior proporção de casos da doença (cerca de 37%). De 2006 a 2009, Minas Gerais apresentou 5.338 casos de LC Americana, com 164 casos (3%) ocorrendo em Belo Horizonte (Brasil, s.d.).

1.1.2.2 Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é uma forma crônica da doença (Amato, 2007). LC e LMC causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* são consideradas um importante problema de saúde em países da América Latina, como

Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela e Guatemala (Herwaldt, 1999; WHO, 2001). Essa forma da doença é ocasionalmente relatada fora da América Latina, adquirida por viajantes (Osman *et al.*, 2000; Aliaga *et al.*, 2003; Ahluwalia, 2004). Apesar dos fatores de risco para LMC serem pouco compreendidos, eles incluem: sexo masculino, idade, tempo da doença, estado nutricional, local das lesões na pele, doenças concomitantes, falta de tratamento da LC adquirida anteriormente (Passos, 2001; Machado-Coelho, 2005) e características genéticas, como a presença de alelos que codificam fatores de necrose tumoral α e β (Cabrera *et al.*, 1995). A forma mucocutânea começa com uma inflamação nasal típica, seguida de ulceração da mucosa e perfuração do septo nasal (Fig. 1B). Em alguns casos, os lábios, bochechas, palato mole, faringe, laringe, cavidades e tecidos circundantes também são afetados. LMC nunca cicatriza espontaneamente e infecções bacterianas secundárias são comuns (Reithinger, 2007). Se não tratada, a doença pode causar danos graves e desfiguração e, em alguns casos, levar a óbito (Vélez, 1997; Reithinger, 2007). Além disso, tentativa de suicídio pode ocorrer devido ao estigma social associado à doença (González *et al.*, 2009). Em algumas áreas da América do Sul, LMC representa aproximadamente 12,5% dos casos relatados de LC Americana (Davies, 2000).

1.1.2.3 Leishmaniose visceral

Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é causada por *L. (L.) donovani* no subcontinente indiano, Ásia e África, por *L. (L.) infantum* ou *L. (L.) chagasi* na região Mediterrânea, Sudoeste e Ásia Central, e por *L. (L.) infantum chagasi* na América do Sul (Desjeux, 2001; Guerin *et al.* 2002; Desjeux, 2004). A infecção pode ser assintomática ou subclínica em muitos casos, ou atingir um curso subagudo, agudo ou crônico. As manifestações clínicas da LV (Fig. 1C) podem ser caracterizadas por febre irregular, suor, fraqueza, palidez, anorexia, substancial perda de peso e hepatoesplenomegalia, com progresso ao longo de semanas a meses. Anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia também são características. A LV pode produzir profunda caquexia e sangramentos, causar imunossupressão do hospedeiro, tornando-o susceptível a infecções secundárias e pode ser letal, se não for tratada (Davidson, 1998; Osman *et al.*, 2000; Collin *et al.*, 2004; WHO, 2011). Crianças podem desenvolver diarreia e retardo do crescimento.

No Brasil, a infecção pode ser assintomática, podendo ocorrer melhora espontaneamente ou evoluir para calazar (Badaro *et al.*, 1986; Gama *et al.*, 2004).

A incidência mundial de LV é de 0,5 milhão de casos por ano, sendo que 90% ocorrem na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (Fig. 2B) (Desjeux, 1992; Bora, 1999; Desjeux, 2004). No Brasil, no período entre 2003 e 2009, foram registrados 34.583 casos de LV no país. Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Atualmente, está distribuída em 21 UFs, atingindo as cinco regiões brasileiras, sendo mais frequente no sexo masculino (63,9%) e em crianças menores de 10 anos (48,9%) (Brasil, s.d.).



Figura 1: Formas clínicas das leishmanioses: cutânea (A), mucocutânea (B) e visceral (C) (Herwaldt, 1999; Murray *et al.*, 2005).

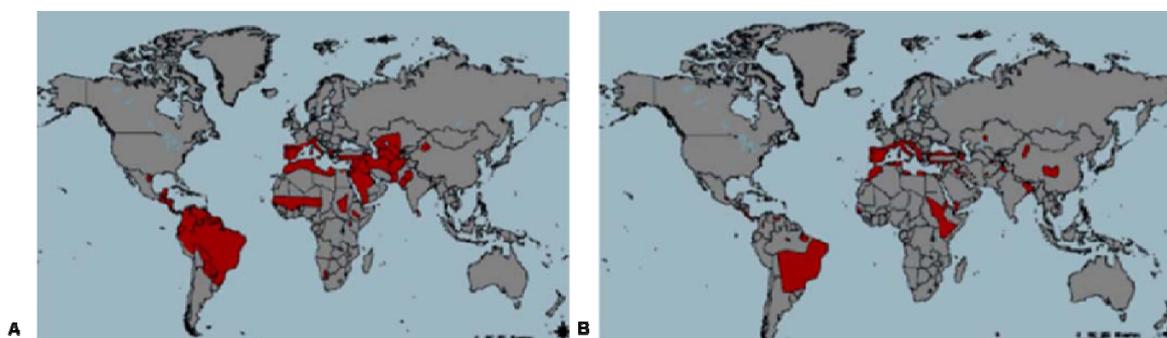


Figura 2: Distribuição das leishmanioses cutânea (A) e visceral (B) no Velho Mundo e Novo Mundo. As áreas afetadas estão marcadas em vermelho, segundo a OMS (Santos *et al.*, 2008).

1.2 Ciclo biológico do parasito

O gênero *Leishmania* possui ciclo biológico heteroxênico, cujas formas de desenvolvimento alternam-se entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores, que transmitem o parasito durante o repasto sanguíneo (Killick-Kendrick, 1979; Sacks e Perkins, 1984). Os hospedeiros invertebrados são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, representados pelos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Bates, 1994).

Todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente similares e mostram dois principais estágios de desenvolvimento através de seu ciclo de vida. Formas amastigotas (Fig. 3A) se multiplicam em células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado, e formas promastigotas (Fig. 3B) que replicam no intestino de um flebotomíneo (Killick-Kendrick e Molineux, 1981).

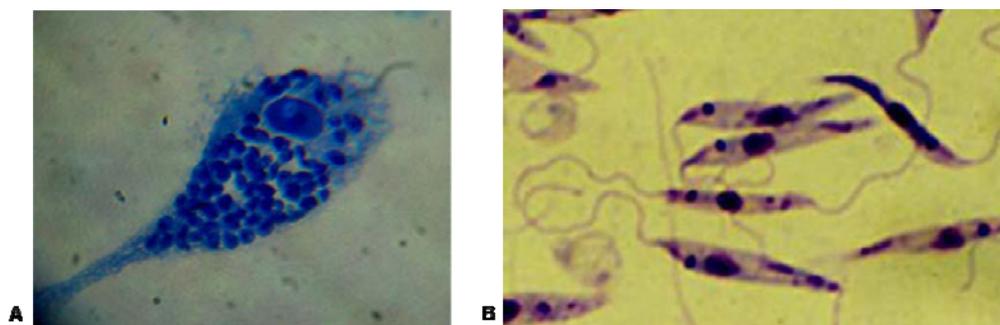


Figura 3: Formas amastigotas infectando um macrófago (A) e promastigotas (B) de *L. (L.) amazonensis* (Santos *et al.*, 2008).

O ciclo de vida do parasito inicia-se quando o hospedeiro vertebrado é picado por um flebotomíneo infectado, que ao realizar o repasto sanguíneo libera as formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva. A saliva do inseto contém fatores químicos que potencializam o poder infectivo do parasito e exercem um efeito quimiotático sobre células do sistema mononuclear fagocitário, as quais são atraídas para o local de inoculação. Os parasitos são então fagocitados por essas células. No interior destas células, no vacúolo parasitóforo, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento da célula, ocorrendo a liberação das formas amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em

um processo contínuo. Para espécies dermatrópicas de *Leishmania*, a lesão permanece na pele, mas para *Leishmania* viscerotrópica, o parasito se dissemina a partir do sítio da infecção inicial da pele para o fígado, baço e medula óssea. Quando um novo flebotomíneo pica um hospedeiro vertebrado infectado, ele ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo do inseto, ocorre o rompimento dos macrófagos e a liberação dos parasitos que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas que se reproduzem por divisão binária. Posteriormente, as formas promastigotas colonizam o esôfago e a faringe do vetor e se diferenciam em formas infectantes, prontas para serem reinoculadas em um hospedeiro vertebrado (Fig. 4) (Ponte-Sucre, 2003; CDC, 2010).

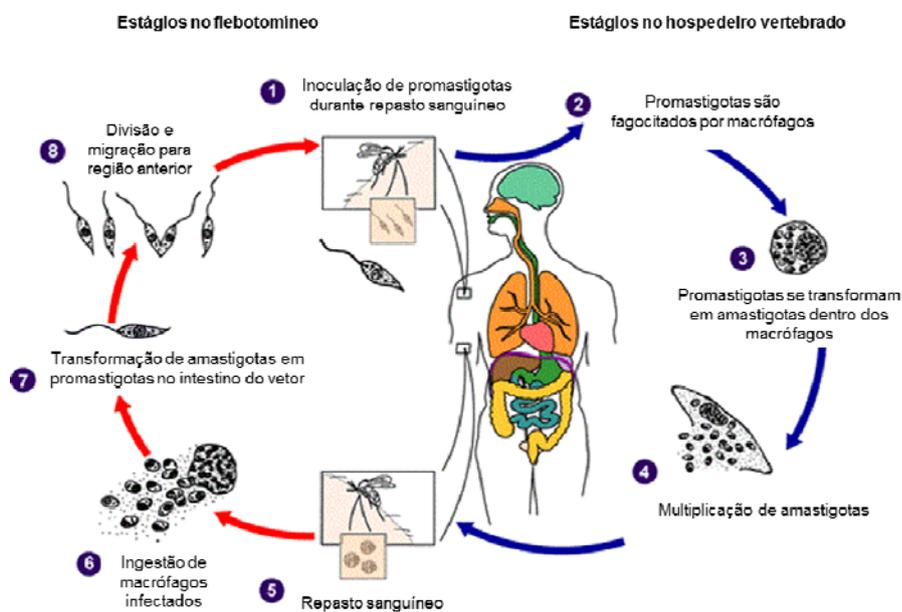


Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania* (Adaptado de CDC, 2010).

1.3 Estrutura e organização genômica de *Leishmania*

Leishmania apresenta peculiaridades moleculares que a diferencia de outros organismos eucariotos. A característica mais marcante da família Trypanosomatidae é a presença de uma só mitocôndria na qual está situado o cinetoplasto, uma organela especializada que contém o DNA mitocondrial ou do cinetoplasto, também conhecido como kDNA (kinetoplast DNA). Este DNA mitocondrial é formado por maxicírculos e minicírculos que se unem para formar uma rede gigante de DNA, que

representa 10-15% do DNA total do parasito. Nos maxicírculos, se encontra o DNA que codifica RNAs ribossomais e transportadores, enquanto os minicírculos contêm os RNAs guia (Simpson, 1987; Shapiro e Englund, 1995; Morris *et al.*, 2001).

Apresentam transcrição policistrônica, gerando RNAs imaturos que contêm mais de um gene, como ocorre em organismos procariotos (González *et al.*, 1985; Muhich e Boothroyd, 1988). A maturação do mRNA ocorre através de um processo de *transplicing*, de modo que na região 5' dos RNAs codificantes é adicionada uma sequência de 39 nucleotídeos denominada miniexon ou *spliced leader* (SL), e na região 3' uma cauda de poliadenilação, mediante um mecanismo em que ambos processos parecem estar acoplados (Borst, 1986; LeBowitz *et al.*, 1993). A região intergênica 5' possui um sítio AG que atua como receptor do SL. Além disso, a região 3' de cada mRNA está poliadenilada a uma distância entre 100 e 400 nucleotídeos acima dos sinais para o *transplicing* do miniexon do gene seguinte (Papadopoulou, 2003). Dessa maneira, formam-se unidades de tradução monocistrônicas, compostas pelo miniexon, gene e cauda de poliadenilação. Essa estrutura *cap* ou miniexon protege o mRNA da ação de nucleases, prolongando sua vida média, além de assegurar a tradução, porque faz do mRNA uma estrutura reconhecida pelos ribossomos.

Em *Leishmania*, não foi identificado nenhum promotor específico para DNA polimerase (Pol II) e a transcrição de genes a partir de vetores não requer esse promotor (Kapler, 1990; Kelly *et al.*, 1992; Freedman e Beverley, 1993; Kelly, 1995). Quase todos os genes de tripanosomatídeos não possuem íntrons, mas dependem da presença das regiões intergênicas para a expressão de genes, o que sugere que estas podem conter os sinais necessários para a transcrição e maturação do mRNA (Papadopoulou, 2003). Assim, para a expressão transitória de genes em *Leishmania* se utilizam vetores de expressão circulares que contenham a sequência de um gene repórter flanqueado por regiões intergênicas do parasito.

A edição de RNA mitocondrial ou RNA *editing* consiste na inserção e eliminação de uracila em RNAs sem sentido genético com a finalidade de obter mensageiros com sentido (Stuart e Panigrahi, 2002). Um complexo de moléculas de RNA e proteínas, auxiliado pelos RNAs guia, está envolvido no mecanismo de transcrição. Foram isolados da mitocôndria de tripanosomatídeos numerosos fatores, que formam complexos que interagem dinamicamente durante o processo de edição (Simpson *et al.*, 2003). Os RNAs que são editados estão codificados no

DNA dos maxicírculos do cinetoplasto, enquanto os RNAs guia se localizam, na sua maioria, no DNA dos minicírculos (Shapiro e Englund, 1995). Outra característica peculiar é a ausência visível de condensação cromossômica em todo seu ciclo de vida (Vickerman e Preston, 1970). Além disso, esses organismos se caracterizam por sua grande plasticidade cromossômica, apresentam diploidia para a maioria dos genes e aneuploidia para outros (Lighthall e Giannini, 1992).

Sequenciamento dos genomas de três protozoários da Ordem Kinetoplastida (*L. (L.) major*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*) mostrou alta preservação da sintonia dos genes na evolução desses parasitos. Há cerca de 6.200 genes conservados na família Trypanosomatidae e mais de 1.000 genes específicos de *Leishmania*, muitos dos quais ainda não foram caracterizados. A arquitetura dos cromossomos de *Leishmania* difere de outras espécies de tripanosomatídeos pela ausência de regiões subteloômicas extensas, nas quais há genes espécie-específicos (Peacock *et al.*, 2007).

Apesar de uma divergência de aproximadamente 46 milhões de anos, a análise comparativa do genoma de três espécies de *Leishmania*, *L. (L.) major* (cepa Friedlin), *L. (L.) infantum* (cepa JPCM5) e *L. (V.) braziliensis* (cepa M2904), mostrou um alto grau de conservação da sintonia dos genes e pequeno número de genes espécie-específicos desses parasitos (Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007; Lukes *et al.*, 2007). A análise comparativa destes três genomas (Peacock *et al.*, 2007) mostrou que aproximadamente 200 genes (pseudogenes) são diferentes, incluindo 78 genes que foram restritos a uma única espécie. Segundo os autores, o pequeno número de genes diferentes entre as três espécies pode ser compensado por um maior controle pós-transcricional (Peacock *et al.*, 2007). A maioria desses genes espécie-específicos codifica proteínas de funções desconhecidas e tem sido proposto que contribuem para o tropismo do parasito e estejam associados com as diferentes formas de leishmanioses (Peacock *et al.*, 2007, Smith *et al.*, 2007). Vários genes específicos de *L. (L.) donovani* foram expressos em *L. (L.) major* e mostraram aumento significativo da sobrevivência do parasito em vísceras de camundongos, indicando que genes individuais podem contribuir para o tropismo no hospedeiro (Zhang *et al.*, 2008; Zhang e Matlashewski, 2010). Dessa maneira, foi observado que a sintonia está conservada em mais de 99% dos genes preditos nesses genomas; as sequências de aminoácidos têm em média 77 a 92% de identidade, e as sequências de nucleotídeos, 81 a 94%.

O número de cromossomos é de 36 em *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* e 35 em *L. (V.) braziliensis*, como resultado da fusão dos cromossomos 20 e 34 (Britto *et al.*, 1998; Peacock *et al.*, 2007). O genoma de *L. (L.) mexicana* apresenta 34 cromossomos, com dois eventos de fusão ocorridos entre os cromossomos 8 e 29, e entre os cromossomos 20 e 36 (Britto *et al.*, 1998). Recentemente, os genomas de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) tarentolae* foram sequenciados. Rogers *et al.* (2011) encontraram dois genes únicos presentes no genoma de *L. (L.) mexicana* (cepa U1103), os quais codificam proteínas de função desconhecida. Além disso, esses autores relataram a presença de grupos ortólogos dessa espécie mais em comum com *L. (L.) infantum* do que qualquer outra espécie de *Leishmania*. Raymond *et al.* (2011) encontraram um limitado número de regiões cromossômicas divergentes entre as espécies *L. (L.) tarentolae* e *L. (L.) infantum* e um compartilhamento do conteúdo gênico maior que 90% de *L. (L.) tarentolae* com outras espécies de *Leishmania*. Esses autores também identificaram 95 sequências codificantes que são únicas em *L. (L.) tarentolae* e 250 genes que estavam ausentes nessa espécie.

1.4 Quimioterapia das leishmanioses

Apesar do considerável progresso nos estudos de bioquímica, fisiologia e biologia molecular de *Leishmania*, a ausência de vacinas e programas eficazes de controle vetorial, faz com que a quimioterapia seja uma das principais ferramentas para o controle das leishmanioses. Entretanto, ela apresenta problemas devido à toxicidade, alto custo e presença de parasitos resistentes às drogas. Dessa maneira, para interferir com o desenvolvimento normal de um parasito intracelular, uma droga deve alcançar o compartimento onde o parasito vive e causar a sua morte diretamente ou através de vários mecanismos de morte celular dirigidos pela droga ativa na célula hospedeira (Ponte-Sucre, 2003). A figura 5 mostra algumas drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses.

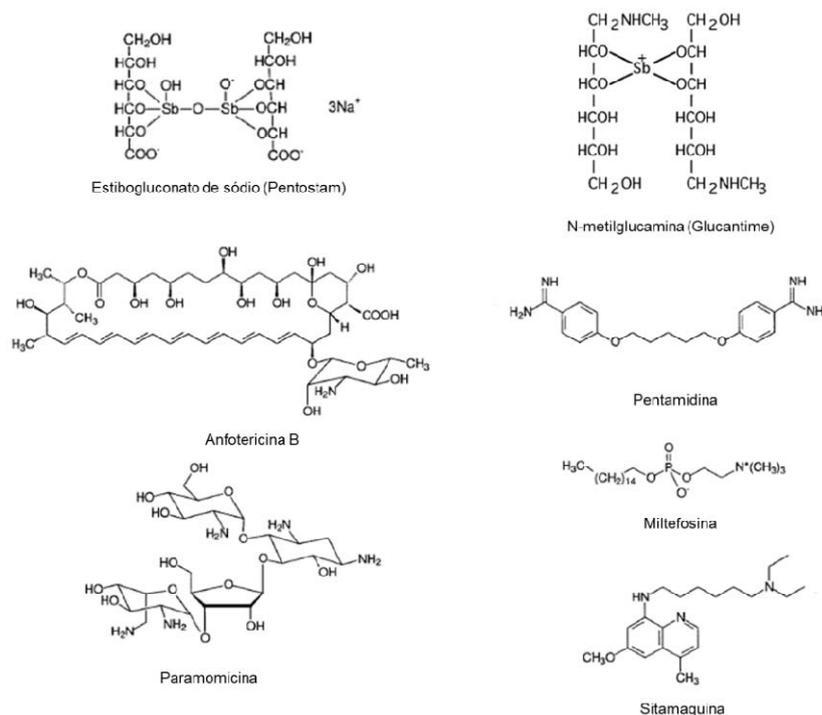


Figura 5: Drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses (Croft *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008).

1.4.1 Antimoniais pentavalentes

O tratamento de primeira escolha para todas as formas de leishmanioses é a administração de compostos contendo antimônio pentavalente: estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) ou N-metilglucamina (Glucantime[®]) (Ouellette *et al.*, 1998b). O sal orgânico de antimônio pentavalente (SbV) tem sido a droga de escolha para o tratamento das leishmanioses por mais de 60 anos em vários países (Herwaldt, 1999). Variações na resposta clínica aos antimoniais pentavalentes em LV, LC e LMC têm sido um problema persistente no tratamento das leishmanioses nos últimos 50 anos. Uma explicação para esse fenômeno é a diferença intrínseca na sensibilidade das espécies de *Leishmania* a essas drogas (Croft *et al.*, 2006). Estudos usando o modelo macrófago-amastigota, mostraram que *L. (L.) donovani* e *L. (V.) braziliensis* foram três a cinco vezes mais sensíveis ao estibogluconato de sódio do que *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) mexicana* (Berman, 1981; Allen e Neal, 1989; Neal *et al.*, 1995). Isso também foi demonstrado em estudos anteriores por Berman e colaboradores, utilizando outro modelo macrófago-amastigota, no qual

houve ampla variação na sensibilidade a antimoniais pentavalentes em isolados de LC (Berman *et al.*, 1982).

1.4.2 Anfotericina B

Anfotericina B é um antibiótico polieno que tem sido usado como droga de segunda escolha no tratamento das leishmanioses, desde os anos 1960. Esse composto tem ação seletiva contra fungo, bem como em *Leishmania*. A seletividade é devido a maior afinidade da anfotericina B ao ergosterol, o principal esterol da membrana celular desse parasito. Vários estudos confirmaram que a atividade leishmanicida dessa droga causa a formação de poros na membrana que alteram a permeabilidade a íons, que por sua vez, promovem sua desorganização e despolarização (Ramos *et al.*, 1994; Azas *et al.*, 2001). Diferenças de sensibilidade das espécies de *Leishmania* são esperadas devido à variação no tipo e quantidade de esteróis nas membranas de diferentes espécies (Beach *et al.*, 1988). Em áreas onde há altos níveis de resistência ao antimônio pentavalente, anfotericina B é a droga de escolha e resistência a ela parece não emergir rapidamente. Embora seja muito eficaz, essa droga é tóxica e está associada a efeitos colaterais graves, limitando o uso desse composto (Mishra *et al.*, 1992). Recentes formulações lipídicas dessa droga retêm sua atividade antifúngica, enquanto diminui drasticamente sua toxicidade. Uma situação paralela é observada quando usada para tratar *Leishmania*, em que várias formulações lipídicas da droga foram altamente ativas e associadas com baixa toxicidade (Sundar *et al.*, 2000; Sundar *et al.*, 2004). Em LV, anfotericina B lipossomal tem efetividade maior que 95%, entretanto, seu alto custo a torna inacessível em países endêmicos (Zilberstein e Ephros, 2002).

1.4.3 Pentamidina

Pentamidina tem sido usada no tratamento de leishmanioses há mais de 40 anos. Atualmente, é também considerada uma droga de segunda escolha para casos que não respondem ao antimônio, em LV e LC (Becker *et al.*, 1999; Sereno *et al.*, 2001a). A pentamidina, uma diamidina aromática, entra em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* através de processo mediado por

transportador, pelo qual diamidinas de alta afinidade são reconhecidas (Basselin *et al.*, 2002). A mitocôndria é um importante alvo da pentamidina e essa droga está envolvida na ligação e desintegração de DNA do cinetoplasto (Basselin *et al.*, 2002; Croft e Coombs, 2003; Croft *et al.*, 2006). Topoisomerasas são enzimas envolvidas na modulação do DNA nuclear e do cinetoplasto (kDNA) (Cheesman, 2000) e pentamidina age provavelmente como um inibidor de topoisomerase I (Jean-Moreno *et al.*, 2006). Em parasitos resistentes à pentamidina, alterações foram observadas na sequência de minicírculos de kDNA, especialmente em regiões ricas em AT, conhecidas por serem os sítios de ligação da droga (Basselin *et al.*, 1998). Resistência à pentamidina tem sido produzida em laboratório para *L. (L.) donovani* e *L. (L.) amazonensis*, e apesar dessa droga ter sido amplamente abandonada na Índia, a pentamidina continua sendo usada sozinha ou em combinação com outras drogas em outros países (Basselin *et al.*, 1997; Nacher *et al.*, 2001). Na Índia, a eficácia da droga tem diminuído rapidamente, sugerindo que parasitos têm se tornado resistentes (Sundar, 2001). Além disso, a considerável toxicidade associada à pentamidina (hipotensão, hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade) tem restringido seu uso.

