

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA
TRIPAREDOXINA PEROXIDASE EM POPULAÇÕES DE *Leishmania* spp.
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO ANTIMONIAL TRIVALENTE**

por

Juvana Moreira Andrade

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 DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA
TRIPAREDOXINA PEROXIDASE EM POPULAÇÕES DE *Leishmania* spp.
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO ANTIMONIAL TRIVALENTE**

por

Juvana Moreira Andrade

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

A553c
2012

Andrade, Juvana Moreira.

Caracterização Molecular do Gene que Codifica a Enzima Triparedoxina Peroxidase em Populações de *Leishmania* spp. Sensíveis e Resistentes ao Antimonial Trivalente / Juvana Moreira Andrade. – Belo Horizonte, 2012.

xxiv, 89 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 92 - 113

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. Atimônio/administração & dosagem 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 DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA
TRIPAREDOXINA PEROXIDASE EM POPULAÇÕES DE *Leishmania* spp.
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO ANTIMONIAL TRIVALENTE**

por

Juvana Moreira Andrade

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Presidente)

Dra. Laila Alves Nahum

Dr. Evanguedes Kalapothakis

Suplente: Dr. Flávio Marcos Gomes Araújo

Dissertação defendida e aprovada em: 28/02/2012

Belo Horizonte

Fevereiro/2012

"O talento precisa ser trabalhado.
A vocação não sobrevive sem que nossas cabeças se curvem sobre os livros.
A coragem tem que encher o peito.
A vontade tem que pulsar na veia.
A cabeça precisa estar aberta ao aprendizado.
Por mais que estudemos, sabemos pouco perto do que saberemos e jamais
saberemos tudo.
Tudo e todos à nossa volta são passíveis de nos ensinar algo.
Estar formado é um grande contentamento, mas não encerra a busca
profissional, muito menos o ideal da profissão: fazer o máximo ao próximo."
(Autor desconhecido)

Dedico esta conquista.....

Ao meu marido, Danri, por sonhar os meus sonhos junto comigo.

Nós dois juntos podemos o que quisermos.

Não tenha dúvida de que o nosso casamento é o meu maior projeto.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir que eu fosse muito mais longe do que eu imaginava que pudesse ir. Por se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

À Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, por me confiar a sua linha de pesquisa mesmo sem ainda me conhecer. Obrigada pelos ensinamentos, confiança, amizade e por ser exemplo de formação profissional e humanizada.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Evanguedes Kalapothakis, Dra. Laila Nahum e Dr. Flávio Araújo por aceitarem prontamente nosso convite, mesmo tendo inúmeras outras atribuições.

Ao meu pai Reinaldo e minha mãe Nélia, por me concederem a vida.

Aos meus irmãos Juan, Juarle e Julie por me darem a oportunidade de ser exemplo na vida de alguém e torcerem sempre por mim.

Ao meu marido, por se fazer presente em todos os momentos. Por nunca ter medido esforços para me ajudar a atingir minhas metas e realizar os meus sonhos. Obrigada pelo amor, carinho, admiração e respeito. E saiba que estaremos sempre juntos para o que der e vier.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou- FIOCRUZMG, na pessoa do Dr. Rodrigo Correa Oliveira, por manter a excelência nos trabalhos científicos.

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

À coordenação do programa de Pós- graduação do CPqRR, na pessoa do Dr. Paulo Pimenta, pelo empenho em manter as melhores condições para o nosso curso e pela disponibilização de bolsas de estudo.

À Plataforma de PCR em Tempo Real, através da Dra. Isabela Cerávolo e da Dra. Fernanda Nogueira, pelos excelentes serviços prestados. Agradeço ainda por toda amizade, incentivo, ajuda e carinho.

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 amigos do LPCM por toda ajuda e convivência agradabilíssima durante todo este tempo. Não colocarei o nome de todos para não cometer a injustiça de esquecer algum. Vocês foram essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa: Laila, Melina, Joyce, Mariana, Nayara, Tati, Ana Paula, Fabiana, Douglas, Antonio e Rafael por toda ajuda, amizade, companheirismo, convivência, troca de conhecimento e experiência e risadas (muitas risadas!!!). Vocês se tornaram a minha família aqui em BH.

À Nayara, pela grande amizade em tão pouco tempo de convivência, me fazendo companhia no lab em pleno domingo às 11h da noite. Conte sempre comigo.

Aos meus amigos do quarteto fantástico: Douglas, Antonio e Rafael pelos maravilhosos momentos compartilhados, cumplicidade e amizade.