1.4.4 Miltefosina

Miltefosina (hexadecilfosfocolina), originalmente desenvolvida como um agente neoplásico, tem sido aprovada como a primeira droga oral para leishmanioses. Ela pode ser usada em pacientes que respondem ou não ao antimônio (Sundar *et al.*, 1999). Apesar de mostrar boa eficácia em países do Velho Mundo, miltefosina é muito cara e tem uma longa vida no organismo (Sundar e Murray, 2005). A droga mostrou ser ativa contra *L. (L.) donovani in vitro* (Croft *et al.*, 1987). Em alguns estudos, foi demonstrado que essa droga apresentou um índice terapêutico favorável para LV na Índia (taxas de cura maiores que 95%) e LC no Paquistão (taxas de cura comparáveis com antimônio pentavalente), e está sendo submetida em ensaios clínicos para uso em vários outros países (Soto *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2006; Simeen *et al.*, 2007). Um ensaio clínico de fase III em adultos mostrou que, por via oral, miltefosina foi altamente ativa contra LV (Sundar *et al.*, 2002) e isso deve ser considerado um dos principais avanços na quimioterapia anti-*Leishmania*. Foi demonstrado ter atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*,

provavelmente através de efeitos sobre vias de células sinalizadoras e de síntese de membrana (Croft *et al.*, 1987; Kuhlencord *et al.* 1992). Entretanto, Morais-Teixeira *et al.* (2011) mostraram que miltefosina apresentou menor atividade em espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, quando comparado com *L. (L.) donovani*. O modo de ação de miltefosina não é conhecido com precisão, mas acredita-se que ele está associado com mudanças no metabolismo de lipídeos alquila e biossíntese de fosfolipídeos (Lux *et al.*, 2000). No estágio promastigota, foi observado que essa droga poderia induzir o processo de morte celular por apoptose (Paris *et al.*, 2004).

1.4.5 Paramomicina

Paramomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, tem sido utilizada no tratamento de LV em ensaios clínicos de fase III (formulação parenteral) e LC (formulações tópica e parenteral) (Croft *et al.*, 2006). Em ambos os modelos experimentais e casos clínicos de LC, lesões causadas por *L. (L.) major* tratadas com pomada de paramomicina melhoraram rápida e completamente do que lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) panamensis* (el-On e Hamburger, 1987). Uma análise *in vitro* sobre a sensibilidade de amastigotas, em um modelo macrófago murino, mostrou que isolados de *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* foram mais sensíveis do que isolados de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* (Neal *et al.*, 1995). Essa droga age na síntese de RNA e modifica lipídeos polares da membrana, afetando, assim, a fluidez da membrana e alterando sua permeabilidade (Maarouf *et al.*, 1997). Resistência à paramomicina foi descrita *in vitro* para cepas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) tropica* (Fong *et al.*, 1994; Maarouf *et al.*, 1998).

1.4.6 Sitamaquina

Sitamaquina, uma lepidina conhecida anteriormente como WR6026, está em ensaios clínicos de fase II para o tratamento de LV (Croft *et al.*, 2006). A droga apresenta grande atividade contra protozoários (Yeates, 2002), mas apresenta uso clínico limitado e sem relato de resistência. Sitamaquina foi 200 vezes mais ativa do que primaquina contra *L. (L.) donovani* em hamsters, mas apresenta apenas duas vezes maior resistência em ensaios *in vitro* (Kinnamon *et al.*, 1978). Esse composto é biotransformado em dois metabólitos polares por microssomas, que podem ter um

papel na eficácia *in vivo* da droga (Theoharides *et al.*, 1985). O modo de ação dessa droga não é conhecido. Os efeitos colaterais incluem leve e reversível metemoglobinemia e aumento transitório dos níveis de transaminase hepática (Sherwood *et al.*, 1994).

1.5 Mecanismo de ação dos antimoniais

O transporte de antimônio foi estudado pela primeira vez em ambos os estágios (amastigota e promastigota) de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) donovani*, utilizando Pentostam (SbV) (Berman *et al.*, 1987b). Os antimoniais pentavalentes (SbV) são pró-drogas que necessitam de redução biológica para forma trivalente (SbIII) para terem atividade leishmanicida. O local desta redução, se dentro do parasito (forma amastigota) ou no macrófago, e o mecanismo de redução (enzimático ou não enzimático) permanecem com resultados controversos na literatura. Entretanto, alguns estudos têm relatado que amastigotas axênicos, cultivados na ausência de macrófagos, são susceptíveis ao SbV, enquanto em promastigotas este composto não é ativo, sugerindo que alguma redução ocorre nas formas amastigotas do parasito (Callahan *et al.*, 1997; Ephros *et al.*, 1997; Ephros *et al.*, 1999; Goyard *et al.*, 2003).

O mecanismo pelo qual amastigotas reduzem SbV em SbIII não é claro. Tanto glutathiona quanto tripanotiona podem reduzir não enzimaticamente SbV a SbIII sob condições ácidas (Ouellette *et al.*, 1991; Frézard *et al.*, 2001; Santos Ferreira *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003a; Yan *et al.*, 2003b). Entretanto, a relevância fisiológica dessas observações é uma questão a ser investigada devido ao fato das taxas de redução serem bastante lentas. Além disso, promastigotas contêm concentrações intracelulares maiores de tripanotiona e glutathiona do que amastigotas (Ariyanayagam e Fairlamb, 2001; Wyllie *et al.*, 2004) e ambos estágios mantêm valores intracelulares de pH próximos ao neutro, independentemente do pH externo (Glaser *et al.*, 1988). Assim, é difícil explicar a ação seletiva de SbV contra o estágio amastigota por um mecanismo não enzimático. Como ambos os estágios podem absorver SbV e SbIII, a insensibilidade de promastigotas ao SbV não pode ser atribuída a exclusão da droga (Brochu *et al.*, 2003).

SbIII é capaz de entrar em formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania*, entretanto as rotas de entrada de SbIII e SbV diferem (Brochu *et al.*,

2003). Estudos recentes mostram que SbIII entra em *Leishmania* através de uma aquagliceroporina denominada AQP1 (Gourbal *et al.*, 2004). Para ser ativo contra *Leishmania*, SbV tem que entrar na célula hospedeira, atravessar a membrana fagolisossomal e agir contra as formas amastigotas intracelulares (Shaked-Mishan *et al.*, 2001). Acredita-se que SbV entra no parasito através de uma proteína que reconhece uma estrutura semelhante a um açúcar compartilhado com gluconato (Brochu *et al.*, 2003).

É possível que a redução de SbV a SbIII ocorra tanto no hospedeiro quanto no parasito. Em bactéria e levedura, a redução de metal é mediada por enzimas (Rosen, 2002) e isso pode também acontecer em *Leishmania*. Recentemente, uma enzima específica do parasito denominada tiol dependente redutase (TDR)1, que contém domínios com similaridades a ômega glutationa transferase, mostrou-se catalisar a conversão de SbV a SbIII, usando glutationa como um redutor (Denton *et al.*, 2004). Uma nova enzima antimoniato redutase, ACR2, foi caracterizada em *Leishmania* e mostrou-se reduzir SbV e aumentar a sensibilidade de células de *Leishmania* ao SbV (Zhou *et al.*, 2004). Alternativamente, há evidência que um número de tióis, incluindo tióis parasito-específicos tais como tripanotiona, assim como tióis macrófagos-específicos tais como glicilcisteína, podem reduzir SbV a SbIII, não enzimaticamente (Fig. 6) (Santos Ferreira *et al.*, 2003).

Estudos iniciais sugerem que o SbV inibe a biossíntese de macromoléculas em amastigotas (Berman *et al.*, 1985), possivelmente via perturbação do metabolismo energético, devido à inibição de glicólise e β -oxidação de ácidos graxos (Berman *et al.*, 1987a). Entretanto, os alvos específicos nessas vias não estão bem identificados. Estudos mais recentes têm relatado apoptose em amastigotas tratados com SbIII, envolvendo fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (Sereno *et al.*, 2001b; Sudhandiran e Shaha, 2003). Entretanto, esses efeitos não envolvem a via clássica mediada por caspase (Sereno *et al.*, 2001b) e não correspondem à mais rigorosa definição de apoptose (Jiang e Wang, 2004). Além disso, estudos sugerem que SbIII causa distúrbios no potencial tiol redox do parasito, levando à morte celular (Wyllie *et al.*, 2004).

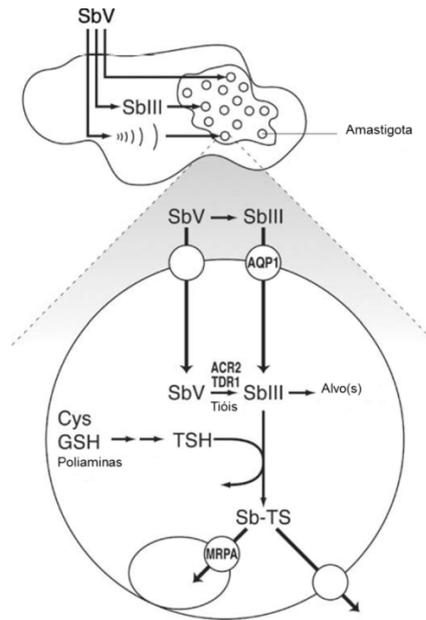


Figura 6: Modo de ação e resistência ao antimônio pentavalente em forma amastigota de *Leishmania* (Ouellette *et al.*, 2004).

1.6 Resistência aos antimoniais

Para interferir na multiplicação de um patógeno, uma droga deve ser capaz de atravessar a membrana, tornar-se ativa, encontrar o seu alvo intracelular, e provocar o dano celular propriamente dito. Além disso, o efeito deverá ser suficiente para que o patógeno seja eliminado pela ação direta da droga, tenha sua replicação inibida, ou torne-se susceptível ao sistema imunológico do hospedeiro ou finalmente, uma combinação desses efeitos. A resistência a uma droga consiste em deter sua ação em algum dos passos anteriores. Assim, principais mecanismos de resistência incluem: diminuição da absorção ou aumento da extrusão da droga, diminuição da ativação da droga, alteração do complexo alvo-droga, aumento da tolerância à droga ou aumento do reparo do dano causado pela droga (Borst, 1991; Singh, 2006). Muitos desses mecanismos têm sido observados em parasitos e tais modificações podem surgir nessas populações por meio de adaptações fisiológicas, mutações espontâneas seguidas por seleção e alterações na expressão gênica (amplificação) (Singh, 2006). Dessa maneira, a resistência consiste na diminuição de sensibilidade à droga devido a um declínio na eficácia da droga contra uma população de parasitos, previamente susceptíveis ao composto (Natera *et al.*, 2007).

Um aumento em larga escala na resistência clínica de *Leishmania* aos antimoniais pentavalentes tem sido relatado na Índia (Lira *et al.*, 1999). Variações na eficácia de drogas para o tratamento de leishmanioses são frequentemente uma consequência do estado imune do paciente, das propriedades farmacocinéticas da droga e das diferenças intrínsecas de cada espécie de *Leishmania* quanto a sensibilidade à droga (Cohen, 1992; Croft *et al.*, 2006). A resistência de *Leishmania* contra uma determinada droga pode ser natural ou adquirida quando parasitos são expostos a doses sub-ótimas da droga (Cohen, 1992). Fenótipos de resistência selecionados *in vitro* são geralmente obtidos pelo cultivo de parasitos sensíveis, sob pressão contínua e crescente de uma droga. Sendo assim, os mecanismos pelos quais espécies de *Leishmania* adquirem resistência aos antimoniais têm sido objeto de intensa pesquisa nas últimas décadas.

O fenômeno de resistência de *Leishmania* aos antimoniais é complexo, multifatorial e envolve diversas vias, que apresentam aspectos similares a outros microrganismos. Essas vias incluem a entrada, o metabolismo, o efluxo e/ou o sequestro de determinada droga, bem como a morte celular do parasito através da ação do fármaco (Jeddi *et al.*, 2011).

O comprometimento da atividade da droga pode ser observado caso a redução de SbV a SbIII não ocorra ou seja diminuída. De fato, uma diminuição dessa redução foi demonstrada em formas amastigotas de *L. (L.) donovani* resistentes aos antimoniais pentavalentes (Shaked-Mishan *et al.*, 2001). Foi observado também que os níveis intracelulares de SbIII estavam reduzidos em isolados clínicos resistentes a essa droga, provavelmente devido a uma baixa expressão de AQP1, demonstrando seu efeito modulador na resistência aos antimoniais (Gourbal *et al.*, 2004)

O aumento dos níveis de tripanotona foi observado em algumas linhagens de *Leishmania* selecionadas para resistência ao SbIII ou arsenito (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). Isso é devido ao aumento dos níveis da taxa limitante de enzimas envolvidas na síntese de glutatona (γ -glutamilcisteína sintetase) (Grondin *et al.*, 1997) e poliaminas (ornitina decarboxilase) (Haimeur *et al.*, 1999), os dois metabólitos precursores da tripanotona. Aumento da síntese de glutatona e tripanotona a partir de cisteína pode ajudar a substituir tióis perdidos devido ao efluxo, bem como auxiliar no restabelecimento do potencial tiol redox perturbado pelo acúmulo de dissulfetos (Wyllie *et al.*, 2004).

O destino do complexo Sb-tiol permanece incerto, mas duas vias de eliminação do complexo foram descritas. A primeira envolve sequestro destes compostos em um compartimento intracelular, e a outra se eles são eliminados diretamente das células através da membrana plasmática (Fig. 6). Estudos anteriores observaram que PgpA (P-glycoprotein A), um membro dos transportadores ABC (ATP-binding cassette), está amplificado em algumas linhagens de *Leishmania* resistentes (Callahan e Beverley, 1991; Ouellette e Borst, 1991). Posteriormente, ficou demonstrado que esse transportador não é responsável pelo efluxo da droga através da membrana plasmática. Primeiro, a superexpressão de PgpA está associada à diminuição da entrada de Sb ao invés de aumentar o efluxo. Este fato pode ser devido a um efeito dominante negativo através de interações com outras proteínas de membrana (Callahan *et al.*, 1994). Segundo, superexpressão de PgpA não mediou um aumento no efluxo de arsenito radioativo das células (Dey *et al.*, 1994) ou transporte de arsenito através da membrana plasmática (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). A identidade da bomba de efluxo na membrana plasmática e seu papel na resistência aos antimoniais continuam a ser investigados. No entanto, os estudos descritos acima identificaram PgpA como sequestrador de SbIII em um compartimento intracelular vacuolar em *Leishmania*.

Após a infecção, macrófagos sofrem uma explosão respiratória, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), OH^\cdot (radical hidroxila) e $O_2^\cdot^-$ (ânion superóxido), para destruir microrganismos invasores (Beaman e Beaman, 1984). Por outro lado, patógenos intracelulares desenvolveram mecanismos enzimáticos para detoxificar tais EROs. Em vários sistemas, quatro enzimas têm sido relacionadas à defesa antioxidante: catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase (SOD) e peroxirredoxinas. As duas primeiras enzimas não foram encontradas em *Leishmania*. No entanto, alto nível de SOD está presente em promastigotas (Meshnick e Eaton, 1981). Dois tipos de gene SOD, SOD-A e SOD-B, foram clonados de *L. (L.) chagasi*. Assim, foi demonstrado que o crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. (L.) chagasi* transfectados com os genes SOD-A ou SOD-B é mais resistente ao nitroprussiato de sódio ou paraquat, quando comparado ao seu par sensível (Paramchuk *et al.*, 1997).

Amplificação gênica é um fenômeno que ocorre em alguns microrganismos e está associada com resistência à droga (Grondin *et al.*, 1993). Em *Leishmania*, a amplificação de genes é um marco para a resistência a uma determinada droga,

principalmente quando a resistência é induzida *in vitro* (Beverley, 1991; Segovia 1994; Borst e Ouellette, 1995). Genes amplificados têm sido observados em mutantes de *Leishmania* selecionados para resistência a metais como antimoniais e arsenito, anfotericina B, análogos de nucleosídeos, antifolatos e DL- α -difluorometilornitina (DFMO). Amplificação de genes foi também mostrada em células de *Leishmania* selecionadas para resistência a outras drogas que não são utilizadas no tratamento da doença (Papadopoulou *et al.*, 1998). Um destes exemplos é a amplificação de um gene homólogo à Pgp que foi relatada em algumas espécies selecionadas para resistência à vinblastina (Henderson *et al.*, 1992; Chow *et al.*, 1993; Gueiros-Filho *et al.*, 1995; Chiquero *et al.*, 1998). *Leishmania* selecionada para resistência à tunicamicina tem o gene da N-acetilglucosamina-1-fosfato transferase amplificado (Liu e Chang, 1992). Diferentes *loci* do genoma de espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes estão amplificados, mas o exato papel destes genes na resistência ainda está sendo elucidado (Beverley, 1991).

O surgimento de amostras de *Leishmania* resistentes à droga e o aumento da propagação de espécies resistentes desse parasito enfatizam a importância de identificação de mecanismos diretamente envolvidos na resistência à droga, assim como as mudanças fisiológicas que podem ocorrer nesses parasitos. Tais mudanças fisiológicas, relacionadas ou não a mecanismos de resistência à droga, contribuem para as características globais do fenótipo de resistência. Além disto, novas estratégias quimioterapêuticas contra leishmanioses poderiam ser desenvolvidas a partir destes estudos de resistência (Ponte-Sucre, 2003).

1.7 Transportadores ABC

Transportadores ABC (ATP-binding cassette) compreendem uma superfamília de proteínas conservadas evolutivamente que vão desde as bactérias aos seres humanos (Dassa e Bouige, 2001). Essas proteínas transmembrana utilizam a energia resultante da hidrólise de ATP para transportar uma variedade de moléculas através de membranas biológicas, incluindo aminoácidos, açúcares, peptídeos, lipídeos, íons e drogas quimioterapêuticas (Higgins, 1992). Uma de suas características é que o movimento das moléculas através desses transportadores

pode ser para dentro (importação) ou para fora (exportação, secreção) (Holland e Blight, 1999; Saurin *et al.*, 1999).

Proteínas ABC estão envolvidas em muitos processos celulares. Em sistemas procariotas, esses transportadores podem exportar substratos, como drogas e antibióticos, ou mediar a absorção de nutrientes essenciais (Sheps e Ling, 2007) como histidina, maltose, peptídeos ou ribose (Ehrmann *et al.* 1998; Holland e Blight, 1999). A maioria dos transportadores ABC encontrados em fungos e parasitos funcionam quase exclusivamente como exportadores, mediando o transporte de substratos do citosol para fora da célula ou para organelas intracelulares (Saurin *et al.*, 1999; Sheps e Ling, 2007). Alguns transportadores ABC encontrados em bactérias, fungos patogênicos e parasitos estão envolvidos na resistência a drogas antimicrobianas (Klokouzas *et al.*, 2003; Lage, 2003; McKeegan *et al.*, 2004).

Proteínas da superfamília ABC contêm em suas sequências um conservado domínio de ligação a nucleotídeos (NBD) com três motivos principais. Os motivos Walker A e B, encontrados em muitas famílias ATPase, estão separados por aproximadamente 90-120 aminoácidos, e o motivo C, sequência chamada assinatura ABC, que está localizado entre os outros dois motivos Walker, logo acima do Walker B (Hyde *et al.*, 1990). A sequência assinatura ABC é específica para transportadores ABC e os distingue das outras proteínas de ligação à ATP (Walker *et al.*, 1982). Proteínas ABC também contêm domínios transmembrana (TMD) compostos de múltiplas α -hélices transmembrana, que fornecem a especificidade para o substrato. Os domínios NBD estão localizados no citoplasma e transferem a energia para transportar o substrato através da membrana (Fig. 7) (Dean *et al.*, 2001).

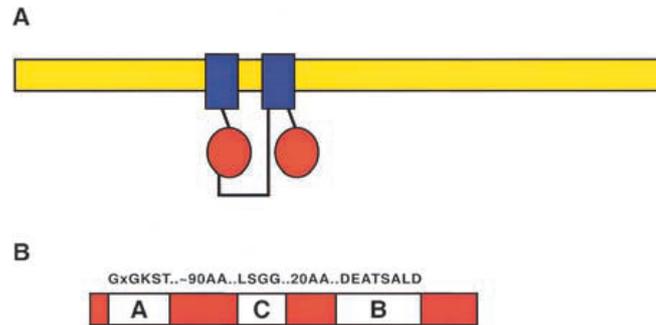


Figura 7: Diagrama de uma típica proteína transportadora ABC. (A) O diagrama da estrutura de uma proteína ABC representativa é mostrado com a bicamada lipídica em amarelo, os domínios transmembrana (TMD) em azul e os domínios de ligação a nucleotídeos (NBD) em vermelho. (B) O NBD de um gene ABC contém os motivos Walker A e B, e uma assinatura ou motivo C. Os aminoácidos mais comuns encontrados nesses motivos são mostrados acima do diagrama; subfamílias frequentemente contêm resíduos característicos nessas e em outras regiões (Dean *et al.*, 2001).

Os genes ABC de eucariotos são organizados como transportadores completos contendo dois TMDs e dois NBDs ou como transportadores incompletos contendo apenas um domínio de cada (Fig. 8) (Hyde *et al.*, 1990). Esses transportadores incompletos devem formar homodímeros ou heterodímeros para constituir um transportador funcional.

Com base na similaridade da estrutura gênica, na ordem dos domínios e na homologia das sequências dos domínios NBD e TMD, as proteínas ABC eucarióticas podem ser divididas em oito subfamílias (ABCA a ABCH), sete das quais (ABCA a ABCG) são encontradas no genoma humano (Allikmets *et al.*, 1996). A subfamília ABCH, a qual inclui membros contendo apenas um único domínio ABC, foi identificada pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* (Dean *et al.*, 2001).

Recentemente, uma pesquisa detalhada dos genomas de *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* para sequências ABC ajudaram a identificar a superfamília de proteínas ABC em *Leishmania*. O genoma desse parasito contém 42 genes ABC com membros representantes de cada subfamília (ABCA a ABCH) frequentemente encontrados em eucariotos (Leprohon *et al.*, 2006). Comparado a outros microrganismos eucariotos, *Leishmania* é o parasito com maior número de genes ABC. Essa diferença parece ser devido ao grande número de genes das subfamílias ABCA, ABCC e ABCG (Tabela 2) (Sauvage *et al.*, 2009).

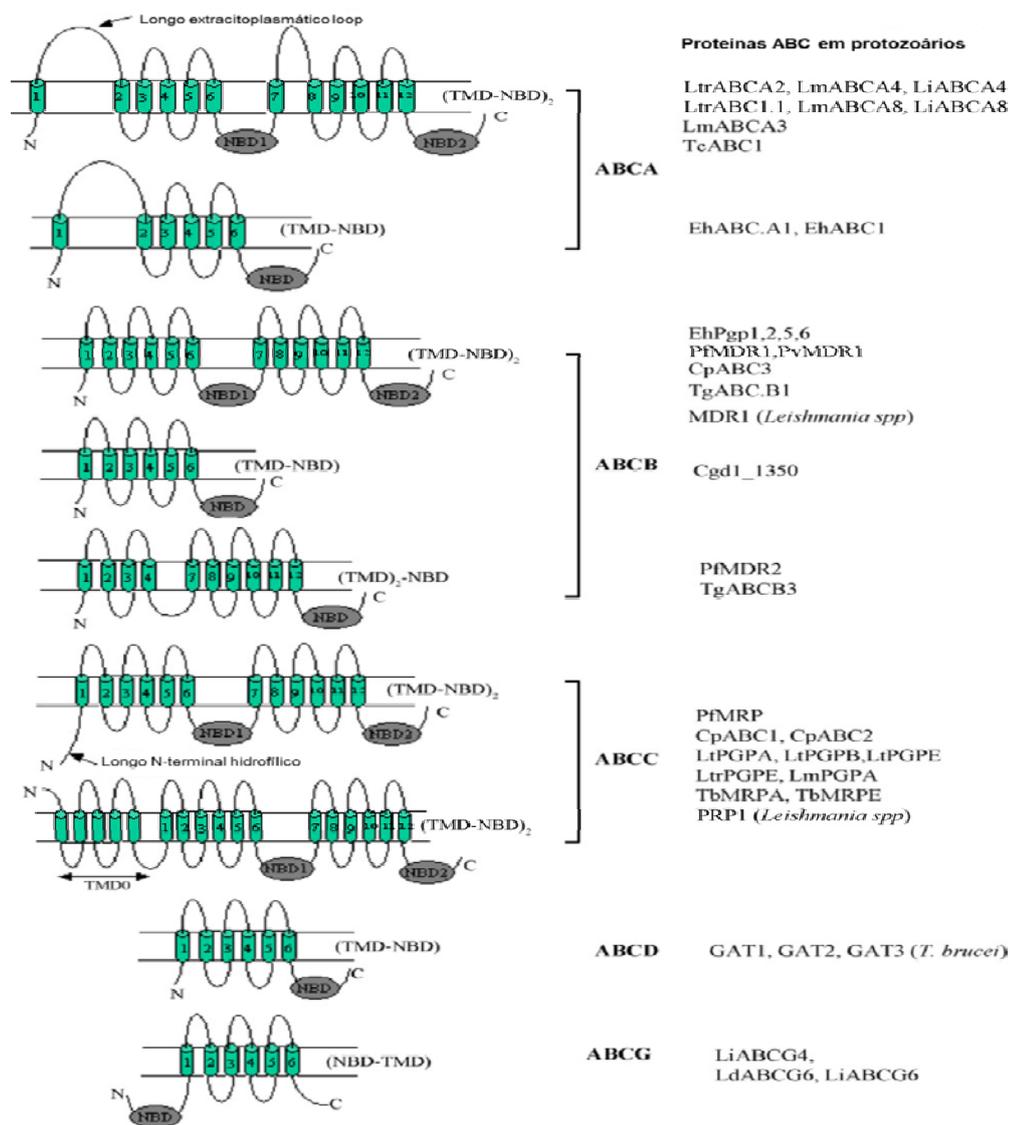


Figura 8: Organização esquemática de proteínas ABC em protozoários parasitos. Muitos transportadores das subfamílias ABCA, ABCB e ABCC contêm dois TMDs (TMD1 e TMD2) e dois NBDs (NBD1 e NBD2) fundidos em um único polipeptídeo com a tipologia (TMD-NBD)₂. Os transportadores ABCA (completos ou incompletos) são caracterizados por um longo extracitoplasmático *loop* entre a primeira e segunda α -hélices, enquanto membros MRP (ABCC) contêm um longo N-terminal citosólico ou transmembrana. Outros transportadores ABC são conhecidos como transportadores incompletos com um único TMD fundido a um único NBD. O TMD pode ser N-terminal (TMD-NBD como em membros ABCB e ABCD) ou C-terminal (NBD-TMD como em membros ABCG) da proteína. Membros representativos de cada classe para protozoários parasitos são mencionados na figura com seus nomes originais (Sauvage *et al.*, 2009).

TABELA 2 – Distribuição do número de genes ABC por subfamílias em protozoários parasitos

Subfamílias	<i>Leishmania</i> spp.*	<i>Trypanosoma</i> <i>brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i>	<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i>
ABCA	10	2	5	0	0
ABCB	4	2	2	7	6
ABCC	8	3	4	2	2
ABCD	3	3	3	0	0
ABCE	1	1	1	1	1
ABCF	3	3	3	1	1
ABCG	6	4	4	1	5
ABCH	3	1	3	2	4
Outra	4	3	3	1	1
Total	42	22	28	15	20

* *Leishmania* spp. corresponde a *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum*.

Fonte: Adaptado de Sauvage *et al.*, 2009.

L. (L.) major e *L. (L.) infantum* têm 10 membros homólogos à subfamília ABCA de mamíferos (ABCA1 - ABCA10). Cada um dos dois genes ABCA de *L. (L.) major*, *LmABCA4* e *LmABCA8*, tem um homólogo no genoma de *L. (L.) tropica*, denominado *LtrABCA4* (*LtrABCA2*) (Araújo-Santos *et al.*, 2005) e *LtrABCA8* (*LtrABC1.1*) (Parodi-Talici *et al.*, 2003), respectivamente. *LtrABCA8* e *LtrABCA4* parecem desempenhar um papel no tráfico de fosfolipídeos. A superexpressão desses genes pode resultar em modificações na superfície e afetar moléculas específicas envolvidas na infectividade do parasito (Sauvage *et al.*, 2009).

Quatro genes pertencentes à subfamília ABCB têm sido identificados no genoma de *Leishmania*. Dois são correspondentes a homólogos de Pgp, ABCB4 (*mdr1*) e ABCB2 (*mdr2*) e os outros dois, denominados ABCB1 e ABCB3, são de funções desconhecidas. ABCB4 foi o primeiro homólogo Pgp identificado em linhagens de *Leishmania* resistentes à vinblastina ou daunorubicina, com resistência cruzada a drogas hidrofóbicas não relacionadas, incluindo puromicina, adriamicina e doxorubicina (Pérez-Victoria *et al.*, 2001). *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) donovani* resistentes à pentamidina acumularam menos droga devido à alteração do transportador e/ou exclusão de pentamidina da mitocôndria (alvo da droga)

(Mukherjee *et al.*, 2006). Em *L. (L.) enrietti*, o número de cópias do gene ABCB4 foi encontrado relacionado com acúmulo de pentamidina. Foi proposto que os níveis de ferro poderiam modular a capacidade desse gene para transportar a droga em um compartimento intracelular que está conectado à mitocôndria (Wong e Chow, 2006). ABCB4 poderia ser responsável pela importação de pentamidina na mitocôndria e resistência a essa droga pode ser devido à reduzida atividade de importação. A localização subcelular deste transportador sugere que resistência nesse parasito pode ser mediada por mecanismos que são diferentes do mecanismo de efluxo convencional através da membrana plasmática, como observado em Pgp de mamíferos (Sauvage *et al.*, 2009). MDR1 foi encontrado amplificado em mutantes de *L. (L.) donovani* selecionados para resistência à vinblastina ou daunomicina e foi mostrado conferir resistência a múltiplas drogas por experimentos de transfecção (Henderson *et al.*, 1992; Chow *et al.*, 1993; Gueiros-Filho *et al.*, 1995; Chiquero *et al.*, 1998; Katakura *et al.*, 1999). O segundo membro ABCB é a proteína *LaABCB2* (*LaMDR2*) identificada em *L. (L.) amazonensis*. A superexpressão desse gene exibiu reduzido acúmulo de 5-fluorouracil, sugerindo que *LaABCB2* está envolvido na extrusão de xenobióticos (Katakura *et al.*, 2004).

A subfamília ABCC, a segunda maior subfamília, apresenta oito proteínas ABC identificadas em *Leishmania*, das quais seis foram descritas e são membros MRP. O primeiro gene ABC a ser identificado nessa subfamília foi o ABCC3 (PgpA/MRPA). Outros membros denominados ABCC2 (PgpB), ABCC1 (PgpC), ABCC5 (PgpD) e ABCC4 (PgpE) foram também identificados. As sequências de nucleotídeos de PgpB e PgpE são conhecidas e os produtos gênicos são altamente semelhantes à PgpA. Análises das sequências parciais de PgpC e PgpD também sugerem que esses genes são homólogos à PgpA. Estudos de resistência cruzada e experimentos de transfecção gênica falharam em mostrar o papel de resistência à droga para qualquer um desses quatro membros (Légaré *et al.*, 1994). Entretanto, o homólogo *LtABCC4* em *L. tropica* (*LtrABCC4*) mostrou-se superexpresso em uma linhagem de células resistente ao metotrexato (Gamarro *et al.*, 1994). O último membro ABCC descrito, ABCC7, também chamado PRP1 (proteína de resistência à pentamidina 1), mostrou conferir resistência à pentamidina quando foi transfectado em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* (Coelho *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2007). Por outro lado, isso não é observado em *L. (L.) amazonensis* quando a resistência é gerada por pressão à droga (Coelho *et al.*,

2008). ABCC7 é uma proteína intracelular associada a elemento túbulovesicular (Coelho *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2007), que está relacionada a exocitose e endocitose (Ghedin *et al.*, 2001). Portanto, foi proposto que essa proteína poderia conferir resistência pelo sequestro de pentamidina em vesículas que seriam eliminadas para fora da célula através da bolsa flagelar (Coelho *et al.*, 2006).

Proteínas da subfamília ABCG foram caracterizadas em *Leishmania*. ABCG4 está localizada na membrana plasmática do parasito e está envolvida na translocação de análogos de fosfatidilcolina, além de conferir resistência a fosfolipídeos alquila e à miltefosina em *L. (L.) infantum* (Castanys-Muñoz *et al.*, 2007). A superexpressão do transportador ABCG6 confere resistência à camptotecina em *L. (L.) donovani* (BoseDasgupta *et al.*, 2008), miltefosina em *L. (L.) infantum* e, provavelmente, está envolvida também no tráfico de fosfolipídeos, uma vez que reduz o acúmulo de fosfolipídeos análogos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (Castanys-Muñoz *et al.*, 2008). ABCG1, ABCG2 e ABCG3 são transportadores repetidos *em tandem* que especificamente translocam fosfatidilserina endógena, induzindo sua externalização durante a metaciclogênese. A função de ABCG5 continua a ser elucidada (Campos-Salinas *et al.*, 2011).

Membros das subfamílias ABCD, ABCE, ABCF e ABCH, bem como quatro proteínas não classificadas, não foram caracterizados em *Leishmania* (Sauvage *et al.*, 2009).

Microarranjos de DNA foram utilizados para análises do estágio específico de expressão de genes ABC em *Leishmania*. Foi demonstrado que ABCA3 e ABCG3 estavam preferencialmente expressos no estágio amastigota, enquanto ABCF3 estava mais abundantemente expresso em promastigotas. Isso sugere que ABCF3 está envolvido no estágio específico de regulação do gene, enquanto ABCA3 e ABCG3 são necessários no transporte e armazenamento de lipídeos. Nenhum outro gene ABC mostrou uma significativa expressão diferencial em qualquer dos dois estágios de vida do parasito (Leprohon *et al.*, 2006).

1.7.1 Gene MRPA

O gene MRPA, também conhecido como PgpA, foi o primeiro transportador ABCC identificado em *Leishmania*. Foi originalmente localizado em um DNA

extracromossômico, o círculo H, amplificado em linhagem celular promastigota de *L. (L.) tarentolae* (*LtPgpA*) selecionada para resistência ao metotrexato. Esse círculo H contém repetições invertidas de 30 Kb, separadas por sequências únicas de 4 e 5 Kb (Fig. 9) (Ouellette *et al.*, 1990; Ouellette *et al.*, 1991). O gene homólogo em *L. (L.) major*, *LmPgpA*, foi estudado por Beverley e colaboradores, e mostrou conferir resistência ao arsenito em transfectados (Callahan e Beverley, 1991). *LtPgpA* está também amplificado em linhagens de células resistentes à terbinafina, primaquina e arsenito (Ellenberger e Beverley, 1989). A sequência do gene *LtPgpA* prediz uma estrutura similar a outros transportadores ABC (Ouellette *et al.*, 1990). Estudos recentes indicam que esse gene está mais relacionado ao gene MRP (33%) do que MDR (22%) (Cole *et al.*, 1992; Légaré *et al.*, 1994).

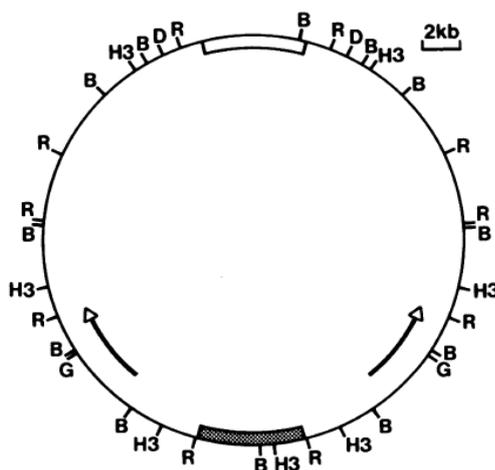


Figura 9: Localização do gene PgpA no círculo H de *L. (L.) tarentolae*. O círculo H tem 68 Kb com repetições invertidas de 30 Kb (linha fina) com duas regiões únicas de 4 Kb (retângulos aberto e pontilhado). Setas dentro do círculo indicam a localização do gene PgpA. B, *Bam*HI; D, *Dra*I; R, *Eco*RI; G, *Bgl*I; H3, *Hind*III. (Ouellette *et al.*, 1990).

MRPA está frequentemente amplificado em espécies de *Leishmania* selecionadas para resistência a drogas contendo arsenito e antimônio (Callahan e Beverley, 1991; Haimeur *et al.*, 2000). Estudos de transfecção mostram que esse gene está envolvido na resistência a metais (Callahan e Beverley, 1991; Papadopoulou *et al.*, 1994; Papadopoulou *et al.*, 1996; Légaré *et al.*, 1997). A expressão de *LtPgpA* em transfectados de *L. (L.) tarentolae* resultou em baixo nível de resistência (aumento de duas vezes) ao arsenito e antimônio pentavalente

(Papadopoulou *et al.*, 1994). No entanto, experimentos similares em *L. (L.) major* com *LmPgpA* resultou em um aumento de dez vezes no nível de resistência ao arsenito e antimônio trivalente, mas não ao antimônio pentavalente, zinco, cádmio ou a drogas citotóxicas como vinblastina e puromicina (Callahan e Beverley, 1991). Os níveis de resistência descritos para *LtPgpA* e *LmPgpA* foram dependentes da espécie de *Leishmania* em que os genes foram transfetados. Em linhagens celulares de *Leishmania* resistentes à droga, a superexpressão de *LtPgpA* tem sido atribuída ao aumento do número de cópias do plasmídeo H que contém *LtPgpA* (Légaré *et al.*, 1994). Amplificação gênica extracromossomal é um mecanismo comum de superexpressão gênica em *Leishmania* resistente à droga, o que deve explicar em parte porque muitos genes ABC amplificados têm sido observados em mutantes resistentes (Grondin *et al.*, 1996; Ouellette *et al.*, 1998a). Alguns autores demonstraram que MRPA confere resistência a SbV e a SbIII (El Fadili *et al.*, 2005) e está amplificado em isolados clínicos de pacientes que não respondem aos antimoniais (Mukherjee *et al.*, 2007). Dados da literatura mostram que a superexpressão do gene MRPA medeia a resistência ao SbIII em *L. (L.) major* através da diminuição da absorção de antimônio ao invés do aumento do efluxo. Isso se deve provavelmente a um efeito dominante negativo através da interação com outras proteínas de membrana (Callahan *et al.*, 1994). Amplificação intracromossomal é rara em *Leishmania*, mas frequente em *Plasmodium* (Cowman e Lew, 1989).

Dada a semelhança estrutural de *LtPgpA* a membros MRP, foi sugerido que *LtPgpA* poderia mediar o efluxo ativo de metais como um complexo metal-tiol, similar às MRP1 e 2 de mamíferos, e, portanto, as concentrações intracelulares de tiol em *Leishmania* seriam um importante fator na resistência do organismo (Borst e Ouellette, 1995; Borst *et al.*, 2000). Além da amplificação de *LtPgpA*, linhagens de parasitos que são altamente resistentes ao arsenito e antimônio também têm elevados níveis de tripanotona (TSH), um conjugado de glutatona com espermidina (Haimeur *et al.*, 2000). A biossíntese de TSH, que é o principal tiol reduzido em Trypanosomatidae, envolve algumas enzimas, incluindo γ -glutamylcisteína sintetase (GSH1) e ornitina decarboxilase (ODC). Ambas as enzimas mostraram superexpressão com *LtPgpA* em parasitos resistentes, e, portanto, PgpA foi proposto ser um transportador metal-tiol (Grondin *et al.*, 1997; Légaré *et al.*, 2001). Entretanto, amplificação de GSH1 não foi observada em *L. (L.) tropica* e *L. (L.)*

mexicana transfectados com PgpA. Além disso, *LtPgpA* marcado com proteína verde fluorescente mostrou estar localizada na membrana vesicular intracelular próxima à bolsa flagelar, sugerindo que PgpA confere resistência pelo sequestro de conjugados metal-tiol em vesículas intracelulares (Légaré *et al.*, 2001).

1.7.2 Gene MRP e Pgp

Alguns membros da superfamília ABC estão associados à quimioresistência, através da superexpressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MRP – multidrug resistance associated protein). Uma dessas proteínas é a Pgp, que tem sido relacionada com resistência a drogas em células tumorais e em microrganismos (Gottesman e Pastan, 1993; Ouellette *et al.*, 1994). Um grupo de genes pertencentes à família de genes Pgp e cujos produtos gênicos conferem baixos níveis de resistência à vinblastina, arsenito e antimônio trivalente têm sido caracterizados em *L. (L.) tarentolae* e *L. (L.) major* (Ouellette *et al.*, 1991; Papadopoulou *et al.*, 1994). Esses genes estão também amplificados em linhagens celulares resistentes à terbinafina e primaquina (Ellenberger e Beverley, 1989). A conformação estrutural de seus produtos gênicos é semelhante à de outros genes Pgp, com duas hemiproteínas, cada uma com seis segmentos de membrana, 22% de homologia ao produto gênico *mdr1* humano e altos níveis de homologia com a MRP (Cole *et al.*, 1994). Transfecção de *LtPgpA* em parasitos sensíveis desencadeia um aumento nos níveis de poliaminas e tripanotona e um decréscimo no acúmulo de Pentostam (Mukhopadhyay *et al.*, 1996; Haimeur *et al.*, 2000). Os produtos das proteínas desses genes mostram funções importantes como transportadoras ATPases intracelulares de metal-tiol nas etapas precoces de resistência (Légaré *et al.*, 2001). Em outros estudos, promastigotas de *L. (L.) tarentolae* selecionados para resistência ao Pentostam e mutantes resistentes a drogas contendo antimônio e resistência cruzada ao arsenito, mostraram amplificação de um *locus* sem significativa homologia a sequências descritas anteriormente (Haimeur e Ouellette, 1998). Recentemente, em *L. (L.) tarentolae* resistente ao metotrexato foi demonstrada uma deleção de transportadores de ácido fólico, diminuindo os níveis intracelulares deste composto e levando à resistência (Richard *et al.*, 2002).

Em experimentos de transfecção em *L. (L.) enrietti*, foi demonstrada a superexpressão do gene Pgp (homólogo ao *mdr1* humano) em parasitos resistentes

a drogas. Posteriormente, em *L. (L.) tropica* resistente à daunomicina também foi observada amplificação extracromossomal do gene *Ltmdr1*, envolvido no baixo acúmulo intracelular da droga (Chiquero *et al.*, 1998). Experimentos de transfecção do gene *Lamdr1* em parasitos sensíveis mostraram que este gene conferiu um significativo nível de resistência à vinblastina, doxorubicina e actinomicina-D (Ponte-Sucre, 2003).

Portanto, no modelo de resistência à droga, a proteína Pgp está localizada na superfície celular e funciona como uma bomba de efluxo para reduzir a concentração intracelular da droga (Fig. 10A). Em contraste à proteína MRPA, o modelo de sequestro de resistência à droga propõe que a molécula de transporte tem uma localização subcelular e medeia a resistência à droga pelo sequestro da mesma em uma organela subcelular, separando assim a droga do seu alvo (Fig. 10B) (Chow e Volkman, 1998).

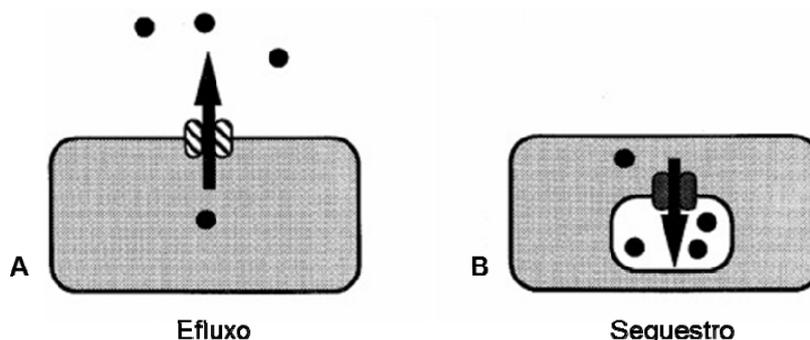


Figura 10: Modelos de resistência à droga. Em (A) é representado o modelo de efluxo característico da proteína Pgp, e em (B), o modelo de sequestro realizado pela proteína MRPA (Chow e Volkman, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Variações na eficácia de drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses estão relacionadas a diferenças na sensibilidade de espécies de *Leishmania* à droga, ao sistema imune do hospedeiro e às propriedades farmacocinéticas da droga (Croft *et al.*, 2006). Esses fatores associados ao desenvolvimento de resistência constitui uma das principais razões para falhas no tratamento quimioterápico. Todavia, a quimioterapia ainda continua sendo uma das principais formas de controle da doença.

A busca pela compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares que contribuem para o fenótipo de resistência em espécies de *Leishmania* tem sido objeto de pesquisas científicas nas últimas décadas. Estudos de tais mecanismos são baseados principalmente em trabalhos conduzidos com amostras de *Leishmania* selecionadas *in vitro*, sob pressão contínua e crescente de uma determinada droga. Dessa maneira, estudos experimentais de resistência são de grande importância, pois podem permitir a identificação de novos alvos quimioterápicos e o entendimento dos mecanismos de resistência do parasito.

A grande maioria dos estudos relata resistência aos antimoniais em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, e pouco se sabe a respeito desse fenômeno nas espécies predominantes no Novo Mundo. Nessa perspectiva, o trabalho de seleção e caracterização fenotípica de quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (*L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*) resistentes ao tatarato potássico de antimônio (SbIII), desenvolvido por Liarte e Murta (2010), permitiu novas possibilidades de estudo de caracterização de genes diretamente envolvidos na resistência. De acordo com a literatura, os genes MRP e MRPA são relatados como genes que apresentam associação com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Dessa maneira, neste estudo foi realizada a caracterização molecular desses genes nessas quatro espécies de *Leishmania*, com o intuito de verificar se eles estão realmente envolvidos na resistência ao SbIII, bem como na possibilidade de utilizá-los como um alvo quimioterápico. Além disso, foi feito um estudo comparativo sobre a concentração intracelular de SbIII nas formas promastigotas desses parasitos, verificando a ocorrência de acúmulo ou efluxo da droga, nas espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Fazer a caracterização molecular de transportadores ABC e analisar os níveis intracelulares de antimônio em populações de *Leishmania* spp. do Novo Mundo sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente.