Ao Douglas, em especial, por ser uma excelente dupla de trabalho, sempre solícito e prestativo. Você se tornou o irmão que o meu coração escolheu.

Às grandes amizades que fiz no decorrer das disciplinas e aos amigos da pós nos outros laboratórios e instituições.

Agradeço, por fim, ao apoio financeiro concedido pela FIOCRUZ e TDR.

AGRADECIMENTO ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Epidemiologia.....	26
1.2 Biologia do parasito <i>Leishmania</i>	28
1.2.1 Agente etiológico, Vetor e Ciclo de vida do parasito.....	28
1.2.2 Espécies de <i>Leishmania</i> e manifestações clínicas.....	31
1.2.3 Perfil molecular do parasito <i>Leishmania</i>	34
1.3 Triparedoxina peroxidase	36
1.4 Quimioterapia das Leishmanioses	40
1.5 Resistência aos antimoniais	43
2 JUSTIFICATIVA	45
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 Populações de <i>Leishmania</i> spp. e condições de cultivo.. ..	51
4.2 Extração de DNA genômico de <i>Leishmania</i> spp.	51
4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	52

4.4 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida	53
4.5 Purificação do produto de PCR	53
4.6 Extração de RNA total	53
4.7 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	54
4.8 Preparação de bactérias competentes	54
4.9 Clonagem dos genes triparedoxina peroxidase e SSU	55
4.10 PCR quantitativo em tempo real (RT- qPCR)	56
4.11 Extração de proteínas totais de <i>Leishmania</i> spp.....	57
4.12 <i>Western blotting</i> e eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	58
4.13 <i>Southern blotting</i>	58
4.14 <i>Northern blotting</i>	59
4.15 Preparação das sondas e ensaio de hibridização	59
4.16 Sequenciamento	59
4.17 Sub- clonagem do gene triparedoxina peroxidase no vetor de expressão pIR1-BSD de <i>Leishmania</i>	60
4.18 Transfecção estável em <i>Leishmania</i> spp.....	61
4.19 Confirmação do experimento de transfecção por PCR	62
4.20 Teste de susceptibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente	62
4.21 Análise densitométrica.....	62
4.22 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Gene triparedoxina peroxidase	65
5.2 Nível de mRNA do gene TxP	65
5.3 Organização genômica do gene TxP	68
5.4 Nível de expressão da proteína TxP	70
5.5 Superexpressão da proteínaTxP	74
5.6 Teste de susceptibilidade dos parasitos transfectados ao antimonial trivalente	79
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	90

8 REFERÊNCIAS.....	92
ANEXO I.....	106
ANEXO II.....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das Leishmanioses cutânea e visceral no Velho Mundo e Novo Mundo.....	27
Figura 2: Formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i>	28
Figura 3: Flebotomíneo vetor das Leishmanioses.....	29
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	30
Figura 5: Formas clínicas das Leishmanioses.....	32
Figura 6: Glutationa e tripanotona	37
Figura 7: Via de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos	39
Figura 8: Drogas usadas no tratamento das Leishmanioses.....	42
Figura 9: Vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	55
Figura 10: Vetor pGEM [®] -T easy	56
Figura 11: Vetor pIR1-BSD	61
Figura 12: Níveis de mRNA do gene TxP em populações de <i>Leishmania</i> spp. sensíveis e resistentes ao SbIII.....	66
Figura 13: Quantificação do nível de mRNA do gene TxP em populações de <i>Leishmania</i> spp. sensíveis e resistentes ao SbIII por RT- qPCR.....	67
Figura 14: Nível de expressão do gene TxP nas populações sensíveis e resistentes ao SbIII de <i>Leishmania</i> spp.....	68

Figura 15: Análise de <i>Southern blotting</i> do gene TxP nas populações de <i>Leishmania</i> spp. sensíveis e resistentes ao SbIII	70
Figura 16: Alinhamento das sequências de aminoácidos da TxP de <i>T. cruzi</i> em relação às espécies de <i>Leishmania</i>	72
Figura 17: Análise da expressão do gene TxP por <i>Western blotting</i> em populações sensíveis e resistentes ao SbIII das quatro espécies de <i>Leishmania</i> do Novo Mundo	73
Figura 18: Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene triparedoxina peroxidase	75
Figura 19: Esquema representativo da correta direção da clonagem do gene TxP no vetor de transfecção pIRIBSD.....	76
Figura 20: Confirmação por PCR da presença do gene que confere resistência à blasticidina nas linhagens de <i>Leishmania</i> spp. transfectadas com pIR1-BSDTxP	77
Figura 21: Análise por <i>Western blotting</i> de populações de <i>L.eishmania</i> spp. transfectadas com o gene TxP	78
Figura 22: Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> de populações de <i>L. braziliensis</i> sensíveis LbWTS e resistentes Lb SbR ao SbIII e transfectadas com o vetor pIR1-BSD-TxP	81
Figura 23: Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> de populações de <i>L. chagasi</i> sensíveis LcWTS e resistentes Lc SbR ao SbIII e transfectadas com o vetor pIR1-BSD-TxP.....	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Agente etiológico, síndrome clínica e distribuição geográfica das Leishmanioses	33
TABELA 2 – Síndromes clínicas e tipos de lesões causadas pelas Leishmanioses.....	34
TABELA 3 – Espécies e cepas de <i>Leishmania</i> utilizadas neste estudo.....	51
TABELA 4 – Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação das regiões alvo do gene triparedoxina peroxidase	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- μF** – Microfarad- Unidade de capacitância
- μg** – Micrograma
- μL** – Microlitro
- A** - Adenina
- ABC** – ATP-binding cassette
- ABI3130** – Modelo de sequenciador capilar de DNA
- AP** – Fosfatase alcalina
- APS** – Persulfato de amônio
- AQP1** – Aquagliceroporina
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BamHI** – Endonuclease de restrição
- BCIP** - Substratos 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
- BglII** – Endonuclease de restrição
- BLAST** – Algoritmo utilizado para alinhamento de sequências
- BSA** – Albumina de soro bovino
- BSD** - Blastocidina
- °C** – Grau Celsius
- CaCl₂** – Cloreto de cálcio
- cDNA** – DNA complementar
- Ct** – *Cycle threshold*
- cTxP** – Triparedoxina peroxidase citosólica
- Cys** – Cisteína
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP** – Deoxinucleotídeo trifosfato
- DTT** – Ditioneitol
- EcoRI** – Endonuclease de restrição
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- EMBOSS** – Ferramenta de bioinformática para análise de estrutura proteica
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- ERN** - Espécies reativas de nitrogênio

F – *Forward* (senso)

FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina

FeSOD – Ferro Superóxido dismutase

Fig. – Figura

Fiocruz – Fundação Osvaldo Cruz

GeneDB – Bancos de dados do genoma

GSH – Glutathione

h – Hora

HCl – Ácido clorídrico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50%

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

Kb – Kilobases

KCl – Cloreto de potássio

KDa – Kilodáltons

kDNA – DNA do cinetoplasto

Kg – Kilograma

(L.) – Subgênero *Leishmania*

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

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

LB – Luria Bertani

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

LbTxP – Triparedoxina peroxidase de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

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

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutâneo- difusa

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

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

LDPK – Leishmaniose Dermal Pós- Kalazar

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

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

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LR – Leishmaniose recidiva
LV – Leishmaniose visceral
M – Molar
M13 F e R – Iniciadores universais senso e antisenso para sequenciamento
M199 – Meio de cultura para *Leishmania*
Mb – Megabase
MDR – Gene de resistência a múltiplas drogas
mg – Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min – Minutos
ml – Mililitros
mM – Milimolar
MOCK- Célula eletroporada sem vetor
MOPS - Ácido 3-(N- morfolino)- propanossulfônico
mRNA – RNA mensageiro
N₂ – Nitrogênio
NADPH – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NaCl – Cloreto de sódio
NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico
NaOH – Hidróxido de sódio
NBT - *Nitro blue tetrazolium*
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*- base de dados pública
ND - Nanodrop
ng – Nanograma
nm – Nanômetro
O₂⁻ – Ânion superóxido
OD – Densidade óptica
OH⁻ – Radical hidroxila
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
Pgp – Fosfoglicoproteína de membrana
pH – Potencial hidrogeniônico

Phred – Algoritmo que atribui valores qualitativos para cada base sequenciada

pmoles – Picomoles

PMSF - Fenilmetil-Sulfonil Fluorido

Pol II – DNA polimerase II

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

R – Reverse (anti-senso)

RNA – Ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

rRNA – RNA ribossomal

mRNA- RNA mensageiro

rpm – Rotação por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase conjugada com a transcriptase reversa

Sb – Antimônio

SbIII – Antimonial trivalente

SbV – Antimonial pentavalente

Seg– Segundo

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

SL – *Spliced leader* (sequência líder ou minixon)