3.2 Objetivos específicos

Nas populações de *Leishmania* do Novo Mundo sensíveis e experimentalmente resistentes ao antimonial trivalente:

- Verificar a localização do gene MRPA nos cromossomos;
- Verificar a presença de amplificação extracromossomal do gene MRPA;
- Analisar a amplificação do gene MRPA;
- Determinar o nível de mRNA dos genes MRPA e MRP;
- Avaliar o nível de expressão da proteína Pgp;
- Analisar os níveis intracelulares de antimônio nas formas promastigotas.

4.1 Amostras de *Leishmania* spp.

Neste estudo, foram utilizadas formas promastigotas de populações sensíveis e resistentes de quatro espécies de *Leishmania* (Tabela 3). As populações resistentes foram previamente selecionadas *in vitro*, sob sucessivas passagens em meio contendo pressão contínua e crescente de antimônio trivalente (SbIII) (Liarte e Murta, 2010). Os parasitos foram cultivados em estufa BOD a 26°C em meio definido M199, acrescido de soro fetal bovino (10%), gentamicina (50 µg/mL), HEPES (40 mM), biotina (1 µg/mL), hipoxantina (14 µg/mL), bicarbonato de sódio (0,36 mg/mL), adenina (0,1 mM), biopterina (6 µM) e hemina (250 µg/mL), pH 7,4.

TABELA 3 – Espécies utilizadas neste estudo

Espécies	Cepas	IC ₅₀ (µM)		Índice de resistência
		Sensível	Resistente	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	IUMB/BR/85/M9945	0,09	1,64	19
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	0,28	1,71	6
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904	0,15	3,04	20
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MHOM/BR/74/PP75	0,33	1,40	4

IC₅₀: concentração de SbIII (µM) que diminui a taxa de crescimento celular em 50%.

Fonte: Liarte e Murta, 2010.

4.2 Extração de RNA total

O RNA total das amostras de *Leishmania* spp. foi extraído com TRIZOL de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen). O sedimento de parasitos (cerca de 1 x 10⁹ promastigotas) foi ressuscitado no TRIZOL (vol/vol). Após a adição de 200 µL de clorofórmio, a suspensão foi homogeneizada e incubada por 15 min no gelo e, posteriormente, centrifugada a 13.400 xg por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo, contendo o mesmo volume de isopropanol 95%, e incubado a -20°C por 12-18h. O RNA assim precipitado foi então

lavado com etanol 70%, secado e ressuscitado em água autoclavada, estéril e livre de RNase. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro (NanoDrop), considerando 1 unidade de absorvância $260_{nm} = 40 \mu\text{g/mL}$.

4.3 Extração de DNA

O sedimento de promastigotas das populações sensíveis e resistentes de *Leishmania* foi ressuscitado em tampão de extração contendo 50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0 e incubado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de proteinase K por 12h a 37°C. Posteriormente, o DNA foi extraído com fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (1:1:24) e clorofórmio/álcool isoamílico (1:24) e precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 100% e acetato de sódio 0,3 M, a -20°C por 12h. O DNA foi então lavado 2X com etanol 70% e ressuscitado em 100 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0). A concentração do DNA obtido foi determinada por espectrofotômetro (NanoDrop), considerando 1 unidade de absorvância $260_{nm} = 50 \mu\text{g/mL}$.

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para amplificação do fragmento da sequência codificante dos genes MRP, MRPA e SSU (small subunit) para ser utilizado em ensaios de PCR de colônia, PCR quantitativo em tempo real e preparo de sonda. Os iniciadores (Tabela 4) foram desenhados a partir da sequência nucleotídica depositada no banco de dados GenBank.

Cada reação continha tampão de reação (50 mM KCl e 10 mM de Tris-HCl pH 8,5); 1,5 mM MgCl_2 ; dNTPs (200 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos); 10 pmoles de cada iniciador; enzima Taq DNA Polimerase; DNA de *Leishmania* spp. (10 ng/ μL), em volume final de 10 μL . As reações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial 95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento 60°C por 1 min e extensão 72°C por 1 min, e ao final dos 30 ciclos foi feita uma extensão final por 5 min a 72°C.

TABELA 4 – Iniciadores utilizados neste estudo

Ensaio	Gene	Sequência do iniciador	Tamanho do fragmento
Real time	MRPA	F 5'-AAGTGGGCAG CGACTCAA-3' R 5'- CCAGTTCAG CGTCTCCGTT-3'	81 pb
Sonda	MRPA	F 5'- TCGTGATTATT CCGTGCGCGTT-3' R 5'- ACGCTCCACGC TGTTTCATGTTT-3'	452 pb
Real time	MRP	F 5'-CAACCACCAA TCAGACCCG-3' R 5'-CGGTACTACTA CGGGTGGGTG-3'	151 pb
Real time	SSU	F 5'- TCTAGGCTACC GTTTCGGCTT-3' R 5'-CACACACCGA ACCGAAGTTG-3'	60 pb

F – forward (senso); R – reverse (anti-senso).

4.5 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

O produto de PCR (3 µL) foi submetido à análise em gel de poliacrilamida a 8%. Para a polimerização do gel foram utilizados persulfato de amônio (APS) 10% (v/v) e TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina) 0,05% v/v. O gel foi fixado em 150 mL de solução de etanol a 10% (v/v) com 0,5% de ácido acético (v/v), e impregnado por nitrato de prata a 0,3%. Finalmente, o gel foi lavado em água deionizada e revelado em solução aquosa de hidróxido de sódio 3% (p/v) com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas (Sanguinetti *et al.*, 1994).

4.6 Purificação do produto de PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick, de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). Inicialmente foi adicionado um tampão com detergente PB ao produto de PCR, para a ligação do DNA na coluna. O DNA permaneceu ligado na coluna e os outros componentes da reação de PCR (magnésio, tampão de reação e outros) foram lavados com o tampão PE, contendo etanol por centrifugação a 17.900 xg por 1 min. O DNA foi eluído após a adição de 50 µL de água deionizada, aquecida a 95°C por 2 min e centrifugação da coluna.

4.7 Preparação de bactérias eletrocompetentes

As bactérias *Escherichia coli* da linhagem TOP 10F' foram preparadas para a transformação por choque térmico. Primeiramente, foi preparado um pré-inóculo, no qual 200 µL do glicerinado da cepa *E. coli* TOP 10 F' foram colocados em 15 mL de meio líquido LB por 12h-16h a 37°C, sob agitação, a 200 rpm. Após 16 horas, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio líquido LB e, em seguida, submetido à agitação constante a 200 rpm, até atingir a densidade óptica (OD) de 600 nm entre 0,4 e 0,6. Atingido este crescimento, as bactérias foram incubadas no gelo por 10 min e, posteriormente, centrifugadas a 4.170 xg a 4°C por 10 min. O sedimento foi ressuscitado em 25 mL de solução de cloreto de cálcio (100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,0) e centrifugado a 4.170 xg por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado e lavado novamente com a solução de cloreto de cálcio, seguido de centrifugação por 15 min. O sedimento foi novamente ressuscitado em solução de cloreto de cálcio contendo glicerol 10% no volume final de 160 µL. As células foram aliqüotadas (60 µL/tubo) e armazenadas a -70°C.

4.8 Clonagem dos genes MRP, MRPA e SSU

A clonagem dos fragmentos dos genes MRP, MRPA e SSU (normalizador) foi realizada para obtenção de diluições seriadas como curva padrão para a reação de PCR em tempo real.

Para a etapa de ligação, foram utilizados: 1 µL do tampão de reação com NaCl, 4 µL do produto de PCR purificado e 1 µL do vetor pCR[®]2.1-TOPO[®]. A reação foi incubada durante 10 min à temperatura ambiente. Para clonagem dos três genes, a etapa de transformação foi feita por choque térmico e foram utilizados 100 µL da bactéria *E. coli* TOP 10 F'. Após este procedimento, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido sem antibiótico ao produto transformado e incubado por 1h no agitador. Após este período, o produto foi plaqueado em meio LB sólido (ágar) contendo 100 µg/mL de Ampicilina, 4 µL de IPTG e 40 µL de X-Gal e incubado a 37°C durante 12h.

A confirmação da clonagem foi feita através de PCR das colônias transformadas com os iniciadores específicos (conforme protocolo descrito em 4.4), porém, ao invés de DNA genômico, foram utilizadas as colônias transformadas com o plasmídeo recombinante. As colônias positivas foram induzidas ao crescimento em meio LB contendo Ampicilina 100 µg/mL (1 µg/mL de meio), sob agitação, durante 10-12h.

Posteriormente, uma alíquota de 400 µL foi criopreservada em glicerol 50% e o restante da cultura foi utilizado para purificação do DNA plasmidial, utilizando o Kit mini-prep, de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). O sedimento de bactérias foi ressuspensionado em 250 µL de tampão de ressuspensão. Posteriormente, foi adicionado ao tubo 250 µL de tampão de lise e 350 µL de tampão de neutralização. A suspensão foi aplicada na coluna, centrifugada por 10 min e o eluato descartado. A coluna foi lavada e o DNA plasmidial foi eluído em 50 µL de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min e por centrifugação da coluna. O DNA plasmidial purificado foi dosado no espectrofotômetro (NanoDrop) e foi feita a diluição seriada para obtenção da curva padrão para PCR em tempo real.

4.9 RT-PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para quantificar a expressão diferencial dos genes MRP e MRPA, nas diferentes amostras de *Leishmania* spp. Inicialmente foi realizada uma RT-PCR, utilizando a enzima transcriptase reversa e o oligo dT para converter os mRNAs em cDNA. Para a síntese da primeira fita de cDNA, foram utilizados os seguintes reagentes: 2 µg de RNA total, 0,5 µg de oligo d(T), 1X tampão RT, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 40 U RNase e 200 U de transcriptase reversa Superscript II, em um volume final de 20 µL. Todos os

reagentes usados foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA). A reação do cDNA foi incubada a 42°C por 60 min. Após a síntese da primeira fita, a reação foi inativada a 70°C por 20 min, e o cDNA foi diluído 15X em água deionizada.

O cDNA foi submetido à reação de PCR em tempo real para amplificação e quantificação das sequências dos genes MRP e MRPA. A amplificação foi realizada pelo Sistema de Detecção da Sequência 7000 System SDS Software (Applied Biosystems). O gene constitutivo ribossomal SSU de *L. braziliensis* foi utilizado para normalizar a quantidade de amostra analisada.

As reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador (Tabela 4), tampão 1X SYBR GREEN (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 1 U AmpliTaq Gold DNA polymerase, 5 μL de DNA diluído 15X e água deionizada para completar o volume final da reação de 20 μL. O corante SYBR GREEN intercala na fita dupla de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Os componentes da reação foram homogeneizados e os 20 μL foram adicionados em cada poço da placa. Após aplicar as amostras, a placa foi vedada com um selante e revestida em papel alumínio até ser colocada no equipamento.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, e o anelamento/extensão a 60°C por 1 min. Curvas padrão (10⁷ a 10² moléculas) foram utilizadas para cada experimento, utilizando quantidades conhecidas do plasmídeo TOPO PCR 2.1 (Invitrogen) contendo os genes MRP, MRPA e SSU clonados. Os resultados foram analisados utilizando o programa “Sequence Detection System” (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e quantificar o número de cópias conforme a curva padrão.

4.10 Southern blot

A análise da organização e estimativa do número de cópias do gene MRPA no genoma de *Leishmania* spp. foi feita através da análise do perfil de restrição gerado por diferentes endonucleases. Foi realizada uma digestão com 10 μg de DNA genômico com a enzima *Bam*HI e outra com a enzima *Hind*III a 37°C, durante 10-12h. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio (0,5 μg/mL). O gel foi fotografado no aparelho

ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) e tratado com tampões de desnaturação ácida (HCl 0,25 M), neutralização (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) e equilíbrio (NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4). Posteriormente, foi realizada a transferência para membrana de náilon (Hybond – Amersham Biosciences), em tampão SSC 10X. A membrana foi hibridizada com a sonda marcada com α [³²P]dCTP correspondente ao gene de interesse.

4.11 Eletroforese de Pulso Alternado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE)

Para fazer a localização cromossômica do gene MRPA foi feita uma eletroforese de pulso alternado para separação dos cromossomos das diferentes espécies de *Leishmania*.

Para o preparo de blocos de agarose contendo células de *Leishmania* spp., um número de aproximadamente 2×10^9 de parasitos promastigotas foram lavados em solução salina 0,9% e ressuspendido em solução PSG (130 mM NaCl, 142 mM Na₂HPO₄, 8 mM NaH₂PO₄ e glicose 2%). Aos parasitos foi adicionada uma solução de agarose de baixo ponto de fusão, que foi então transferida para um molde de acrílico para formação dos blocos. Após polimerização da agarose, os blocos foram incubados em uma solução de lise de sarcosil 3%, 1 mg/mL de Proteinase K e 500 mM de EDTA pH 8,0 por 48h a 50°C. Em seguida, os blocos foram estocados em solução de EDTA 500 mM a 4°C.

A eletroforese de pulso alternado foi realizada no equipamento Gene Navigator TM System (Amersham Biosciences). Os blocos contendo os parasitos foram colocados em canaletas separadas de um gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8,3). A eletroforese foi realizada com pulsos norte/sul, leste/oeste de 90s por 18h, 200s por 18h, 400s por 22h, 600s por 7h a 90V e 9°C. Ao final da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL), fotografado no aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) e tratado com tampões de desnaturação ácida (HCl 0,25 M), neutralização (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) e equilíbrio (NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4). Posteriormente, os cromossomos foram transferidos do gel para membrana de náilon (Hybond – Amersham Biosciences), em tampão SSC 10X. A membrana foi utilizada para

hibridização com a sonda marcada com α [³²P]dCTP correspondente ao gene de interesse.

4.12 Ensaio para estudo de amplificação extracromossomal

Para verificar a presença de amplificação extracromossomal do gene MRPA, cerca de 1×10^9 parasitos das quatro espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII foram submetidos à lise alcalina utilizando o Kit Wizard Plus SV Minipreps, de acordo com o protocolo do fabricante (Promega). O DNA eluído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). O gel foi fotografado no aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) e tratado com tampões de desnaturação ácida (HCl 0,25 M), neutralização (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) e equilíbrio (NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4). Posteriormente, foi realizada a transferência para membrana de náilon (Hybond – Amersham Biosciences), em tampão SSC 10X. A membrana foi hibridizada com a sonda marcada com α [³²P]dCTP correspondente ao gene de interesse.

4.13 Sondas e ensaio de hibridização

As sondas utilizadas nos ensaios de PFGE, amplificação extracromossomal e Southern blot foram preparadas a partir da amplificação por PCR do DNA de *L. (V.) guyanensis* com iniciador específico para o gene MRPA (Tabela 4). Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado e marcado com α [³²P]dCTP conforme protocolo descrito por Feinberg e Vogelstein (1983). A pré-hibridização das membranas foi feita com 30 mL de solução constituída por 1% BSA, 500 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA e 7% SDS (Church e Gilbert, 1984) durante 1h a 60°C. Posteriormente, as sondas desnaturadas (95°C durante 5 min) foram adicionadas a 15 mL desta solução e as membranas foram hibridizadas durante 10-12h a 65°C (PFGE), 60°C (Southern blot e amplificação extracromossomal). Depois da hibridização, as membranas foram lavadas com SSC 2X e 0,1% SDS (duas lavagens de 20 min à temperatura ambiente para PFGE; três lavagens de 20 min a 56°C, 42°C e à temperatura ambiente para Southern blot e amplificação extracromossomal). Após as lavagens, as membranas foram expostas aos filmes de raio X e incubadas a -70°C. Posteriormente, os filmes foram revelados e fixados.

4.14 Extração de proteínas totais

As formas promastigotas das espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII foram obtidas na fase exponencial de crescimento. Os parasitos foram lavados em PBS por 3X e o sedimento congelado a -70°C. Posteriormente, as massas de parasitos foram submetidas à extração de proteínas de acordo com protocolo descrito por Gamarro *et al.* (1994). O sedimento de parasitos foi ressuspenso no tampão de lise pH 8,0 contendo 5 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, detergente NONIDET P-40 (Sigma) 1% e coquetel de inibidores de proteases (1000 µg/mL Leupeptina, 2 µg/mL aprotinina e 5 mM EDTA). Após incubação por 10 min no gelo, os parasitos foram lisados através de choque térmico (3 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio (N₂) líquido (-196°C) e banho a 37°C). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 350 xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante com as proteínas totais foi dosado, aliqotado e armazenado a -70°C.

4.15 Dosagem de proteínas

A dosagem das proteínas totais de *Leishmania* spp. foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando uma placa de ELISA com 96 poços. Uma curva padrão foi feita com a albumina de soro bovino (BSA), em triplicatas nas seguintes concentrações: 0,6; 1,2; 2,4; 3,6 e 4,8 µg de BSA por poço. As amostras foram diluídas 40X em PBS. Posteriormente, foram pipetados 20 µL das amostras na placa e adicionados 180 µL do reagente de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 50 mL etanol 95% e 100 mL ácido fosfórico 85%). A placa foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min e submetida à leitura a 595 nm em um leitor de ELISA (BIO-RAD). A concentração das proteínas foi calculada com base na curva padrão de BSA.

4.16 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Foi preparado um gel a partir da mistura de 0,8% de N,N'-metileno-bis-acrilamida e 30% de acrilamida (p/v). O gel de separação (12%) foi feito adicionando-se a esta mistura Tris-HCl pH 8,8 e SDS nas concentrações finais de 1,5 M e 0,01%, respectivamente. O gel foi polimerizado pela adição de persulfato de

amônio a 10% em água destilada (0,5% v/v) e TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina 0,05% v/v). O gel de concentração (4% de acrilamida) foi preparado como descrito anteriormente para o gel de separação, porém utilizando-se o tampão Tris-HCl pH 6,8 na concentração final de 0,5 M (Laemmli, 1970).

Para a eletroforese, as amostras foram ressuspendidas em tampão de amostra (SDS 10%, 0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 1%, 2 β -mercaptoetanol 5% e glicerol 10%), fervidas em banho maria por 5 min e aplicadas nas canaletas do gel de concentração. A eletroforese foi realizada a 50V para o gel de concentração e a 100V para o gel de separação, sendo a corrida acompanhada pelo azul de bromofenol presente no tampão de amostra. O tampão de corrida continha 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3. Após a eletroforese, o gel foi corado durante 2 horas pelo azul de Coomassie (azul de Coomassie brilhante R-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) à temperatura ambiente e, em seguida, descorado com várias trocas de solução descorante (metanol 10% e ácido acético 5%) até o fundo do gel se tornar incolor.

4.17 Western blot

A análise da expressão da proteína Pgp no parasito foi feita por Western blot, utilizando anticorpo monoclonal C219 anti-P glicoproteína (Abcam Ind, Cambridge MA, USA). Este anticorpo monoclonal reconhece um epitopo muito conservado em todos os organismos. O perfil das proteínas totais foi resolvido por eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS 12% (Laemmli, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BIO-RAD) (Towbin *et al.*, 1979) a 100V por 1h e 30 min no gelo em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20%, pH 8,3).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por 1h e lavadas em PBS-T por 2X de 5 min. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo monoclonal C219, diluído a 1:100 a 4°C durante 10-12h. As membranas foram lavadas e incubadas por 1h com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, diluído a 1:2000 (Promega). Depois de lavadas, as membranas foram reveladas por quimioluminescência com o Kit ECL Plus (Amersham), de acordo com o protocolo do fabricante.

4.18 Análise densitométrica

Foi realizada a análise densitométrica da intensidade das bandas do gene MRPA e da proteína Pgp visualizadas nos ensaios de PFGE, Southern blot e Western blot. As imagens foram capturadas pelo aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) e as análises realizadas através do software CP ATLAS 2.0.

4.19 Incorporação de Sb

Após seis passagens em meio M199 sem droga, foram obtidas 1×10^8 formas promastigotas de *Leishmania* spp. em fase logarítmica de crescimento. As células foram lavadas 2X com tampão HG (Hepes 20 mM / NaCl 0,15 M / Glicose 10 mM) e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min a 4°C. O sedimento foi ressuscitado em tampão HG e 1 mL da suspensão de parasitos foi alíquotada em tubos em quadruplicata, sendo quatro tubos apenas com parasitos (branco) e tubos contendo parasitos e 540 µM de SbIII. Os tubos foram incubados a 26°C por 1 hora e mantidos sob agitação. Em seguida, eles foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 min a 4°C, e lavados 3X com tampão HG. Posteriormente, os parasitos foram ressuscitados com 100 µL de tampão HG. Deste volume, foi retirada uma alíquota de 10 µL da suspensão para contagem do número de parasitos e utilização na normalização dos dados. Os tubos contendo 90 µL de amostra foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 min a 4°C. Todo volume foi descartado e ao sedimento foi adicionado 100 µL de HNO₃ 65% para lise dos parasitos. Na última etapa, a concentração de Sb foi dosada por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite no LabNano do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com a colaboração dos doutores Frédéric Frézard e Rubens do Monte Neto.

4.20 Análise estatística

As diferenças nos níveis intracelulares de SbIII foram analisadas pelo teste *t* Student, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O nível de significância aceitável foi de 95% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Localização cromossômica do gene MRPA

Os cromossomos de quatro espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII foram separados por eletroforese de pulso alternado (PFGE), com o objetivo de avaliar a localização do gene MRPA nesses cromossomos. Após a eletroforese, os cromossomos foram transferidos para membrana de náilon e hibridizados com a sonda específica para o gene MRPA marcada com α [³²P]dCTP.

O tamanho e o número dos cromossomos do gene MRPA não apresentaram grande diferença entre as espécies de *Leishmania* analisadas (Fig. 11A). O perfil de hibridização dos cromossomos mostrou que a sonda específica para o gene MRPA reconheceu uma banda cromossômica de aproximadamente 990 Kb em todas as populações de *Leishmania* analisadas (Fig. 11B). A análise comparativa dessa banda com o gel corado com brometo de etídio mostrou um aumento de 4X na população de *L. (L.) amazonensis* resistente ao SbIII, quando comparada com seu respectivo par sensível. Um resultado interessante foi observado na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, uma vez que a sonda para o gene MRPA reconheceu nesta amostra outras duas bandas de cerca de 365 e 1600 Kb. Este resultado é um indicativo de amplificação extracromossomal do gene MRPA nesta amostra resistente LbSbR que foi, posteriormente, investigado neste estudo. Além disto, outra banda de tamanho de aproximadamente 805 Kb foi visualizada apenas na amostra resistente de *L. (L.) infantum chagasi*. Dessa maneira, o aumento de expressão observado nas populações resistentes estudadas sugere que exista uma correlação entre a localização/amplificação do transportador MRPA e o fenótipo de resistência de *Leishmania* à droga.