Slope – Indicador de eficiência da reação de PCR

Spp. – Espécie

SSC – Tampão citrato de sódio

SSU – Sub-unidade menor do RNA ribossomal

Swal– Endonuclease de restrição

SYBR green– Corante fluorescente

TBE – Tampão tris-borato EDTA, pH 8,0

TDR1 – Redutase dependente de tiol

TE – Tampão tris-HCl e EDTA

TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina

TLCK - Tosil-lisina clorometil cetona

Tripanotiona - (T[SH]₂)

TR – Tripanotiona redutase

Tris – Tri-hidroximetil amino metano

TSA – Enzima antioxidante

TSH – Tripanotona
TxN- Triparedoxina
TxP- Triparedoxina peroxidase
TcTxP – Triparedoxina peroxidase de *T. cruzi*.
TOP 10F' - Linhagem da bactéria *E. coli*
TPCK - Tosil-amido-2-feniletil clorometil cetona
U - Unidade
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
V – Voltagem
V 3.2 – Versão
(V.) – Subgênero *Viannia*
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
% – Porcentagem
°C– Grau Celsius, unidade de temperatura

RESUMO

Triparedoxina peroxidase (TxP) é uma enzima que pertence à família das peroxiredoxinas e participa da defesa antioxidante, por metabolizar peróxido de hidrogênio em moléculas de água. Dados da literatura têm mostrado que parasitos resistentes à droga podem aumentar os níveis de TxP junto com outras enzimas, protegendo-os contra o estresse oxidativo. Inicialmente neste trabalho, avaliamos os níveis de mRNA do gene TxP e a expressão da enzima Triparedoxina peroxidase em populações de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi* e *L. guyanensis* sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente (SbIII). Estas populações apresentam resistência à concentração de SbIII de 4 a 20 vezes maior comparada aos seus respectivos pares sensíveis. O nível de mRNA do gene TxP, determinado por northern blot e RT-PCR quantitativo em tempo real, foi maior nas populações resistentes de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, enquanto que o Northern blotting mostrou maior expressão do gene TxP na população resistente de *L. guyanensis*. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada no nível do mRNA do gene TxP nas populações sensíveis e resistentes de *L. infantum chagasi*. Análises de southern blot mostraram que o gene cTxP não está amplificado no genoma das populações resistentes de *Leishmania* spp. analisadas. A expressão proteica foi determinada por ensaios de Western blotting utilizando anticorpo policlonal contra a proteína recombinante TxP de *T. cruzi*. Análises do alinhamento de aminoácido da proteína TxP de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. mostraram um alto grau de identidade entre estas sequências. O anticorpo anti-TcTxP reconheceu um polipeptídeo de 25 kDa em todas as populações de *Leishmania* spp. analisadas. Análises de densitometria mostraram que a proteína cTxP está 2 a 4 vezes mais expressa em todas as populações resistentes de *Leishmania* spp. analisadas. Na segunda parte deste estudo, ensaios funcionais da TxP foram realizados para determinar se a superexpressão da LbTxP nas populações sensíveis e resistentes de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* iria alterar o fenótipo de resistência dos parasitos transfectados ao antimonial SbIII. Análises por Western blotting mostraram que o nível de expressão da proteína TxP foi de 2 a 4 vezes maior nos parasitos transfectados quando comparado aos parasitos não-transfectados. Análises de IC₅₀ destes parasitos mostraram que a superexpressão do gene TxP na população de *L. braziliensis* sensível aumentou 2 vezes a resistência ao SbIII, quando comparado à população parental. Por outro lado, a superexpressão de TxP na população resistente de *L. braziliensis* reverteu o fenótipo de resistência. Os parasitos antes resistentes, após a transfecção se tornaram muito

sensíveis ao SbIII. Além disto, a superexpressão da TxP em populações sensíveis e resistentes de *L. infantum chagasi* não alterou o fenótipo de resistência ao SbIII. Concluindo, nossos resultados de análise funcional mostraram que a enzima triparedoxina peroxidase está envolvida no fenótipo de resistência de *L. braziliensis* ao antimonial.

ABSTRACT

Tryparedoxin peroxidase (TxP) is an enzyme that belongs to family of peroxiredoxins and participates in the antioxidant defense by metabolizing hydrogen peroxide in water molecules. Literature data have reported that drug-resistant parasites may increase the levels of TxP along with other enzymes, protecting them against oxidative stress. Initially in this study, we analyzed the TxP mRNA levels and protein expression levels in populations of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi* and *L. guyanensis* susceptible and resistant to SbIII. These populations exhibit index of resistance to SbIII 4 to 20-fold higher compared to their respective counterparts susceptible. The level of cTxP mRNA determined by northern blot and quantitative real time RT-PCR was higher in the *L. amazonensis* and *L. braziliensis* resistant populations while that Northern blot showed increased expression this gene in the *L. guyanensis* resistant population. Moreover, no difference was observed in the level of cTxP mRNA between susceptible and resistant *L. infantum chagasi* populations. Southern blot analyzes showed that the TxP gene is not amplified in the genome of SbIII-resistant *Leishmania* spp. populations analyzed. Analysis of protein expression was determined by Western blotting assays using polyclonal antibody against the TxP recombinant protein from *T. cruzi*. Amino acid alignment of TxP sequence of *T. cruzi* and *Leishmania* spp. showed a high degree of identity among these sequences. The anti-TcTxP antibody recognized a 25 kDa polypeptide in all *Leishmania* spp. populations analyzed. Densitometry analysis showed that TxP protein is 2 to 4-fold more expressed in all SbIII-resistant *Leishmania* spp. populations analyzed. In the second part this study, functional analysis of TxP was performed to determine whether overexpression of LbTxP in the susceptible and resistant *L. braziliensis* and *L. infantum chagasi* populations would change the resistance phenotype of transfected parasites to antimony SbIII. Western blotting analysis showed that the level of TxP protein expression was 2 to 4-fold higher in transfected parasites than in the non-transfected ones. IC 50 analysis showed that susceptible *L. braziliensis* population that overexpress of TxP protein are 2-fold more resistant to SbIII compared to its parental non-transfected population. On the other hand, overexpression of TxP in the resistant *L. braziliensis* population caused inversion of resistance phenotype. The resistant parasites after TxP transfection became very susceptible to SbIII. In addition, overexpression of TxP enzyme in the susceptible and resistant *L. infantum chagasi* populations did not alter the resistance phenotype to SbIII. In conclusion, our functional

analysis results showed that the enzyme Tryparedoxin peroxidase is involved in the antimony-resistance phenotype in *L. braziliensis*.

1.1 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, seis doenças são consideradas como principais ameaças em países em desenvolvimento: Leishmanioses, Hanseníase, Malária, Filariose, Esquistossomose e Doença de Chagas. Estas doenças negligenciadas estão entre as chamadas doenças tropicais endêmicas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina (WHO, [s.d.a]).

As Leishmanioses são um grupo de doenças crônicas, não contagiosas, causadas por pelo menos 20 espécies diferentes de protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Rey, 2001; Almeida & Santos, 2011; Seifert, 2011). Elas possuem uma ampla distribuição mundial, com importante foco de infecção nas Américas Central e do Sul, sul da Europa, norte e leste da África, Oriente Médio e Índia (Bora *et al.*, 1999; WHO, WHO, [s.d.b]). Esta doença afeta cerca de 12 milhões de pessoas tanto no Velho quanto no Novo Mundo, sendo endêmica em 88 países, principalmente em áreas tropical e subtropical, sendo 72 destes, países em desenvolvimento. A incidência anual é de aproximadamente 2 milhões de novos casos; sendo 0.5 milhão de casos correspondentes à forma visceral da doença e 1.5 milhão de casos referentes à forma cutânea, causando extensiva mortalidade e morbidade (WHO,[s.d.b]). O número de mortes a cada ano chega a 70000 e estima-se que 350 milhões de pessoas estejam em risco de infecção vivendo em áreas endêmicas; revelando assim a importância dos estudos acerca desta doença.

A Leishmaniose Cutânea (LC) é endêmica em mais de 70 países em todo o mundo e 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria. Já a Leishmaniose Visceral (LV) ocorre em 65 países. A maioria (90%) dos casos ocorre em áreas rurais e suburbanas de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (Ashford *et al.*, 1992; Desjeux, 2004; WHO, [s.d.b]) (Fig. 1). A LC é um grave problema de saúde no Brasil, com 388.155 casos relatados nos últimos 15 anos (Santos *et al.*, 2008; Almeida & Santos, 2011; Chawla *et al.*, 2010; Seifert, 2011); sendo que o número de casos vem aumentando globalmente em taxas alarmantes em quase todos os estados brasileiros e surtos epidêmicos vêm ocorrendo no Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste, e mais recentemente, na região Amazônica devido ao processo de colonização (Gontijo & Melo, 2004; Santos *et al.*, 2008); entretanto, devido à sub-notificação e erros de diagnóstico, acredita-se que o número de casos reais seja ainda mais alto.