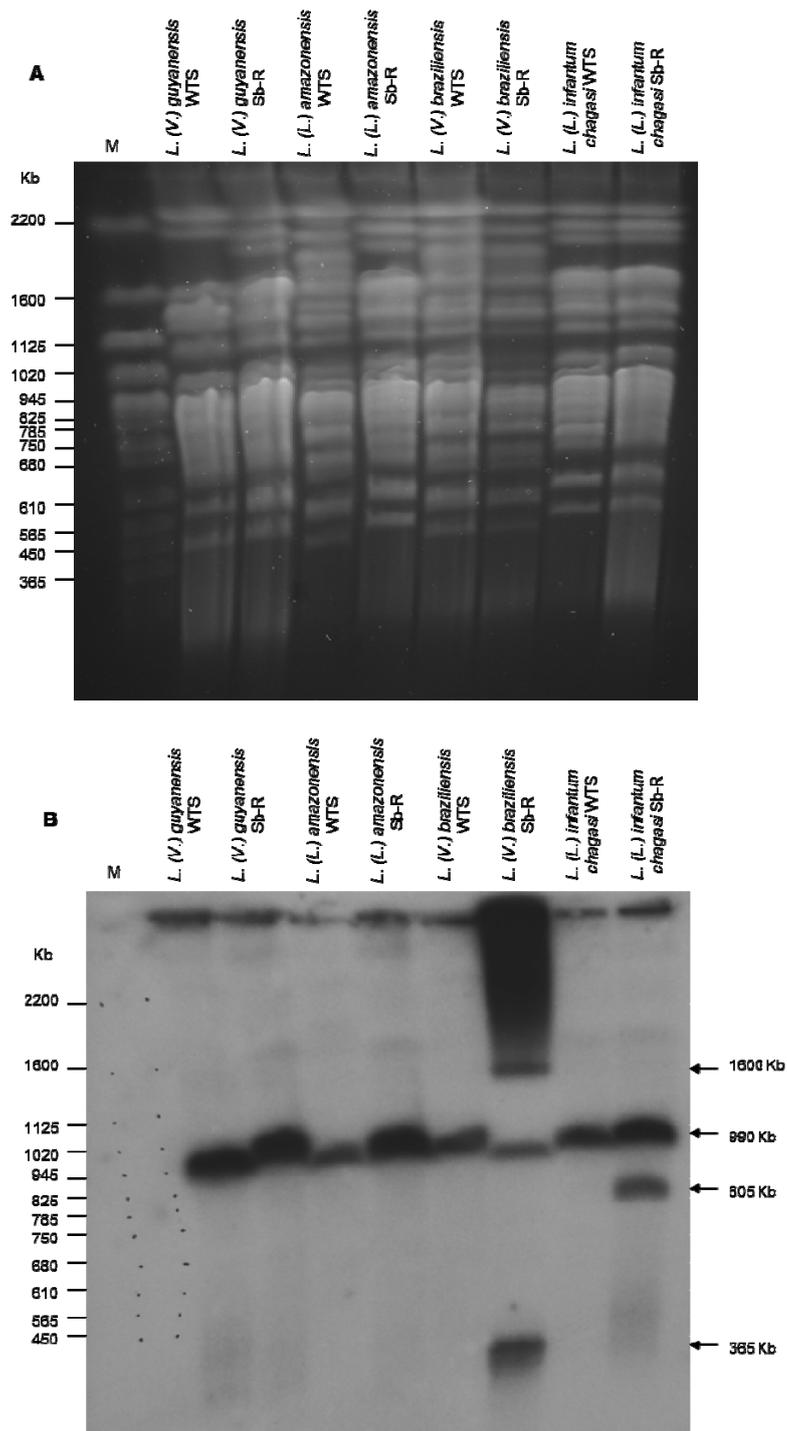


Figura 11: Localização cromossômica do gene MRPA em diferentes populações sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R) de *Leishmania*. (A) Bandas cromossômicas de *Leishmania* spp. separadas por PFGE e coradas com brometo de etídio. (B) Perfil das bandas cromossômicas hibridizadas com sonda do gene MRPA marcada com α [32 P]dCTP. Cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizados como marcador de peso molecular (M).

5.2 Amplificação extracromossomal do gene MRPA em *Leishmania* spp.

Para investigar a presença de amplificação extracromossomal do gene MRPA, formas promastigotas das quatro espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII foram cultivadas. Os sedimentos obtidos (cerca de 1×10^9 parasitos) a partir dessas culturas foram submetidos à lise alcalina e, posteriormente, à corrida eletroforética em gel de agarose 1% (Fig. 12A). Foi feita a transferência para membrana de náilon e hibridização com a sonda do gene MRPA marcada com $\alpha[^{32}\text{P}]d\text{CTP}$.

Os resultados mostraram a presença de uma banda de aproximadamente 12.0 Kb do gene MRPA apenas na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao antimonial trivalente. Como controle de amplificação extracromossomal, utilizamos neste ensaio uma amostra de *L. (L.) infantum* (JPCM5) resistente a 2000 μM de SbIII obtida *in vitro* (Denise *et al.*, 2006) (gentilmente cedida pelo colaborador Dr. Rubens do Monte Neto) (Fig. 12B). Como já foi descrito na literatura esta amostra de *Leishmania* também apresenta amplificação extracromossomal do gene MRPA, confirmando os nossos resultados de amplificação deste gene na população de *L. (V.) braziliensis* resistente (LbSbR).

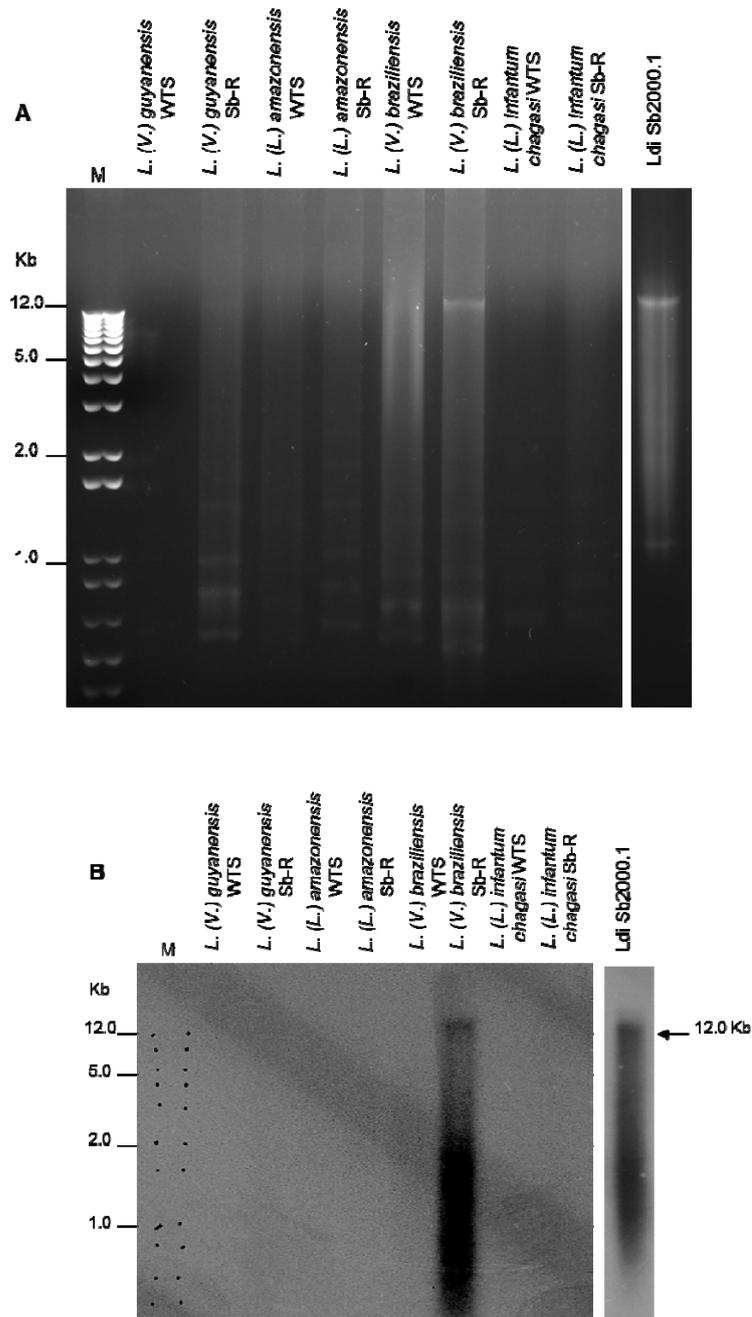


Figura 12: Amplificação extracromossomal em *L. (V.) braziliensis*. (A) Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando os perfis de DNA submetido à lise alcalina usando o KIT Promega de extração de plasmídeos das diferentes espécies de *Leishmania* sensíveis (WTS) e resistentes ao SbIII (Sb-R). (B) Perfil da banda de DNA hibridizada com sonda específica para o gene MRPA marcada com $\alpha[^{32}\text{P}]d\text{CTP}$. M e Ldi Sb2000.1 (*L. (L.) infantum* (JPCM5) resistente ao SbIII) representam, respectivamente, o padrão de peso molecular e o controle utilizados neste experimento.

5.3 Análise de amplificação do gene MRPA

A análise de amplificação do gene MRPA, em diferentes espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII, foi realizada através de ensaios de Southern blot. Para isso, o DNA genômico das oito populações de *Leishmania* foi digerido com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Os produtos da digestão com essas enzimas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Figuras 13A e 14A), transferidos para membranas de náilon e hibridizados com sonda específica para o gene MRPA marcada com α [³²P]dCTP.

A enzima de restrição *Bam*HI apresenta único sítio de clivagem no interior do gene MRPA. O perfil do Southern blot com essa enzima mostrou que a sonda reconheceu um fragmento de 11.0 Kb em todas as populações analisadas (Fig. 13B). Após normalização do resultado com sondado gene RNA ribossomal (Fig. 13C), a análise de densitometria indicou que a intensidade deste fragmento foi 2X, 3X, 10X e 2X maior nas amostras resistentes ao SbIII de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, quando comparadas aos seus pares selvagens, respectivamente. Outro fragmento de cerca de 5.0 Kb foi observado nas populações sensíveis e resistentes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, e apenas nas populações resistente de *L. (V.) guyanensis* e sensível de *L. (V.) braziliensis* (Fig. 13B). A intensidade deste fragmento mostrou um aumento de 3X na população de *L. (L.) amazonensis* resistente ao SbIII, quando comparado com seu par sensível LaWTS. Estes dados sugerem que o gene MRPA está amplificado no genoma das amostras de *Leishmania* resistentes ao SbIII.

Por outro lado, o Southern blot utilizando a enzima *Hind*III, que não possui sítio de restrição na sequência do gene MRPA, apresentou um polimorfismo de sequência deste gene entre as amostras de *Leishmania* analisadas (Fig. 14B). Em relação à espécie de *L. (V.) guyanensis*, foi observado um fragmento de aproximadamente 12.0 Kb de igual intensidade em ambas populações LgWTS e LgSbR. Por outro lado, um fragmento de 4.5 Kb foi observado na população sensível LgWTS e outro de 8.0 Kb na população resistente LgSbR. Na espécie *L. (L.) amazonensis*, diferentes perfis de hibridização foram observados entre as amostras LaWTS e LaSbR. Na população sensível, um único fragmento de 10.0 Kb foi reconhecido pela sonda MRPA. Já na população resistente LaSbR, fragmentos de 8.0 e 12.0 Kb foram visualizados na membrana. Em ambas populações LbWTS e

LbSbR de *L. (V.) braziliensis*, um único fragmento de 10.0 Kb foi reconhecido pela sonda. Após normalização do resultado com sonda do gene RNA ribossomal (Fig. 14C), a análise densitométrica mostrou que a intensidade deste fragmento foi 10X maior na população resistente LbSbR, quando comparado com seu par sensível LbWTS. Em relação a espécie *L. (L.) infantum chagasi*, fragmentos de 8.0 e 12.0 Kb de mesma intensidade foram reconhecidos pela sonda MRPA, em ambas populações LicWTS e LicSbR.

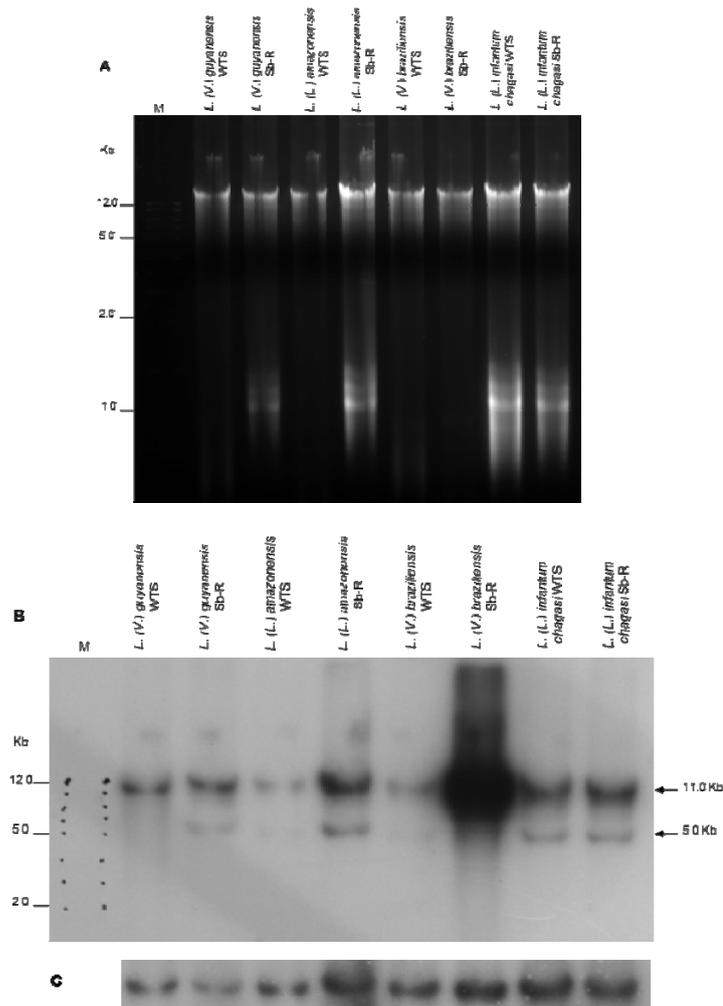


Figura 13: Análise de Southern blot do gene MRPA em amostras de *Leishmania* sensíveis (WTS) e resistentes ao SbIII (Sb-R). (A) DNA total de *Leishmania* spp. digerido com a endonuclease *Bam*HI e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e, posteriormente, corado com brometo de etídio. (B) Perfil das bandas hibridizadas com sonda específica do gene MRPA marcada com α [³²P]dCTP. (C) Resultado normalizado com sonda do gene RNA ribossomal. M representa o padrão de peso molecular utilizado neste ensaio.

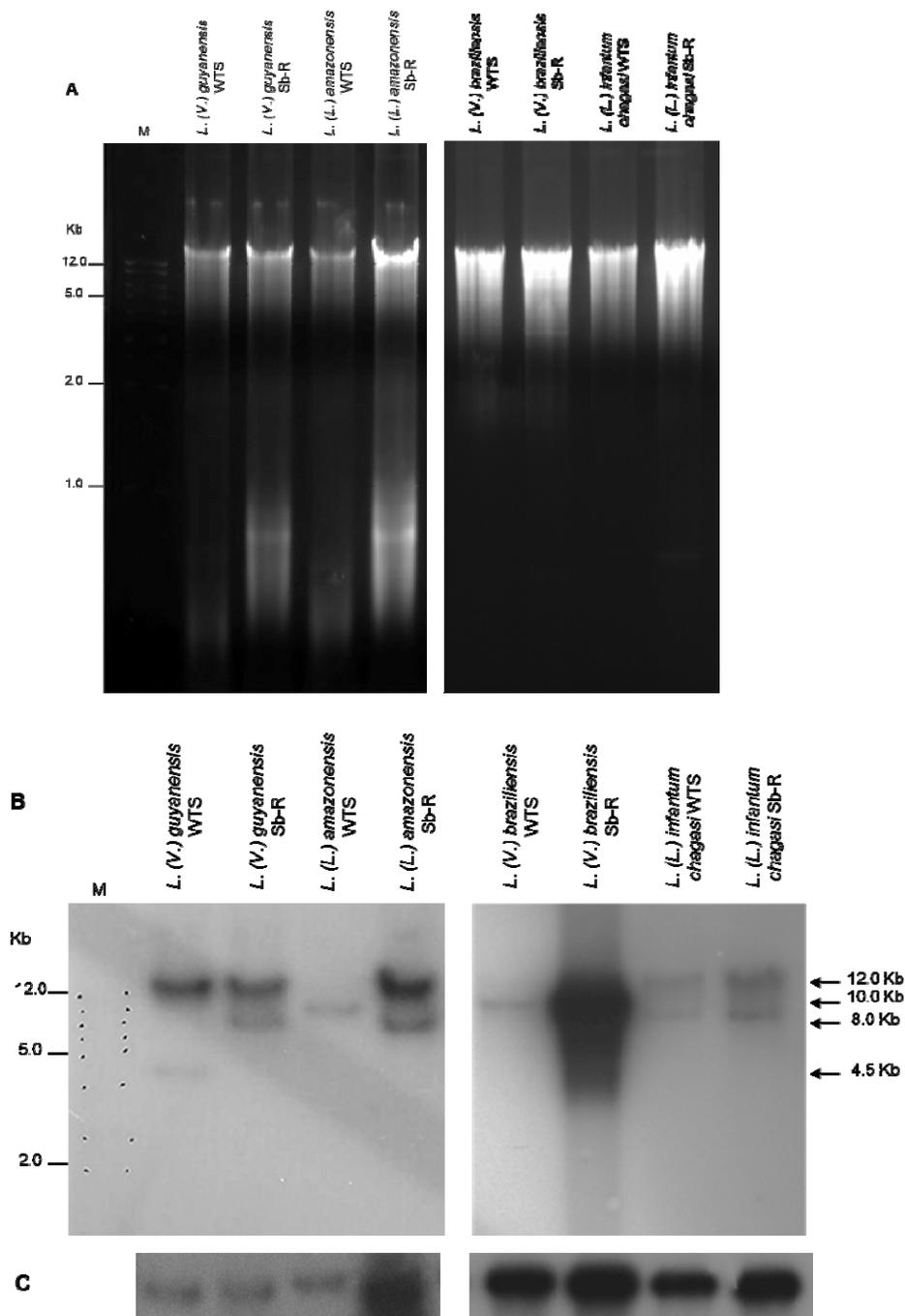


Figura 14: Southern blot do gene MRPA em populações de *Leishmania* sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R). (A) DNA genômico de *Leishmania* spp. digerido com a endonuclease *Hind*III e submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1% e, posteriormente, corado com brometo de etídio. (B) Southern blot foi hibridizado com sonda específica do gene MRPA marcada com α [32 P]dCTP. (C) Resultado normalizado com sonda do gene RNA ribossomal. M representa o padrão de peso molecular utilizado neste experimento.

5.4 Nível de mRNA dos genes MRP e MRPA

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizada com a finalidade de quantificar o nível de mRNA dos genes MRP e MRPA nas diferentes espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente. A quantificação por qPCR é determinada pela relação entre o número de moléculas nas diferentes amostras, de acordo com o ciclo da reação. Ou seja, a intensidade de fluorescência de cada amostra, que é proporcional à quantidade de cDNA, é expressa pelo valor do ciclo da PCR, tendo como base de análise o Ct (*cycle threshold*). Dessa maneira, quanto menor o Ct, maior o número de moléculas de cDNA amplificadas e vice-versa. O número de moléculas de cDNA nas populações estudadas foi normalizado utilizando o gene constitutivo da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU). Nesta análise, foi obtida uma curva padrão utilizando diluições seriadas (10^7 a 10^2 moléculas) de plasmídeos contendo os genes SSU, MRP e MRPA clonados no vetor pCR2.1 TOPO. Nos resultados, pode-se observar que as curvas padrões apresentaram boa linearidade para esses genes ($r^2=0.993$ para SSU, $r^2=0.991$ para MRP e $r^2=0.997$ para MRPA). Além disso, o *slope* indica a eficiência de amplificação da PCR. Um valor de *slope* próximo a -3.32 indica uma eficiência de 100%. Os dados obtidos de *slope* foram de -3.30, -3.22 e -3.33 para os genes SSU, MRP e MRPA, respectivamente (Figuras 15A, 16A e 17A).

Nos ensaios de qPCR, a detecção das moléculas de cDNA amplificadas foi determinada através da utilização do SYBR green I. Esse composto é um fluoróforo que se intercala preferencialmente em moléculas de DNA dupla fita, detectando não apenas alvos específicos, mas também dímeros de iniciadores e produtos de PCR não específicos. Dessa forma, a especificidade da PCR foi analisada através da curva de dissociação das amostras de cada gene estudado. Os gráficos de dissociação obtidos para os produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes SSU, MRP e MRPA apresentaram apenas um pico. Isso demonstra que o corante fluorescente foi emitido em apenas uma temperatura, sugerindo que somente um produto específico foi amplificado (Figuras 15B, 16B e 17B).

A quantidade de cDNA amplificada nas diferentes amostras de *Leishmania* spp. foi determinada pela análise de regressão linear, utilizando os valores de Ct obtidos a partir da curva padrão gerada com as quantidades conhecidas dos

plasmídeos dos genes MRP e MRPA, normalizados com os valores de SSU. Os dados mostram uma diferença do nível de mRNA para os genes MRP e MRPA nas espécies analisadas. O nível de mRNA do gene MRP apresentou um aumento de 3X, 42X, 3X e 2X em todas as populações de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* resistentes ao SbIII respectivamente, quando comparado aos seus respectivos tipos selvagens (Fig. 18A). É interessante observar que o nível de expressão de mRNA do gene MRPA também está aproximadamente duas vezes aumentado nas populações de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* resistentes ao SbIII, quando comparadas com seus respectivos pares sensíveis. Entretanto, nossos resultados não foram conclusivos quanto ao nível de expressão de mRNA deste gene para a espécie *L. (V.) guyanensis*, e não foi observada diferença de expressão entre as populações sensível e resistente de *L. (L.) infantum chagasi* (Fig. 18B).

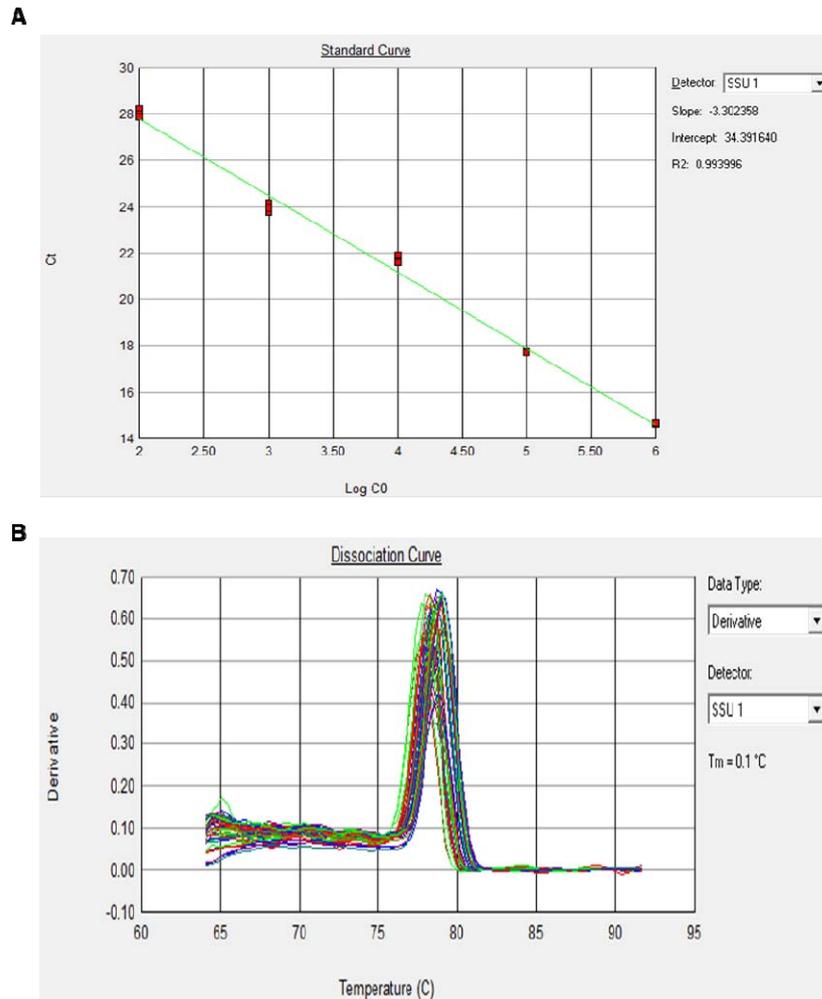


Figura 15: Amplificação do gene SSU (normalizador) por qPCR em diferentes espécies de *Leishmania*. (A) Curva padrão feita com diluições seriadas ao décimo de plasmídeos contendo o gene SSU. (B) Curva de dissociação do gene SSU.