Historicamente, a Leishmaniose cutânea tem sido uma doença rural, afetando fazendeiros, grupos militares e outras pessoas de áreas rurais. Entretanto, este perfil epidêmico tem mudado, e a transmissão desta doença tem sido relatada em ambientes urbanos, entre pessoas de todos os sexos e idades (Santos *et al.*, 2008).

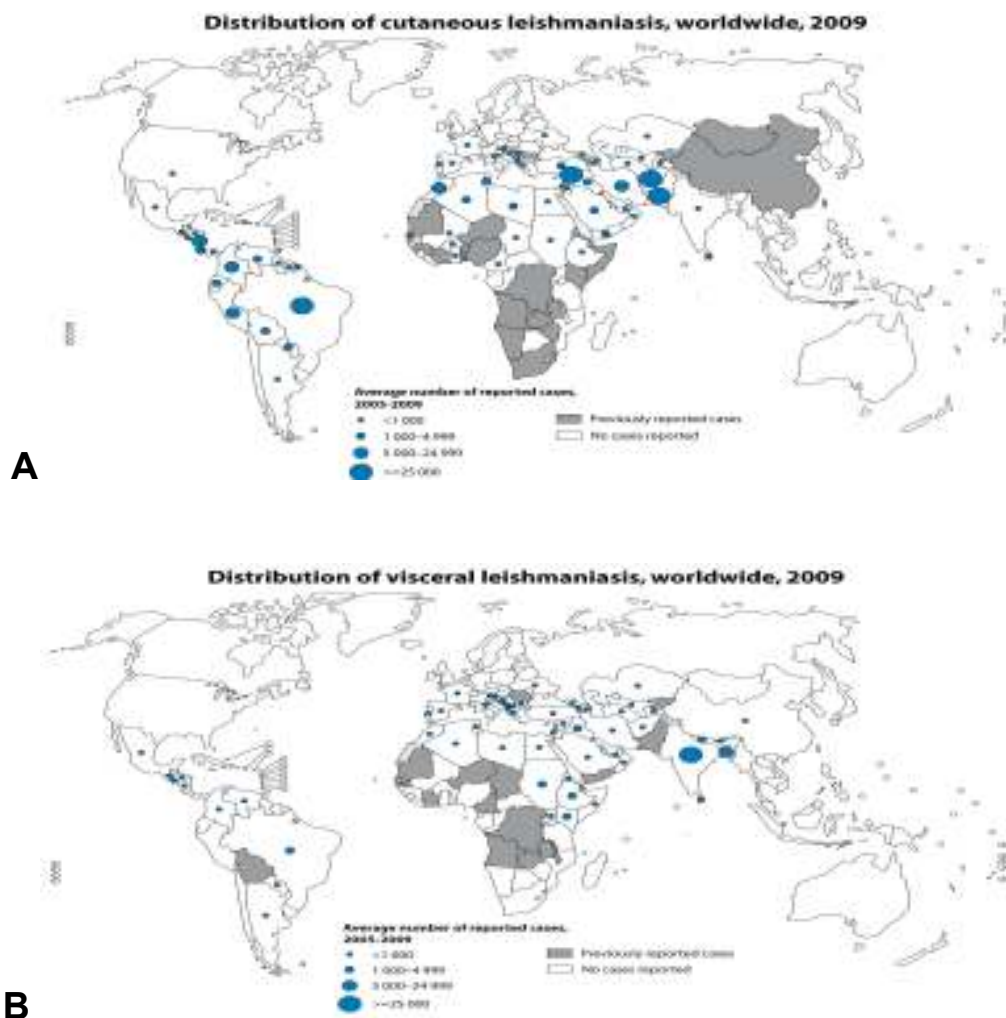


Figura 1: Distribuição geográfica das Leishmanioses (A) Cutânea e (B) Visceral, no Velho e Novo Mundo mostrando a média do número de casos notificados entre 2005-2009. Fonte: WHO, [s.d.b].

Em relação à Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, esta afeta cerca de 500 mil pessoas por ano; principalmente na Índia, Sudão e países da América Latina (Bora *et al.*, 1999; Gontijo & Melo, 2004; Santos *et al.*, 2008).

O caos ecológico causado pelos humanos tem permitido a expansão das Leishmanioses além do seu ecótopo natural; e este, por sua vez, afeta o nível de exposição humana ao flebotomíneo vetor. Diante disso, o aumento significativo de casos

de co-infecção por *Leishmania* e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) passou a ser considerado de alta gravidade, já que ocorre em mais de 35 países. Dos 200 casos de coinfeção *Leishmania*/HIV relatados no Brasil, 71,5% apresentam a forma cutânea e 25,5% a forma mucosa (Ministério da Saúde, 2008; Tiunan *et al.*, 2011). Na literatura está sendo descrito ainda um aumento do número de casos de LV em países onde a ocorrência da doença era esporádica, como França, Itália, Espanha e Portugal (Desjeux & Avar, 2003; Santos *et al.*, 2008).

Portanto, as Leishmanioses caracterizam um importante problema de saúde pública devido não só a fatores de risco ambiental, como migrações em massa, urbanização, desmatamento e novos projetos de irrigação, mas também a fatores de risco individuais, como HIV e desnutrição.

1.2 Biologia do parasito *Leishmania*

1.2.1 Agente etiológico, vetor e ciclo de vida do parasito

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A característica principal dos kinetoplastídeos é a presença do cinetoplasto, organela próxima à base do flagelo que contém sequências repetidas de DNA (kDNA) (Balaña-Fouce *et al.*, 1998).

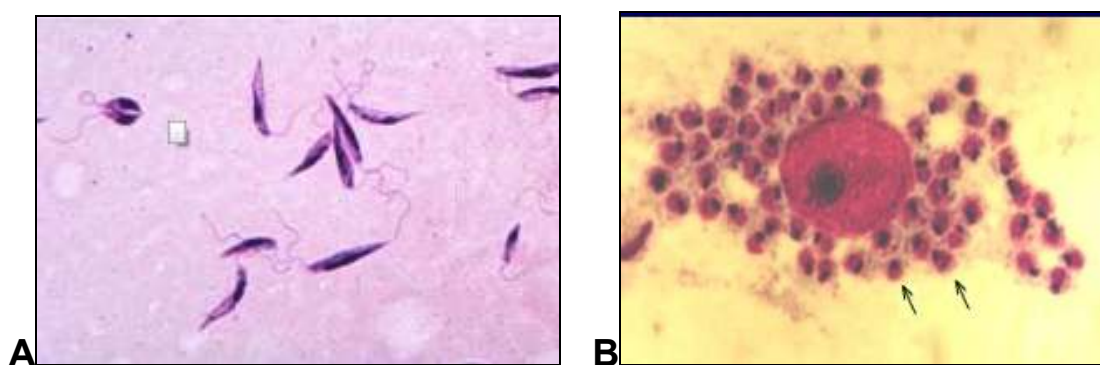


Figura 2: Formas (A) promastigotas e (B) amastigotas de *Leishmania* spp.

Fonte: WHO, [s.d.a].

As Leishmanias são organismos dimórficos, apresentando duas formas no seu ciclo de vida: as promastigotas, que são longas, flageladas e extracelulares, que se

desenvolvem no tubo digestivo do flebotomíneo e as amastigotas, que são esféricas, intracelulares, sem flagelo aparente e são encontradas no macrófago do hospedeiro mamífero, causando diversas doenças em animais e humanos (Fig. 2) (Lin *et al.*, 2005; Rey, 2001; Eslami *et al.*, 2010; Tiuman *et al.*, 2011).

A transmissão das Leishmanioses ocorre através da picada de vetores hematófagos fêmeas, da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Europa e Ásia) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas Central e do Sul) (Fig. 3). Na literatura está descrito que 30 espécies de flebotomíneos são consideradas competentes para a transmissão da doença (Desjeux, 2004).



Figura 3: Flebotomíneo vetor das Leishmanioses. **Fonte:** WHO, [s.d.b].

Seu ciclo pode ser denominado zoonótico, quando inclui o animal como hospedeiro reservatório no ciclo de transmissão e antroponótico, em que o homem é a única fonte de infecção para o vetor; podendo ser considerado ainda o ciclo antroponozoonótico. Em termos de controle, a prioridade tem sido dada a focos antroponóticos, sendo que a viabilidade do controle do tratamento destes pacientes infectados é alta, devido a conhecidos sucessos anteriores, e estes focos são a fonte de epidemias de LV graves e mortais, como no Sudão (Guerin *et al.*, 2002; Desjeux em 2004).

O parasito *Leishmania* possui um ciclo de vida digenético, alternando entre os hospedeiros invertebrados e vertebrados para completar seu desenvolvimento (Fig. 4).