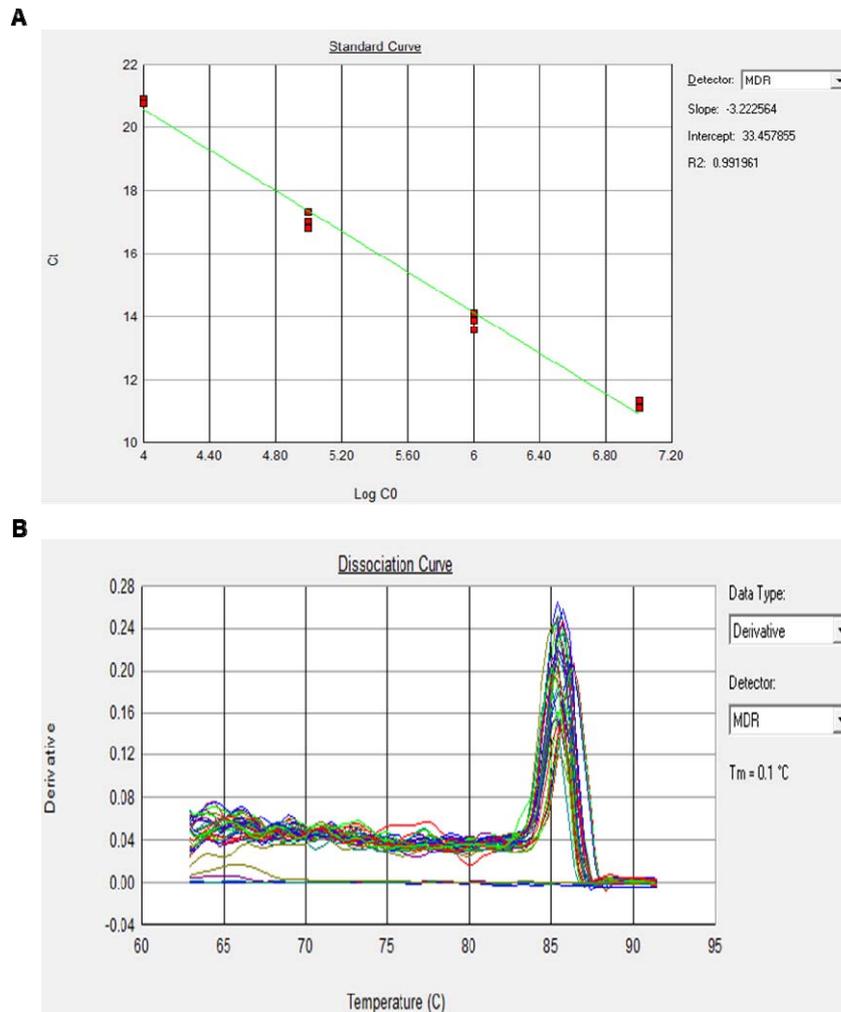


Figura 16: Amplificação do gene MRP por qPCR em diferentes espécies de *Leishmania*. (A) Curva padrão feita com diluições seriadas ao décimo de plasmídeos contendo o gene MRP. (B) Curva de dissociação do gene MRP.

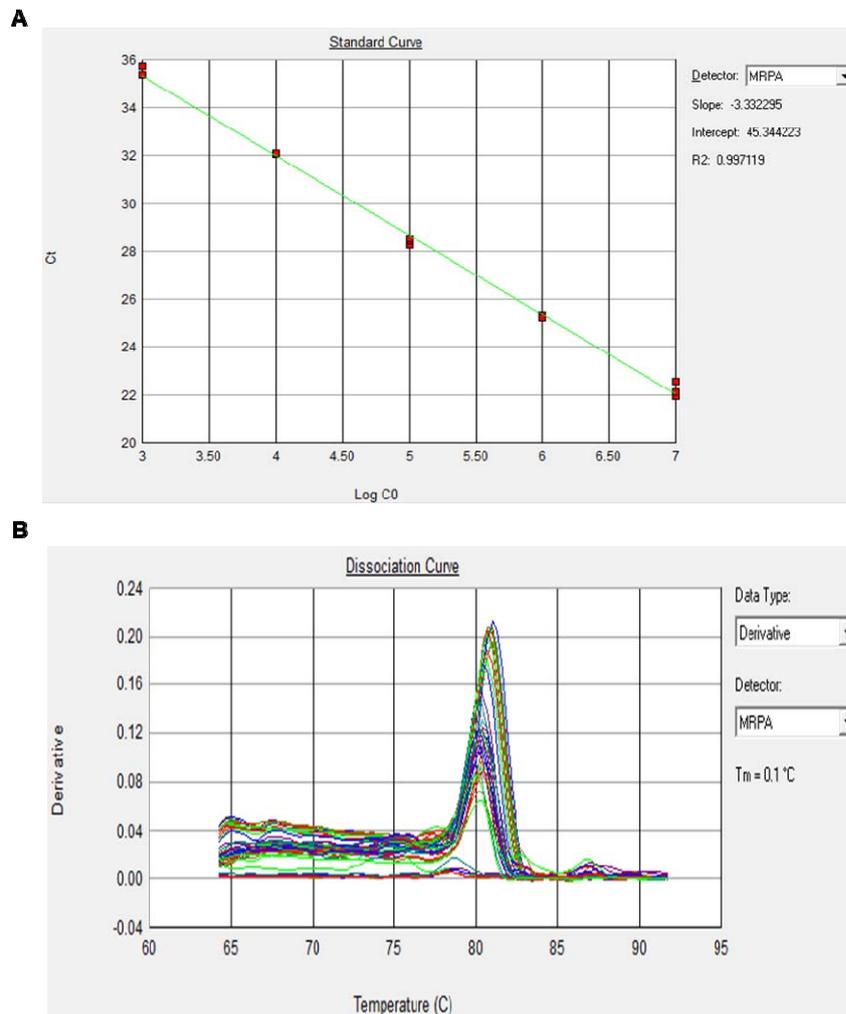


Figura 17: Amplificação do gene MRPA por qPCR em diferentes espécies de *Leishmania*. (A) Curva padrão feita com diluições seriadas ao décimo de plasmídeos contendo o gene MRPA. (B) Curva de dissociação do gene MRPA.

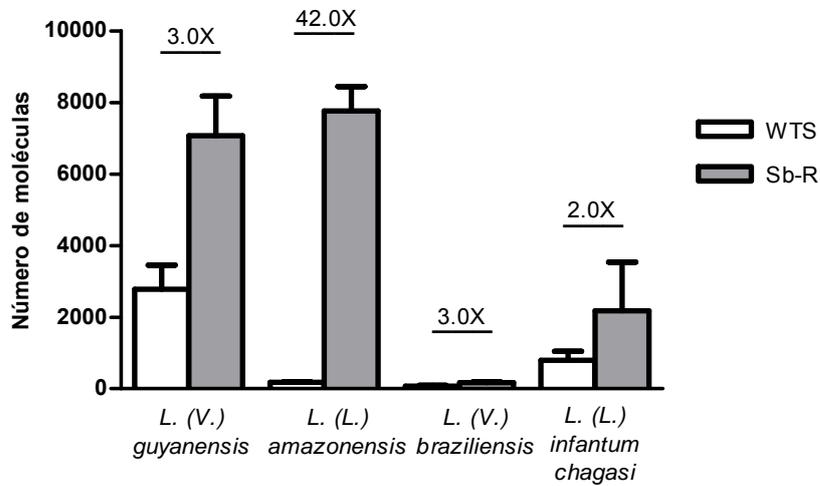
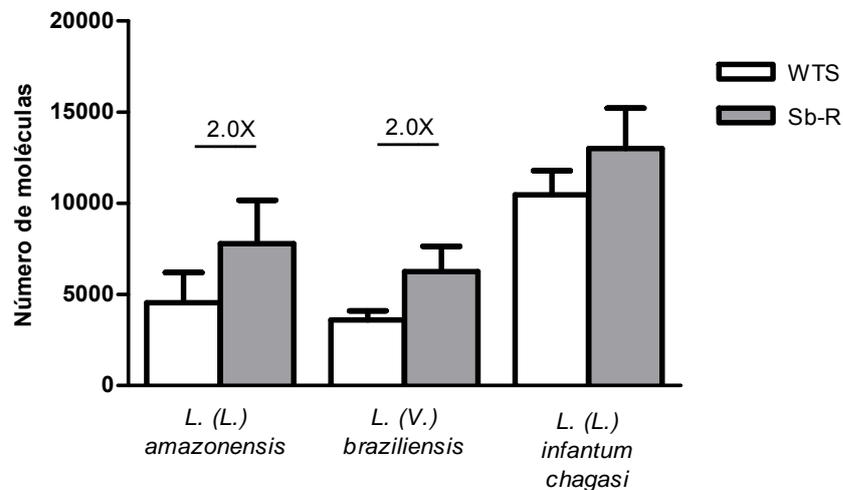
A**B**

Figura 18: Nível de mRNA dos genes MRP e MRPA em espécies de *Leishmania* sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R). Diluições seriadas de construções de plasmídeos contendo fragmentos de DNA que codificam MRP, MRPA e SSU (normalizador) foram utilizados para quantificar o nível de expressão dos genes MRP (A) e MRPA (B) em diferentes amostras de *Leishmania* por qPCR. Barras representam o número médio de moléculas e o erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os números acima de cada barra indicam a razão entre o número de moléculas de populações Sb-R e WTS.

5.5 Nível de expressão da proteína Pgp

Ensaio de Western blot foram utilizados para avaliar o nível de expressão da proteína Pgp nas quatro espécies de *Leishmania* deste estudo. Para isso, extratos de proteínas totais das populações de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. O perfil eletroforético das proteínas coradas com azul de Coomassie demonstrou a presença de proteínas com massa molecular variando de 37 a 250 kDa (Fig. 19A). Outro gel foi utilizado para transferir as proteínas totais para uma membrana de nitrocelulose e posterior incubação com o anticorpo monoclonal C219 (Abcam Ind, Cambridge MA, USA) na diluição 1:100. Esse anticorpo é dirigido contra o domínio citoplasmático de Pgp de mamífero.

Os resultados obtidos através da revelação por quimioluminescência mostraram que o anticorpo anti-Pgp reconheceu um polipeptídeo de aproximadamente 170 kDa em algumas amostras analisadas. Conforme dados da literatura, este polipeptídeo corresponde ao tamanho esperado para a proteína Pgp (Cornwell *et al.*, 1987). Na figura 19B, pode-se observar que a proteína Pgp foi reconhecida apenas nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, demonstrando que a Pgp está mais expressa nestas populações resistentes. Por outro lado, ambas populações sensível e resistente de *L. (L.) infantum chagasi* apresentaram o mesmo nível de expressão da Pgp, devido a mesma intensidade deste polipeptídeo nestas duas populações. Posteriormente, a membrana será incubada com anticorpo anti-tubulina para normalizar a quantidade de proteína analisada das diferentes populações de *Leishmania*.

É importante salientar também que o anticorpo anti-Pgp não reconheceu a proteína de 170 kDa em nenhuma das populações de *L. (V.) braziliensis*. Este resultado pode ser devido à ausência de superexpressão da proteína Pgp na população resistente LbSbR não conseguindo ser detectada, ou devido a falha de reconhecimento do anticorpo pela proteína Pgp. Outra hipótese seria em relação ao resultado de análise de expressão do gene MRP por qPCR, uma vez que ele mostrou que em *L. (V.) braziliensis* o número de moléculas do transcrito deste gene é bem menor, comparado com as outras espécies. Diante disto, outra explicação para este resultado pode ser devido à quantidade de proteína Pgp ser bem menor nesta espécie e, mesmo tendo algum aumento de expressão, o anticorpo não

conseguiu detectar. Além disso, pode ter ocorrido alteração na sequência de aminoácidos na região do epítipo da proteína e, provavelmente, não houve reconhecimento do anticorpo por esta proteína.

Adicionalmente, o anticorpo C219 reconheceu além da Pgp outro polipeptídeo de cerca de 48 kDa nas amostras sensíveis e resistentes de *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, e apenas na população resistente de *L. (L.) amazonensis* (Fig. 19B).

Devido ao fato da Pgp ser uma glicoproteína transmembrana, foi levantada a hipótese se o protocolo utilizado para a extração das proteínas totais do parasito teria sido mais adequado para investigar o nível de expressão desse polipeptídeo nas diferentes amostras analisadas. Dessa forma, foi utilizado o protocolo descrito por Grogl *et al.* (1991) para se obter as frações enriquecidas de proteínas de membrana separadamente das frações de proteínas solúveis. Após a extração, as frações de proteínas de membrana das espécies de *Leishmania* foram submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose para incubação com o anticorpo C219. Entretanto, os resultados de Western blot obtidos não diferiram daqueles apresentados anteriormente utilizando as proteínas totais (resultados não mostrados).

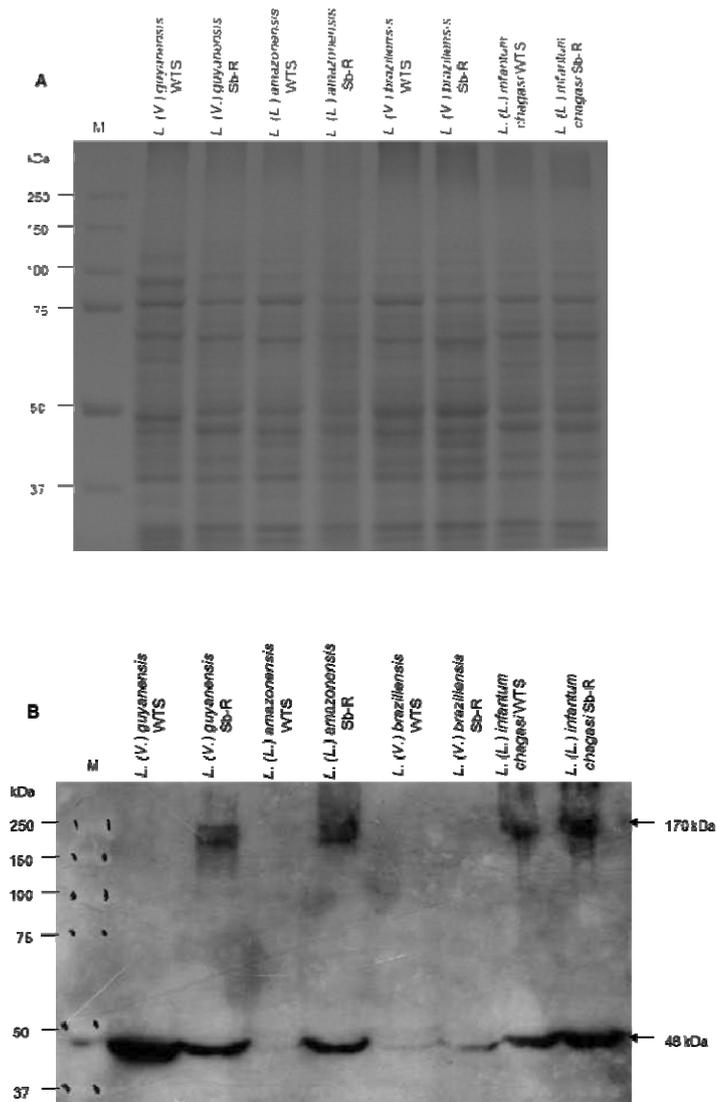


Figura 19: Nível de expressão da proteína Pgp em *Leishmania* spp. (A) Perfil eletroforético de proteínas totais de populações de *Leishmania* sensíveis (WTS) e resistentes ao SbIII (Sb-R). Proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 12% e corado com azul de Coomassie. (B) Análise de Western blot utilizando o anticorpo monoclonal C219. M representa o padrão de peso molecular utilizado.

5.6 Análise do nível intracelular de antimônio

Neste estudo, formas promastigotas de diferentes amostras de *Leishmania* spp., sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente, foram expostas ao SbIII na presença de tampão HG, como descrito na Metodologia. Posteriormente, o nível intracelular de SbIII desses parasitos foi quantificado por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

Foi observada uma diferença de incorporação de SbIII nas populações estudadas, como apresentado na figura 20. A redução da incorporação desse antimônio trivalente foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em três das quatro espécies analisadas. Os dados mostram que os níveis de SbIII foram aproximadamente 7X, 5X e 2X menores nas populações resistentes ao SbIII de *L. (V.) guyanensis* (Fig. 20A), *L. (L.) amazonensis* (Fig. 20B) e *L. (V.) braziliensis* (Fig. 20C), respectivamente, quando comparadas aos seus respectivos pares sensíveis. Entretanto, as populações sensível e resistente de *L. (L.) infantum chagasi* (Fig. 20D) não apresentaram diferença estatisticamente significativa de incorporação de SbIII.

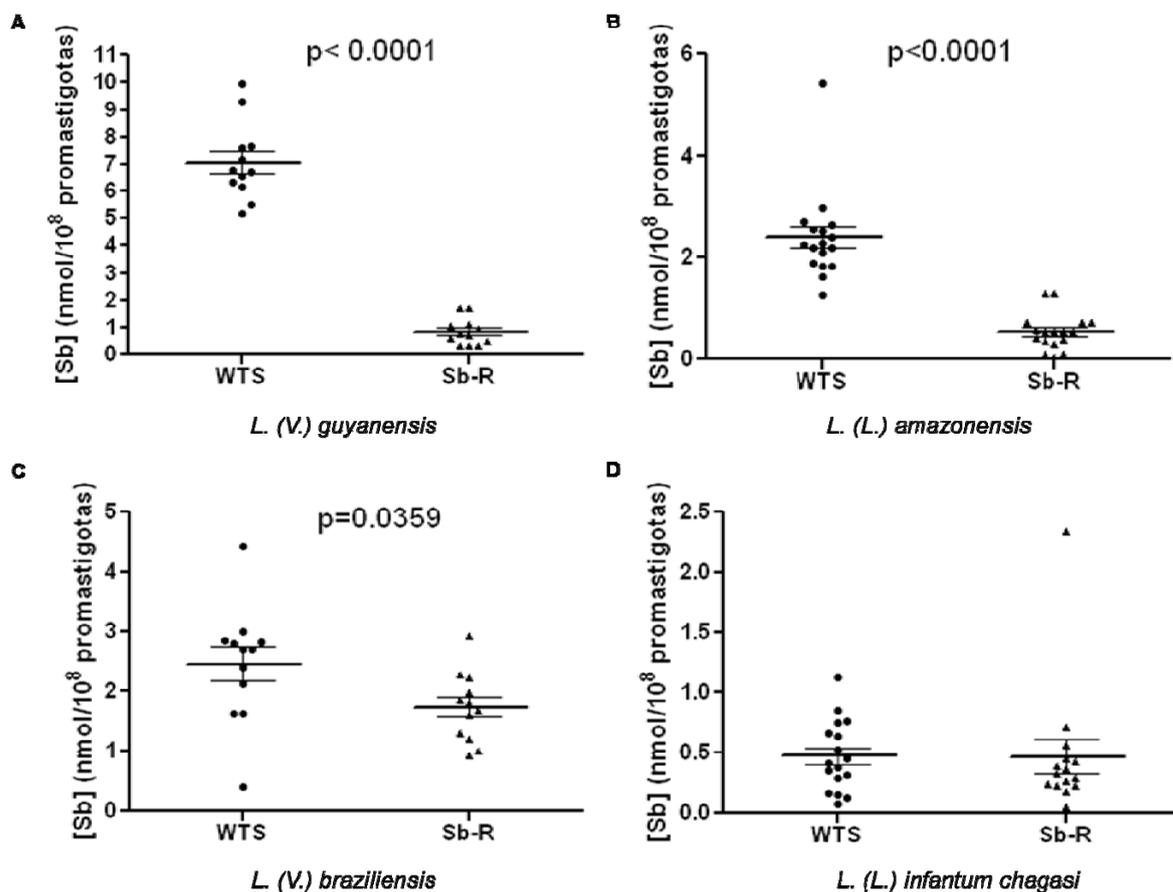


Figura 20: Níveis de SbIII em formas promastigotas de populações de quatro espécies de *Leishmania* sensíveis (WTS) e resistentes ao antimônio trivalente (Sb-R). O nível intracelular de SbIII foi quantificado por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, e as diferenças nos níveis intracelulares de SbIII entre as populações WTS e Sb-R foram analisadas, utilizando o teste *t* Student. Os valores obtidos de três experimentos independentes em quadruplicata, a concentração média de SbIII e o erro padrão da média, e o valor *p* estão representados em cada gráfico para as espécies *L. (V.) guyanensis* (A), *L. (L.) amazonensis* (B), *L. (V.) braziliensis* (C) e *L. (L.) infantum chagasi* (D).

5.7 Resultados gerais

A tabela 5 sintetiza os resultados obtidos de amplificação do gene MRPA, níveis de expressão de mRNA dos genes MRPA e MRP, níveis de expressão da proteína Pgp e dosagem intracelular de SbIII para as quatro espécies de *Leishmania* analisadas neste estudo.

TABELA 5 – Síntese dos resultados encontrados neste estudo

Ensaio Espécies	Amplificação DNA (MRPA)	Amplificação extracromossomal	mRNA		Proteína Pgp	Dosagem SbIII
			MRPA	MRP		
<i>L. (V.) guyanensis</i>	2X	Ausente	NC	3X	Maior R	Menor R
<i>L. (L.) amazonensis</i>	3X	Ausente	2X	42X	Maior R	Menor R
<i>L. (V.) braziliensis</i>	10X	Presente	2X	3X	NC	Menor R
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	2X	Ausente	Igual	2X	Igual	Igual

NC: Não Conclusivo / R: Resistente.

6 DISCUSSÃO

Protozoários parasitos da família Trypanosomatidae são responsáveis por doenças graves que afetam milhares de pessoas nos países em desenvolvimento (WHO, 2011). Essas doenças incluem as leishmanioses, que constituem um grande problema de saúde pública nesses países. O controle da doença é baseado principalmente no tratamento quimioterápico, através da administração de drogas, os antimoniais pentavalentes, que são citotóxicos ao parasito *Leishmania*. Esses compostos foram introduzidos nos anos de 1940 e, em alguns países, ainda são eficazes contra todas as formas da doença. No entanto, a alta toxicidade desses fármacos, a necessidade de prolongados períodos de tratamento e o aumento do surgimento de parasitos resistentes dificultam o sucesso terapêutico.

Estudos *in vitro* têm mostrado que *Leishmania* pode desenvolver resistência quando cultivada na presença de antimoniais pentavalentes (Grogl *et al.*, 1989). Linhagens celulares desse parasito com diferentes índices de resistência a essas drogas têm sido desenvolvidas para ambos estágios promastigota e amastigota (Grogl *et al.*, 1989, Ephros *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria dos experimentos de resistência *in vitro* é realizada com formas promastigotas, que são mais fáceis de cultivar e quantificar do que amastigotas. É importante ressaltar que essas formas promastigotas, todavia, não representam o estágio parasitário sobre o qual os antimonais atuam *in vivo* (Jeddi *et al.*, 2011). A utilização do antimônio trivalente (SbIII), que não é a forma prescrita clinicamente, mas que representa a forma biologicamente ativa da droga, permite a seleção de populações resistentes do parasito para o estudo de diferentes mecanismos envolvidos na resistência em *Leishmania*. Dessa forma, neste trabalho foram utilizadas amostras de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII com o objetivo de caracterizar transportadores ABC através de diversas técnicas moleculares, bem como determinar o nível intracelular da droga nessas populações.

Em vários microrganismos, transportadores de membrana mostram um papel fundamental na resistência à droga. A superfamília de transportadores ABC apresenta um conjunto de proteínas envolvidas na resistência através do efluxo ou sequestro da droga. Sistema de bombas de efluxo foi descrito pela primeira vez em células tumorais e o fenótipo derivado foi denominado como resistência a múltiplas drogas (MDR). Este nome é devido ao fato das células apresentarem resistência cruzada a compostos citotóxicos que compartilham pouca ou nenhuma similaridade estrutural e funcional (Gros e Buschman, 1993). Em *Leishmania*, oito subfamílias de

genes transportadores ABC, presentes entre 19 cromossomos diferentes, foram identificados quando o genoma completo de *L. (L.) major* foi comparado com sequências de proteínas ABC (Leprohon *et al.*, 2006). Duas subfamílias desses transportadores mostram envolvimento na resistência do parasito: transportadores com alta similaridade a fosfoglicoproteínas de mamíferos que conferem fenótipo MDR similar ao observado em células cancerosas, e transportadores homólogos a proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRP) em humanos (Légaré *et al.*, 1994). MRPA é um dos transportadores ABC mais estudados em *Leishmania* e seu papel na resistência é bem relatado *in vitro* (Ouellette *et al.*, 1990). Esse gene está frequentemente amplificado em células de *Leishmania* selecionadas para resistência a drogas contendo arsenito ou antimônio (Detke *et al.*, 1989; Ouellette *et al.*, 1991; Grondin *et al.*, 1993; Ferreira-Pinto *et al.*, 1996; Légaré *et al.*, 1997; Haimeur *et al.*, 2000).

Em nosso trabalho, o estudo da localização do gene MRPA nas diferentes amostras de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII foi realizado através da eletroforese de pulso alternado (PFGE). Esta técnica permite observar diferenças nos cromossomos de diferentes populações por meio da variação do tempo de pulsos. Estudo da variação no cariótipo tem sido previamente investigado em *Leishmania* spp. (Rovai *et al.*, 1992). Estas variações podem ocorrer espontaneamente durante o cultivo prolongado *in vitro* e/ou durante a seleção de parasitos resistentes a drogas. Nossos resultados mostraram uma separação dos cromossomos de 365 a 2200 Kb das amostras analisadas. Além disso, foi observado que a sonda específica para o gene MRPA reconheceu uma banda de 990 Kb em todas as populações estudadas. Entretanto, a diferença de intensidade dessa banda foi maior apenas na população de *L. (L.) amazonensis* resistente ao SbIII, quando comparada ao seu respectivo par sensível. Este resultado sugere que exista uma amplificação cromossomal deste gene nesta população resistente de *Leishmania*. Ainda, a sonda MRPA reconheceu duas bandas de tamanhos cromossômicos diferentes (365 e 1600 Kb) na amostra resistente de *L. (V.) braziliensis*. Esta banda cromossomal de menor tamanho demonstra que o gene MRPA, provavelmente, está presente em uma amplificação extracromossomal nesta espécie de *Leishmania*. Além disso, outra hipótese é que a presença da banda cromossomal de 1600 Kb seja parte de uma amplificação também extracromossomal, proveniente de um círculo contateno a outra banda de 365 Kb nesta população resistente de *L. (V.)*

braziliensis. É importante salientar também que a sonda MRPA reconheceu uma banda de 805 Kb somente na população de *L. (L.) infantum chagasi* resistente ao antimônio trivalente. Está descrito na literatura que a variabilidade na localização cromossômica pode ser devido à presença de cromossomos homólogos de diferentes tamanhos, variação no tamanho das regiões teloméricas ou a pequenas deleções ou inserções (Murta *et al.*, 2006). A presença de duas bandas cromossômicas na população de *L. (L.) infantum chagasi* resistente ao SbIII, pode ser devido à presença do gene MRPA em dois cromossomos de diferentes tamanhos. Além de estar presente na banda cromossomal de 990 Kb, ele está inserido na banda de 805 Kb. Esses resultados de localização do gene por PFGE são um indicativo da associação da amplificação cromossomal e extracromossomal do gene MRPA, com o fenótipo de resistência à droga nessas espécies de *Leishmania* estudadas.

A amplificação extracromossomal do gene MRPA foi, posteriormente, investigada nestas diferentes populações de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente. Nesta análise, os parasitos foram submetidos à lise alcalina. Nossos resultados mostraram a presença de amplificação extracromossomal deste gene somente na população resistente de *L. (V.) braziliensis*. Anacleto *et al.* (2003) relataram a presença de amplificon extracromossomal de 30 Kb que contém o gene *PgpA* em amostras de *L. (V.) guyanensis* com resistência induzida *in vitro* ao glucantime. Através de experimentos de transfecção do gene *PgpA* (MRPA) nas amostras desta espécie de *Leishmania*, esses autores também mostraram que a amplificação deste gene é determinante na resistência ao glucantime. Todavia, Moreira *et al.* (1998) analisaram 13 amostras de *Leishmania* do Novo Mundo (*L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*) isoladas de pacientes, reservatórios silvestres e vetores. Apenas cinco destes isolados estudados foram considerados resistentes, dos quais quatro foram obtidos de vetores e apenas um isolado obtido de paciente com infecção mucocutânea, que não respondeu ao tratamento com glucantime. Dessa maneira, os resultados destes autores demonstraram a ausência de amplificação com sonda específica para o gene *PgpA*, sugerindo que a amplificação deste gene não está envolvida na resistência ao glucantime nestas amostras de isolados estudadas. Chiquero *et al.* (1998) mostraram a presença de DNA circular extracromossomal, que contém o gene *Ltrmdr1*, em *L. (L.) tropica* resistentes à daunomicina.

Estudos anteriores sobre resistência aos antimoniais indicaram um aumento de expressão do transportador MRPA (Haimeur *et al.*, 2000; El Fadili *et al.*, 2005; Papadopoulou *et al.*, 1994). Em *Leishmania*, a resistência aos antimoniais está relacionada com a amplificação de genes e a formação de amplicons extracromossômicos (Ouellette e Borst, 1991; Grondin *et al.*, 1993). O gene MRPA está frequentemente localizado em uma amplificação extracromossomal, conhecida como círculo H (Ouellette *et al.*, 1990; Légaré *et al.*, 1994; Légaré *et al.*, 1997; Haimeur *et al.*, 2000; Guimond *et al.*, 2003; El Fadili *et al.*, 2005), que inicialmente pertence a um *locus* no cromossomo 23. Esse *locus* é flaqueado em cada lado por sequências repetidas de 1.389 pb, que apresentam uma homologia de 100% na sequência de *L. (L.) infantum* selecionada para resistência ao SbIII (Leprohon *et al.*, 2009). Essas repetições também foram encontradas no mesmo cromossomo de *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis* (Dias *et al.*, 2007). No entanto, foram localizadas em amplicon linear de *L. (L.) mexicana* selecionada para resistência ao arsenito (Légaré *et al.*, 1997). O gene MRPA está frequentemente amplificado/superexpresso em cepas resistentes a metais pesados (Guimond *et al.*, 2003; Leprohon *et al.*, 2009). O nível de resistência está associado à amplificação como demonstrado por um estudo comparativo entre *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis* selecionadas para resistência *in vitro* aos antimoniais (Dias *et al.*, 2007).

Monte Neto *et al.* (2011) observaram amplificação do gene MRPA devido à presença de amplicons lineares extracromossomais em alguns mutantes de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao SbIII. Amplificação gênica também tem sido relatada em isolados clínicos (Segovia, 1994; Singh *et al.*, 2003). Mukherjee *et al.* (2007) verificaram se o gene MRPA estava amplificado nos isolados clínicos de *L. (L.) donovani* resistentes ao estibogluconato de sódio (SAG) estudados. A amplificação desse gene foi observada em três dos quatro isolados clínicos resistentes ao SAG. Os resultados desses autores indicaram a natureza circular dos amplicons encontrados nessas amostras.

Alguns mecanismos para amplificação de DNA têm sido propostos em células de mamíferos (Stark *et al.*, 1989). Um desses mecanismos é a formação de amplicons a partir de precursores denominados epissomas (Carroll *et al.*, 1988; Whal, 1989) ou amplissomas (Pauletti *et al.*, 1990). Esses precursores circulares são menores (120-1.400 Kb) que os amplicons finais e são constituídos por repetições diretas ou invertidas (Whal, 1989). Mecanismos de amplificação têm sido estudados

no parasito *Leishmania* e envolvem recombinação entre sequências homólogas repetidas para produzir amplicons circular ou linear (Ouellette *et al.*, 1991; Grondin *et al.*, 1996). Em cepas de *Leishmania* resistentes à droga, amplicons são, geralmente, pequenos círculos extracromossômicos (30-120 Kb) que podem ter repetições diretas ou invertidas (Beverley *et al.*, 1984; Ouellette *et al.*, 1991; Stuart 1991). O tamanho dos amplicons encontrados em *Leishmania*, assim como o pequeno tamanho do genoma desse parasito (5×10^7 pb), torna a visualização e caracterização de amplicons mais fácil do que em células de mamíferos.

Sampaio e Traub-Cseko (2003) relataram a presença de amplificação do transportador de bioterina em um cromossomo linear e estável de 245 Kb em *L. (V.) braziliensis* (cepa M2903). Segundo esses autores, essa amplificação pode estar relacionada à necessidade do parasito capturar melhor a bioterina presente no meio, sob circunstâncias específicas como em condições de falta de nutrientes. No entanto, os resultados obtidos por Dias e colaboradores (2007) sugerem que em *L. (V.) braziliensis* a geração de amplicons não é comum quando essa espécie é submetida à pressão de drogas. De acordo com esses autores a menor tolerância à formação de amplicons de DNA indica que *L. (V.) braziliensis* apresenta heterogeneidade fenotípica e mantém sua aptidão em mudanças ambientais, utilizando diferentes mecanismos. Tais mecanismos parecem não incluir rearranjos no genoma e/ou amplificação extracromossomal de genes importantes. Entretanto, nossos resultados mostram que em *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII ocorre amplificação extracromossomal do gene MRPA, corroborando os dados de Sampaio e Traub-Cseko (2003). Uma possível explicação para a ausência de amplificação nas amostras de *L. (V.) braziliensis* analisadas por Dias *et al.* (2007) pode ser devido às diferenças nos níveis de resistência ao SbIII e ao protocolo de obtenção dos parasitos resistentes quando comparado à nossa amostra. Em uma próxima etapa deste nosso estudo, pretendemos sequenciar o genoma completo das populações de *L. (V.) braziliensis* sensível e resistente ao SbIII para analisar melhor estas amplificações gênicas.

Ubeda *et al.* (2008) relataram a existência de outros dois mecanismos de resistência a drogas que normalmente ocorrem em *Leishmania*. Estes mecanismos envolvem eventos de deleção de genes que resultam na diminuição da expressão destes e o envolvimento da aneuploidia no genótipo de resistência à droga. De acordo com Downing *et al.* (2011), aneuploidia parece surgir frequentemente e ser

bem tolerada por *Leishmania*, e o número de cópias dos cromossomos pode variar consideravelmente entre espécies de diversas regiões geográficas. A plasticidade do genoma de *Leishmania* permite o parasito adaptar-se a diferentes ambientes e sobreviver em vários hospedeiros mamíferos e sob seleção de drogas (Leprohon *et al.*, 2009). Rogers *et al.* (2011) identificaram diferenças no número de cópias de genes e de cromossomos entre espécies de *Leishmania* como uma principal fonte de variação genômica. Em *Plasmodium*, o aumento no número de cópias é pequeno (cerca de 2 a 5 vezes) (Cowman e Lew, 1989), enquanto elementos extracromossomais em *Leishmania* podem ser em 100 cópias (Papadopoulou *et al.*, 1993), as quais permitem altos níveis de resistência. Guimond *et al.* (2003) estudaram a modulação da expressão de vários genes em mutantes de *Leishmania* resistentes à droga. Esses autores encontraram genes superexpressos, amplificados ou deletados nesses mutantes e descobriram novos genes nos parasitos resistentes ao metotrexato.

Neste trabalho, a análise de amplificação do gene MRPA também foi investigada utilizando as quatro espécies de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII. Para isso, foram realizados ensaios de Southern blot com o DNA genômico dessas espécies digerido com endonucleases de restrição. Resultados da digestão com *Bam*HI mostraram que a sonda específica para o gene MRPA reconheceu um fragmento de 11.0 Kb, que apresentou maior intensidade em todas as populações resistentes analisadas, em comparação aos seus respectivos pares sensíveis. Além disso, outro fragmento de aproximadamente 5.0 Kb foi reconhecido em algumas das amostras estudadas. Entretanto, análise densitométrica desta banda revelou que o aumento foi expressivo apenas na espécie *L. (L.) amazonensis* resistente ao SbIII. Dessa maneira, nossos dados sugerem que o gene MRPA apresenta pelo menos duas cópias no genoma das espécies estudadas.

Os resultados do Southern blot com a enzima de restrição *Hind*III mostraram um polimorfismo da sequência do gene MRPA nas populações de *Leishmania* estudadas. Foi observado um fragmento de 10.0 Kb de maior intensidade na população resistente de *L. (V.) braziliensis*, quando comparado ao seu tipo selvagem. Estes dados indicam a amplificação do gene MRPA no genoma das amostras resistentes de *Leishmania*, demonstrando a correlação do fenótipo de resistência à droga com o fenômeno de amplificação gênica.

Recentemente, foi demonstrado através de microarranjos de DNA que o transportador MRPA está superexpresso em amastigotas axênicos de *L. (L.) infantum* resistentes ao SbIII (El Fadili *et al.*, 2005). Em 2011, Monte Neto *et al.* relataram superexpressão desse gene em mutantes de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao SbIII, utilizando também microarranjos de DNA. Entretanto, o gene MRPA não apresentou aumento de expressão em estudo de transcriptoma de isolados clínicos de *L. (L.) donovani* resistentes ao antimônio (Decuyper *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, ensaios de qPCR foram realizados para analisar os níveis de mRNA das diferentes populações de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente. Estes ensaios mostraram que os níveis de mRNA do gene MRPA está aumentado cerca de duas vezes nas amostras resistentes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, quando comparadas aos seus pares selvagens. Esses dados apresentam correlação com a amplificação desse gene nessas duas espécies, como demonstrado nos ensaios de Southern blot. Outro transportador ABC, o MRP, também relacionado à subfamília ABCC em *Leishmania*, foi estudado quanto aos níveis de mRNA. Nossos dados revelaram um aumento de 2 a 42 vezes nas quatro espécies de *Leishmania* resistentes ao SbIII. Entretanto, outros estudos não foram conduzidos com esse transportador, o que não nos permite deduzir se existe uma associação desse aumento dos níveis de mRNA com a amplificação deste gene no genoma dos parasitos analisados.

O mecanismo pelo qual RNA é superexpresso não é bem compreendido, uma vez que nenhum promotor foi caracterizado em *Leishmania*. Papadopoulou *et al.* (1998) relataram que considerável regulação ocorre ao nível de maturação (Quijada *et al.*, 1997) e estabilidade (Aly *et al.*, 1994; Svensson *et al.*, 1997) do mRNA, e é possível que o aumento do nível de RNA em mutantes de *Leishmania* resistentes ao arsenito e ao metotrexato é devido a um desses mecanismos. Rogers *et al.* (2011) levantaram a hipótese que *Leishmania*, provavelmente, aumenta os níveis de mRNA na ausência de atividade regulada por promotor utilizando dois mecanismos: duplicação gênica em cromossomos dissômicos, o que pode resultar na geração de arranjos multicópias de genes idênticos ou quase idênticos; número de cópias de genes pode aumentar através da formação de cromossomos supranumerários.

O efluxo de uma droga ou de seus derivados é um mecanismo muito comum de resistência em bactérias, leveduras e fungos, e em vários protozoários

patogênicos como *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis* e também em *Leishmania* (Haldar *et al.*, 2011). A proteína Pgp é um dos principais mediadores desse efeito de efluxo. Essa proteína é um transportador ABC que atua na remoção de compostos tóxicos da célula. Alterações nos níveis de expressão da Pgp estão relacionadas com o fenótipo MDR em células eucarióticas e em diversos parasitos. Em células cancerosas, esse fenótipo está frequentemente associado com a amplificação de genes e com a superexpressão de Pgp (Riordan *et al.*, 1985; Gros *et al.*, 1986). Os resultados obtidos por Messerli *et al.* (2009) mostraram níveis mais elevados de Pgp associado à reduzida susceptibilidade ao praziquantel em *Schistosoma mansoni*. Entretanto, Murta *et al.* (2001) observaram que o fenótipo de resistência do *T. cruzi* ao benzonidazol não está associado com a amplificação ou superexpressão de genes Pgp. A associação da superexpressão do polipeptídeo Pgp na resistência a drogas foi descrita em *Leishmania* resistente ao arsenito e antimoniais (Légaré *et al.*, 2001) e em *P. falciparum* resistente à cloroquina (Cowman *et al.*, 1991).

Para investigar o nível de expressão da proteína Pgp nas quatro diferentes espécies de *Leishmania*, neste estudo foram realizadas análises de Western blot com o anticorpo monoclonal C219 (anti-Pgp). A Pgp é uma glicoproteína transmembrana de 130-200 kDa (Cornwell *et al.*, 1987). Este anticorpo C219 reconhece um epitopo da Pgp muito conservado entre vários organismos. Em algumas de nossas amostras analisadas, o anticorpo anti-Pgp reconheceu um polipeptídeo de aproximadamente 170 kDa, correspondente ao tamanho esperado para a proteína Pgp. Nossos resultados mostraram que o nível de expressão dessa proteína está aumentado apenas nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Isso demonstra que o aumento de expressão encontrado nessas espécies está associado ao fenótipo de resistência, indicando que a Pgp atua no efluxo da droga. Por outro lado, análise densitométrica da banda de 170 kDa revelou que não houve diferença de expressão da Pgp nas populações de *L. (L.) infantum chagasi*, sugerindo que a Pgp não está envolvida na resistência à droga nesta espécie de *Leishmania*. O anticorpo anti-Pgp não reconheceu a proteína de 170 kDa em nenhuma das populações de *L. (V.) braziliensis*. Este resultado pode ser devido à ausência de superexpressão da proteína Pgp na população resistente LbSbR não conseguindo ser detectada, falha de reconhecimento do anticorpo pela proteína Pgp ou pela menor expressão desta proteína nesta espécie como indicado

pelo resultado de qPCR. Diante disto, não podemos afirmar se a Pgp está ou não associada com o fenótipo de resistência de *L. (V.) braziliensis* ao SbIII.

Está descrito na literatura que esse mesmo anticorpo anti-Pgp (C219) reconhece polipeptídeos menores. Este anticorpo reconheceu polipeptídeos de 40-42 kDa em *Plasmodium berghei* resistente à cloroquina e polipeptídeos de 96-106 e 23-25 kDa em *L. (L.) enrietti* resistente ao Pentostam (Grogil *et al.*, 1991). Os autores denominaram estes polipeptídeos de componentes “Pgp-like”. Outros autores também detectaram proteínas “Pgp-like” de 82 kDa em *T. cruzi* (Murta *et al.*; 2001) e em *L. (V.) guyanensis* (Anacleto *et al.*, 2003), utilizando esse mesmo anticorpo. Nossos dados mostraram a presença de um polipeptídeo de 48 kDa que pode ser devido ao reconhecimento do anticorpo por um epitopo comum de outra proteína de *Leishmania* ou por um fragmento da proteína Pgp original.

O efeito de uma droga depende da quantidade transportada e do seu acúmulo no interior da célula. A redução do acúmulo de antimonial tem sido relatada como um mecanismo de resistência em *Leishmania*. Dessa maneira, estudos de transporte em células desse parasito (promastigotas e amastigostas) selecionadas para resistência ao SbIII *in vitro* têm sido conduzidos para examinar a absorção e determinar a concentração de antimônio em populações de *Leishmania*. Estudos anteriores utilizaram ^{125}Sb e ^{73}As (metal relacionado ao antimônio) para analisar propriedades de transporte em células de *Leishmania* (Croft *et al.*, 1981; Dey *et al.*, 1994). Entretanto, a disponibilidade de metais na forma radioativa e o alto custo são fatores que limitam a utilização desses radioisótopos. Nesse sentido, técnicas como espectrometria de massas com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS) e de absorção atômica têm se mostrado eficazes na quantificação de Sb no parasito *Leishmania*.

Neste estudo, utilizamos a técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite para mensurar a quantidade de SbIII nas quatro espécies de *Leishmania* analisadas. Essa técnica apresenta alta especificidade, sensibilidade, robustez e baixos limites de detecção para vários elementos em diferentes amostras (Freschi *et al.*, 2000). Nossos dados mostraram que a incorporação de antimônio trivalente foi reduzida nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Tem sido relatado que a aquagliceroporina (AQP1) é um importante transportador pelo qual SbIII pode acumular em células de *Leishmania* (Borgnia *et al.*, 1999; Gourbal *et al.*, 2004; Marquis *et al.*, 2005). Dessa

forma, uma explicação para a diminuição da entrada da droga observada em nossas amostras resistentes pode ser devido à menor expressão de AQP1 nos mutantes. De fato, estudos anteriores têm demonstrado que o reduzido acúmulo de SbIII em mutantes resistentes a esse composto poderia ser devido à diminuída atividade de AQP1 e que a perda de um alelo desse gene pode causar aumento na resistência (Gourbal *et al.*, 2004; Marquis *et al.*, 2005). O aumento do efluxo através da superexpressão Pgp é outro mecanismo relacionado à resistência ao antimonial em *Leishmania*. Nossos resultados de Western blot para análise da expressão de Pgp revelaram que essa proteína está aumentada nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Isso indica que os níveis mais elevados dessa proteína contribuem para a diminuição do acúmulo de SbIII observado nas células do parasito, representando um mecanismo adicional de resistência nessas duas espécies. Por outro lado, não observamos diferença de incorporação de SbIII entre as populações sensível e resistente de *L. (L.) infantum chagasi*. A provável explicação para esse fato se deve ao baixo índice de resistência ao SbIII (4 vezes) obtido com essa espécie.

Dados da literatura mostram estudos de incorporação de antimônio em *Leishmania*. Brochu *et al.* (2003) quantificaram o acúmulo de SbIII através de ICP-MS nos estágios amastigota e promastigota das espécies *L. (L.) infantum* e *L. (V.) panamensis*. Esses autores demonstraram que a resistência ao SbIII nessas espécies está correlacionada com o decréscimo de acúmulo de antimônio. Isso porque os dados obtidos indicaram que os mutantes resistentes absorveram menos SbIII em ambos estágios dos parasitos, quando comparados aos seus respectivos pares sensíveis. Maharjan *et al.* (2008) também utilizaram ICP-MS para comparar o acúmulo de SbIII em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* sensíveis e resistentes ao SAG. Os resultados mostraram que os isolados clínicos resistentes ao SAG acumularam cerca de 3 a 7 vezes menos SbIII em comparação a isolados clínicos sensíveis a essa droga. Todos estes dados da literatura corroboram com nossos achados, demonstrando que os parasitos resistentes acumulam menos antimônio comparado com os respectivos pares sensíveis. Estudos estão sendo realizados no laboratório para investigar se a diminuição da entrada do SbIII observada em nossas amostras de *Leishmania* resistentes é devido a menor expressão da AQP1 nesses parasitos.

Dessa maneira, em nosso estudo foi observada amplificação do gene MRPA na população de *L. (V.) guyanensis* resistente ao SbIII. No entanto, não foi possível estabelecer uma associação com o nível de transcrito deste gene, uma vez que não obtivemos um resultado conclusivo de qPCR para esta espécie. Por outro lado, na população resistente desta espécie de *Leishmania*, foi encontrado um aumento no nível da proteína Pgp e menor dosagem de SbIII. Na população de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente, foi encontrada amplificação do gene MRPA, aumento nos níveis de mRNA deste gene e da proteína Pgp, e baixo acúmulo de antimonial, sugerindo uma correlação com o fenótipo de resistência à droga nesta espécie. Em *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, foi verificada amplificação do gene MRPA de cerca de 10 vezes, e a presença deste gene em um amplicon extracromossomal. Entretanto, o nível de transcrito deste gene está aumentado cerca de duas vezes, sugerindo que a amplificação nesta espécie de *Leishmania* é devido a mudanças fisiológicas do parasito e não está diretamente associada com resistência à droga. Além disso, nossos resultados para o nível de expressão da proteína Pgp nesta espécie não foram conclusivos e o nível de antimonial trivalente foi menor na população resistente de *L. (V.) braziliensis*. Já na população de *L. (L.) infantum chagasi* resistente ao SbIII, foi observada amplificação do gene MRPA, contudo os níveis de mRNA deste gene, da proteína Pgp e de antimonial trivalente não estão aumentados. Isso demonstra que o gene MRPA, provavelmente, não apresenta correlação com resistência à droga nesta espécie de *Leishmania*.

7 RESUMO DOS RESULTADOS

- Ensaios de localização do gene MRPA mostraram a presença de uma banda cromossômica de 990 Kb em todas as populações de *Leishmania* estudadas. Além disso, na população de *L. (V.) braziliensis* resistente ao SbIII, foram reconhecidas outras duas bandas de cerca de 365 e 1600 Kb. Em *L. (L.) infantum chagasi* resistente ao antimonial trivalente, foi observada outra banda cromossômica de 805 Kb.
- Amplificação extracromossomal do gene MRPA está presente apenas na amostra resistente de *L. (V.) braziliensis*.
- Análises de Southern blot com as endonucleases *Bam*HI e *Hind*III indicaram a presença de polimorfismos na sequência do gene MRPA em algumas amostras de *Leishmania* analisadas neste estudo. Adicionalmente, foi observada amplificação do gene MRPA nas populações de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* resistentes ao SbIII.
- A expressão do mRNA do gene MRPA é maior nas populações resistentes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, comparado com seus respectivos pares sensíveis.
- Os níveis de mRNA do gene MRP estão aumentados em todas as populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII analisadas neste estudo.
- A proteína Pgp está mais expressa nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*.
- As populações resistentes de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* incorporam menos SbIII quando comparadas às respectivas populações sensíveis.

8 CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que o gene MRPA pode estar associado com o fenótipo de resistência ao antimônio trivalente nas espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Além disso, os resultados obtidos demonstram que os mecanismos de resistência ao SbIII são diferentes entre as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo analisadas neste estudo.

9 REFERÊNCIAS

Ahluwalia S, Lawn SDS, Kanagalungam J, Grant H, Lockwood DN. Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. *BMJ* 2004; 329:842-844.

Aliaga L, Cobo F, Mediavilla JD, *et al.* Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82:147-158.

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, editor. *Leishmaniasis*. New York: Plenum Press; 1989. P. 711-720.

Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1649-1655.

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 Res* 1994; 22:2922-2929.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77:266-274.

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.

Araújo-Santos JM, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330:349-355.

Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 115:189-198.

Ashford RW, Seaman J, Schorscher J, Pratlong F. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: identity and systematic position of the parasites from patients and vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:379-380.

Azas N, Di Giorgio C, Delmas F, Gasquet M, Timon-David P. No evidence of oxidant events in amphotericin B cytotoxicity versus *L. infantum* promastigotes. *Parasite* 2001; 8:335-341.

Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, *et al.* New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986; 154:1003-1011.

Balaña-Fouce R; Reguera RM, Cubría, JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol* 1998; 30:435-443.

Basselin M, Badet-Denisot MA, Robert-Gero M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop* 1998; 70:43-61.

Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3731-3738.

Basselin M, Lawrence F, Robert-Gero M. Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. *Parasitol Res* 1997; 83:413-418.

Bates PA. The development biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 1994; 79:215-218.

Beach DH, Goad LJ, Holz Jr GG. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 31:149-162.

Beaman L, Beaman BL. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu Rev Microbiol* 1984; 38:27-48.

Becker I, Volkow P, Velasco-Castrejon O, Salaiza-Suazo N, Berzunza-Cruz M, Dominguez JS, Morales-Vargas A, Ruiz-Remigio A, Perez-Montfort R. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 1999; 85:165-170.

Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31:459-465.

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* 1987a; 36:197-201.

Berman JD, Gallalee JV, Hansen BD. *Leishmania mexicana*: uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophages. *Exp Parasitol* 1987b; 64:127-131.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27:916-920.

Berman JD. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30:566-569.

Beverley SM, Coderre JA, Santi DV, Schimke RT. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell* 1984; 38:431-439.

Beverley SM. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 417-444.

Bora D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India* 1999; 12:62-68.

Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Aqre P. Cellular and molecular biology of aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:425-458.

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1295-1302.

Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:427-460.

Borst P. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Biochem* 1986; 55:701-732.

Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance. A review. *Acta Oncol* 1991; 30:87-105.

BoseDasgupta S, Ganguly A, Roy A, Mukherjee T, Majumder HK. A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 158:176-188.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral. Brasília: MS, s.d. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/3252/415/glossario-de-doencas-_doencas-de-a-a-z.html. Acesso em 10 Mar 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Série histórica de casos de agravos e doenças infecciosas e parasitárias. Brasil, 1980–1996. Informe Epidemiológico do SUS 1997; 6:59-60.

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, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3073-3079.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, *et al.* Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182:1259-1264.

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; 41:818-822.

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.

Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, García-Hernández R, Pérez-Victoria I, Castanys S, Gamarro F, Pérez-Victoria JM. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol Micro* 2011; 79:1430-1444.

Carroll SM, DeRose ML, Gaudray P, Moore CM, Needham-Vandevanter DR, Von Hoff DD, Wahl GM. Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Mol Cell Biol*. 1988; 8:1525-1533.

Castanys-Muñoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, Castanys S. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol Microbiol* 2007; 64:1141-1153.

Castanys-Muñoz E, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3573-3579.

Centers for Disease Control and Prevention. Parasites – Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Última revisão: November 2, 2010. Acesso em 01 Dez 2011.

Cheesman SJ. The topoisomerases of protozoan parasites. *Parasitol Today* 2000; 16:277-281.

Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, González-Ros JM, del Moral RG, Ferragut JA, Castanys S, Gamarro F. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:131-139.

Chow LM, Wong AK, Ullman B, Wirth DF. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 60:195-208.

Chow LMC, Volkman SK. Plasmodium and *Leishmania*: The Role of mdr Genes in Mediating Drug Resistance. *Exp Parasitol* 1998; 90:135-141.

Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81:1991-5.

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, Gentil LG, da Silveira JF, Cotrim PC. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Exp Parasitol* 2008; 120:98-102.

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; 51:3030-3032.

Coelho AC, Yamashiro-Kanashiro EH, Bastos SF, Mortara RA, Cotrim PC. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 150:378-383.

Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992; 257:1050-1082.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multi-drug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258:1650-1654.

Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 1994, 54:5902-5910.

Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, *et al.* Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among >3000 patients treated by Médecins Sans Frontières – Holland in Southern Sudan (1999 – 2002). *Clin Infect Dis* 2004; 38:612-619.

Cornwell MM, Pastan I, Gottesman MM. Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1987; 262:2166-2170.

Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol* 1991; 113:1033-1042.

Cowman AF, Lew AM. Antifolate drug selection results in duplication and rearrangement of chromosome 7 in *Plasmodium chabaudi*. *Mol Cell Biol* 1989; 9:5182-5188.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19:502-508.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:2633-2636.

Croft SL, Neame KD, Homewood CA. Accumulation of [¹²⁵Sb]sodium stibogluconate by *Leishmania mexicana amazonensis* and *Leishmania donovani* in vitro. *Comp Biochem Physiol C* 1981; 68:95-98.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:111-126.

Dassa E, Bouige P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* 2001; 152:211-229.

Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* 1998; 56:1009-1018.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saúde Pública* 2000; 16:925-950.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001; 11:1156-1166.

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

Denise H, Poot J, Jiménez M, Ambit A, Herrmann DC, Vermeulen AN, Coombs GH, Mottram JC. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* 2006; 7:42.

Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* 2004; 381:405-412.

Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* 1992; 45:267-275.

Desjeux P. Leishmaniasis : current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-318.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996; 14:417-423.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:239-243.

Detke S, Katakura K, Chang KP. DNA amplification in arsenite-resistant *Leishmania*. *Exp Cell Res* 1989; 180:161-170.

Dey S, Papadopoulou B, Haimeur 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.

Dias FC, Ruiz JC, Lopes WC *et al.* Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania (Viannia) braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance. *Parasitol Res* 2007; 101:667-676.

Dos Santos W, Buck G. Polymorphisms at the topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. *J Euk Microbiol* 1999; 46:17-23.

Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspects. *Clin Dermatol* 1996; 14: 425-431.

Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, de Doncker S, Maes I, Mottram JC, *et al.* Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res* 2011; 21:2143-2156.

Ehrmann M, Ehrle R, Hofmann E, Boos W, Schlosser A. The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol* 1998; 29:685-694.

El Fadili K, Messier N, Leprohon P *et al.* Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1988-1993.

Ellenberger TE, Beverley SM. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1989; 264:15094-15103.

el-On J, Hamburger AD. Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81:734-737.

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.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132:6-13.

Ferreira-Pinto KC, Miranda-Vilela AL, Anacleto C, Fernandes AP, Abdo MC, Petrillo-Peixoto ML, Moreira ES. *Leishmania (V.) guyanensis*: isolation and characterization of glucantime-resistant cell lines. *Can J Microbiol.* 1996; 42:944-949.

Fong D, Chan MM, Rodriguez R, Gately LJ, Berman JD, Grogl M. Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:758-766.

Freedman DJ, Beverley SM. Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62:37-44.

Freschi GPG, Dakuzaku CS, Gomes Neto JA, Moraes M. Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite - uma revisão da técnica e aplicações. *Eclet. Quím.* [online]. 2000, 25:213-226. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702000000100017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 Jan 2012.

Frézard 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.

Gama MEA, Costa JML, Gomes CMC, Corbett CEP. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:889-893.

Gamarro F, Chiquero MJ, Amador MV, Légaré D, Ouellette M, Castanys S. P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* 1994; 47:1939-1947.

Ghedin E, Debrabant A, Engel JC, Dwyer DM. Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. *Traffic* 2001; 2:175-188.

Glaser TA, Baatz JE, Kreishman GP, Mukkada AJ. pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:7602-7606.

González A, Lerner T, Huecas M, Sosa-Pineda B, Nogueira N, Lizardi P. Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* 1985; 13:5789-5802.

González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 Apr 15; (2):CD004834.

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, Légaré 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.

Goyard S, Segawa H, Gordon J, Showalter M, Duncan R, Turco SJ, Beverley SM. An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 130:31-42.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41:687-725.

Grogl M, Martin RK, Oduola AM, Milhous WK, Kyle DE. Characteristics of multidrug resistance in *Plasmodium* and *Leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45:98-111.

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.

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.

Grondin K, Papadopoulou B, Ouellette M. Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:1895-1901.

Grondin K, Roy G, Ouellette M. Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Cell Biol* 1996; 16:3587-3595.

Gros P, Buschman E. The mouse multidrug resistance gene family: structural and functional analysis. *Int Rev Cytol* 1993;137C:169-97.

Gros P, Croop J, Roninson I, Varshavsky A, Housman DE. Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:337-341.

Gueiros-Filho FJ, Viola JP, Gomes FC, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania mdr1* gene. *Exp Parasitol* 1995; 81:480-490.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:494-501.

Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, Fadili AE, Peytavi R. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:5886-5896.

Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopoulou B, Ouellette M. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 2000, 108:131-135.

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; 34:726-735.

Haimeur A, Ouellette M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1689-1694.

Haldar AK, Sen P, Roy S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol Biol Int* 2011; 2011:571242.

Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 1992; 12:2855-2865.

Herwaldt BL, Arana BA, Navin TR. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis* 1992; 165: 518-527.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354:1191-1199.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:67-113.

Holland IB, Blight MA ABC-ATPases, adaptable energy generators fueling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 1999; 293:381-399.

Hyde SC, Emsley P, Harthshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallager MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990; 346:362-365.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005; 309:436-442.

Jean-Moreno V, Rojas R, Goyeneche D, Coombs GH, Walker J. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Exp Parasitol* 2006; 112:21-30.

Jeddi F, Piarroux R, Mary C. Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. *J Trop Med* 2011; 15 pages.

Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:87-106.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1084-1094.

Katakura K, Fujise H, Takeda K, *et al.* Overexpression of LaMDR2, a novel multidrug resistance ATP-binding cassette transporter, causes 5-fluorouracil resistance in *Leishmania amazonensis*. *FEBS Lett* 2004; 561:207-212.

Katakura K, Iwanami M, Ohtomo H, Fujise H, Hashiguchi Y. Structural and functional analysis of the LaMDR1 multidrug resistance gene in *Leishmania amazonensis*. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1999; 255:289-294.

Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:3963-3969.

Kelly JM. Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes. *Parasitol Today* 1995; 11:447-451.

Killick-Kendrick R, Molineux W. Transmission of leishmaniasis by the bite of a phlebotomine, possible mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75:152-154.

Killick-Kendrick R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly. In: *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, London, New York & San Francisco 1979; 2:395-460.

Kinnamon KE, Steck EA, Loizeaux PS, Hanson WL, Chapman WL Jr, Waits VB. The antileishmanial activity of lepidines. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:751-757.

Klokouzas A, Shahi S, Hladky SB, Barrand MA, van Veen HW. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:301-317.

Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. Hexadecyl phosphocholine; oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1630-1634.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Lage H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:188-199.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution classification and geographical distribution of *Leishmania*. In: Peters W, Killik-Kendrick R, editors. The leishmaniasis in biology and epidemiology. Vol 1. London: Academic Press; 1987. P. 1-120.

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

Légaré D, Hettema E, Ouellette M. The P-glycoprotein related gene family in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 68:81-91.

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*. *Exp Parasitol* 1997; 87:275-282.

Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* 2001; 276:26301-26307.

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; 5:1713-1725.

Leprohon P, Légaré D, Raymond F *et al*. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:1387-1399.

Liarte DB, Murta SMF. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. *Parasitol Res* 2010; 107:205-212.

Lighthall GK, Giannini SH. The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitol. Today* 1992; 8:192-199.

Lira R, Sunder S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sack D. Evidence that 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.

Liu X, Chang KP. The 63-kilobase circular amplicon of tunicamycin-resistant *Leishmania amazonensis* contains a functional N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase gene that can be used as a dominant selectable marker in transfection. Mol Cell Biol 1992; 12:4112-4122.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholova E, *et al*. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:9375-9380.

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

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

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

Machado P, Araujo C, Da Silva AT, *et al*. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. Clin Infect Dis 2002; 34: 69-73.

Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhães PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2005; 99:55-61.

Magill AJ. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infect Dis Clin N Am* 2005; 19:241-266.

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; 79:69-75.

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.

McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:479-486.

Meshnick SR, Eaton JW. Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 102:970-976.

Messerli SM, Kasinathan RS, Morgan W, Spranger S, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 167:54-59.

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

Monte Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Légaré D, Corbeil J, Melo MN, Frézard F, Ouellette M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1167.

Morais-Teixeira E, Damasceno QS, Galuppo MK, Romanha AJ, Rabello A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:475-478.

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; 84:720-726.

Morris JC, Drew ME, Klingbeil MM, Motyka SA, Saxowsky TT, Wang Z, Englund PT. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *Int J Parasitol* 2001; 31:453-458.

Muhich ML, Boothroyd JV. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol Cell Biol* 1988; 8:3837-3846.

Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barrett MP, Madhubala R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 145:1-10.

Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, Madhubala R. Role of ABC transporter MRPA, γ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:204-211.

Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:10383-10387.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366:1561-1577.

Murta SM, dos Santos WG, Anacleto C, Nirdé P, Moreira ES, Romanha AJ. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 117:223-228.

Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdé P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 146:151-162.

Nacher M, Carme B, Sainte Marie D, Couppie P, Clyti E, Guibert P, Pradinaud R. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95:331-336.

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; 29:637-642.

Neal RA, Allen S, McCoy N, Olliaro P, Croft SL. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35:577-584.

Osman OF, Kager PA, Oskam L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop Med Int Health* 2000; 5:553-562.

Ouellette M, Borst P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol* 1991; 142:737-746.

Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 2004; 7:257-266.

Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *The EMBO J* 1990; 9:1027-1033.

Ouellette M, Haimeur A, Grondin K, Légaré D, Papadopoulou B. ABC transporters: biochemical, cellular, and molecular aspects. In: Ambudkar SV, Gottesman MM, editors. *Methods enzymology*. San Diego: Academic Press; 1998a.

Ouellette M, Hettema E, Wust D, Fase-Fowler F, Borst P. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. EMBO J 1991; 10:1009-1016.

Ouellette M, Légaré D, Haimeur A, Grondin K, Roy G, Brochu C, Papadopoulou B. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. Drug Resist Updat 1998b; 1:43-48.

Ouellette M, Légaré D, Papadopoulou B. Microbial ABC transporters. Trends Microbiol 1994; 2:407-411.

Palacios R, Osorio LE, Grajales LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. Am J Trop Med Hyg 2001; 64:187-193.

Papadopoulou B, Huang SF, Boucher N, McNicoll F. Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. ASM News 2003; 69:282-288.

Papadopoulou B, Kündig C, Singh A, Ouellette M. Drug resistance in *Leishmania*: similarities and differences to other organisms. Drug Resist Updat 1998; 1:266-278.

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; 224:772-778.

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.

Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant *Leishmania*. Nucleic Acids Res 1993; 21:4305-4312.

Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 90:203-221.

Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:852-859.

Parodi-Talice A, Araújo JM, Torres C, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1612:195-207.

Passos VM, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, Gontijo CM, *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prognosis features (1989-1995). *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:5-12.

Pauletti G, Lai E, Attardi G. Early appearance and long-term persistence of the submicroscopic extrachromosomal elements (amplisomes) containing the amplified DHFR genes in human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:2955-2959.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, *et al.* 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; 4:159-166.

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

Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. J Biol Chem 1997; 272:4493-4499.

Ramos H, Saint-Pierre-Chazalet M, Bolard J, Cohen BE. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:1079-1084.

Raymond F, Boisvert S, Roy G, Ritt JF, Légaré D, Isnard A, Stanke M, Olivier M, Tremblay MJ, Papadopoulou B, Ouellette M, Corbeil J. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. Nucleic Acids Res 2011; 1-17.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis 2007; 7:581-596.

Richard D, Kundig C, Ouellette M. A new type of high affinity folic acid transporter in the protozoan parasite *Leishmania* and deletion of its gene in methotrexate-resistant cells. J Biol Chem 2002; 277:29460-29467.

Richens J. Genital manifestations of tropical diseases. Sex Transm Infect 2004; 80:12-17.

Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. Nature 1985; 316:817-819.

Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. Genome Res 2011; 21:2129-2142.

Rosen BP. Biochemistry of arsenic detoxification. FEBS Lett 2002; 529:86-92.

Rovai L, Tripp C, Stuar K, Simpson L. Recurrent polymorphisms in small chromosomes of *Leishmania tarentolae* after nutrient stress or subcloning. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50:115-125.

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 1984; 223:1417-1419.

Sampaio MC, Traub-Cseko YM. The 245 kb amplified chromosome of *Leishmania (V.) braziliensis* contains a biopterin transporter gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:377-378.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994; 17:914-921.

Santos DO, Coutinho CER, 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; 103:1-10.

Santos Ferreira C, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frézard F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals* 2003; 16:441-446.

Saurin W, Hofnung M, Dassa E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 1999; 48:22-41.

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

Segovia M. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88:123-130.

Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmuller P, Ouaiissi A, Lemesre JL. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Trop* 2001a; 80:195-205.

Sereno D, Holzmuller P, Mangot I, Cuny G, Ouaiissi A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001b; 45:2064-2069.

Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2001; 276:3971-3976.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:117-143.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:471-478.

Sheps JA, Ling V. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. *Pflugers Arch* 2007; 453:545-553.

Sherwood JA, Gachihi GS, Muigai RK, Skillman DR, Mugo M, Rashid JR, Wasunna KM, Were JB, Kasili SK, Mbugua JM *et al.* Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1994; 19:1034-1039.

Simeen BR, Bari AU, Nadeem M. Miltefosine in cutaneous leishmaniasis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2007; 17:132-135.

Simpson L, Sbicego S, Aphasizhev R. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA* 2003; 9:265-276.

Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41:363-382.

Singh N, Singh RT, Sundar S. Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. *J Infect Dis* 2003; 188:600-607.

Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* 123, 2006; 411-422.

Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol* 2007; 37:1173-1186.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, *et al.* Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1266-1272.

Stark GR, Debatisse M, Giulotto E, Wahl GM. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 1989; 57:901-908.

Stuart K, Panigrahi AK. RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol* 2002; 45:591-596.

Stuart KD. Circular and linear multicopy DNAs in *Leishmania*. *Parasitol Today* 1991; 7:158-159.

Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem* 2003; 278:25120-25132.

Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, Singh MK, Voss A, Rosenkaimer F, Engel J, Murray HW. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; 93:589-597.

Sundar S, Gupta LB, Rastogi V, Agrawal G, Murray HW. Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:200-204.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100:S26-33.

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, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai M, Murray HW. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis* 2004; 38:377-383.

Sundar S, Murray HW. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ* 2005; 83:394-395.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001; 6:849-854.

Svensson F, Ceriani C, Wallström EL, Kockum I, Algranati ID, Heby O, Persson L. Cloning of a trypanosomatid gene coding for an ornithine decarboxylase that is metabolically unstable even though it lacks the C-terminal degradation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:397-402.

Theoharides AD, Chung H, Velazquez H. Metabolism of a potential 8-aminoquinoline antileishmanial drug in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1985; 34:181-188.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350-4354.

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:R115.

Velez I, Agudelo S, Hendrickx E, Puerta J, Grogl M, Modabber F, *et al.* Inefficacy of allopurinol as monotherapy for colombian cutaneous leishmaniasis: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; 126:232-236.

Vickerman K, Preston TM. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J Cell Sci* 1970; 6:365-383.

Wahl GM. The importance of circular DNA in mammalian gene amplification. *Cancer Res* 1989; 49:1333-1340.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of the ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982;1:945-951.

Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996; 14: 433-450.

Wong IL, Chow LM. The role of *Leishmania enrietti* multidrug resistance protein 1 (LeMDR1) in mediating drug resistance is iron-dependent. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 150:278-287.

World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.

World Health Organization. Leishmaniasis: cutaneous, mucocutaneous, visceral. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em: 10 Dez 2011.

World Health Organization. WHO Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. Disponível em: http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocds_csrisr2001.html/Leishmaniasis/Leishmaniasis.htm 2001.

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.

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 SC, Wang ILK, Chow LMC, Sun HZ. Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation. Chem Commun 2003b; 2:266-287.

Yeates C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). Curr. Opin. Investig. Drugs 2002; 3:1446-1452.

Zhang WW, Matlashewski G. Screening *Leishmania donovani* specific genes required for visceral infection. Mol Microbiol 2010 77:505-517.

Zhang WW, Peacock CS, Matlashewski G. A genomic-based approach combining in vivo selection in mice to identify a novel virulence gene in *Leishmania*. PLoS Negl Trop Dis 2008 2:e248.

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.

Zilberstein D, Ephros M. Clinical and laboratory aspects of *Leishmania* chemotherapy in the era of drug resistance. In: Farrell JP, editor. *Leishmania*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers; 2002. P. 193.