O ciclo de transmissão da doença se inicia com a multiplicação do parasito *Leishmania* no trato digestivo do vetor e estes parasitos são transmitidos para o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo, onde são então internalizados através de macrófagos no fígado, baço e medula óssea (Tiuman *et al.*, 2011), ocorrendo a diferenciação para formas amastigotas que se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos.



Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. **Fonte:** WHO, [s.d.b].

Estes organismos se multiplicam por divisão binária simples, e inicialmente ocorre a divisão do cinetoplasto (um deles conserva o flagelo antigo e o outro produz nova estrutura flagelar); seguida pela divisão do núcleo e, por fim, a do citossomo. Ainda que as divisões sejam sempre binárias e completas, os parasitos permanecem frequentemente agrupados, formando aglomerados com aspectos de rosáceas. Deste modo, o número de parasitos vai crescendo no interior do macrófago parasitado, e devido à grande quantidade de parasitos ocorre a destruição citoplasmática, através da qual a membrana da célula hospedeira se rompe liberando os parasitos que serão fagocitados por outros macrófagos (Bates, 2007; Rey, 2001). Através de um novo repasto sanguíneo em um animal infectado, a fêmea do flebotomíneo vetor ingere macrófagos contendo as formas amastigotas do parasito. Ao longo do trato digestivo do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação dos parasitos que se diferenciam em formas promastigotas que também se reproduzem por divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas. No subgênero *Viannia*, estas formas aderem ao epitélio do intestino posterior do inseto vetor por meio de desmossomos. Já no subgênero *Leishmania*, as formas paramastigotas estão aderidas ao epitélio do intestino anterior dos flebotomíneos. Posteriormente, estes parasitos se diferenciam nas formas infectantes promastigotas metacíclicas que migram para a porção anterior do intestino. Durante novo repasto em um hospedeiro vertebrado, fêmeas infectadas liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Na epiderme do hospedeiro estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear

fagocitário, principalmente os macrófagos, em um processo mediado por receptores, completando o ciclo heteroxênico do parasito (Fig. 4) (WHO, [s.d.b]; Rey, 2001).

1.2.2 Espécies de *Leishmania* e manifestações clínicas

Na literatura está descrito que mais de 30 espécies de *Leishmania* infectam mamíferos. Destas, 20 espécies são patogênicas para os humanos (Desjeux, 2004), sendo divididas em dois subgêneros: *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*, incluindo um conjunto de doenças com características clínico-patológicas representadas pelas formas: visceral, cutânea e mucocutânea. Cupolillo *et al.* (2000) demonstraram que parasitos do gênero *Leishmania* podem infectar répteis e diversas ordens de mamíferos, mostrando uma distribuição mundial nas regiões tropical e subtropical.

Embora a variabilidade genética do hospedeiro, a resposta imune e fatores ambientais possam influenciar o resultado das infecções, o principal fator para a apresentação clínica das Leishmanioses é a espécie do parasito infectante (Tabela 1) (Lipoldova & Demant, 2006; Almeida & Santos, 2011). A forma mais comum é a Leishmaniose Cutânea (LC) que é frequentemente causada por *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e por *L. braziliensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo.

O espectro clínico da LC inclui a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (Ahluwalia *et al.*, 2004) e Leishmaniose Cutâneo Difusa (Fig. 5 A, B e E) (Almeida & Santos, 2011). A LC, também popularmente conhecida como úlcera de Bauru, nariz de tapir ou botão do Oriente, é um grupo de doenças cuja manifestação clínica é caracterizada por uma única ou múltiplas pápulas eritematosas, geralmente localizadas na região exposta do tegumento e que se desenvolvem em úlceras com bordas elevadas, contornos regulares e uma camada de tecido de granulação grossa coberta ou não por secreção purulenta. Já o envolvimento da mucosa nasal, palato, faringe, laringe e cordas vocais acometem cerca de 5% dos pacientes (Rey, 2001; Santos *et al.*, 2008; Tiuman *et al.*, 2011).

A Leishmaniose Visceral (LV) (Fig. 5 C) é a forma mais grave da doença, na qual os parasitos migram para os órgãos vitais, como o fígado e o baço. É uma doença debilitante, caracterizada por febre prolongada, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia, hepatomegalia e consequente perda de suas funções, entre outras diversas alterações, podendo ser fatal se um tratamento eficiente não for estabelecido (Tabela 2) (Croft *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008; Ministério da Saúde, 2008; Tiuman *et al.*, 2011).

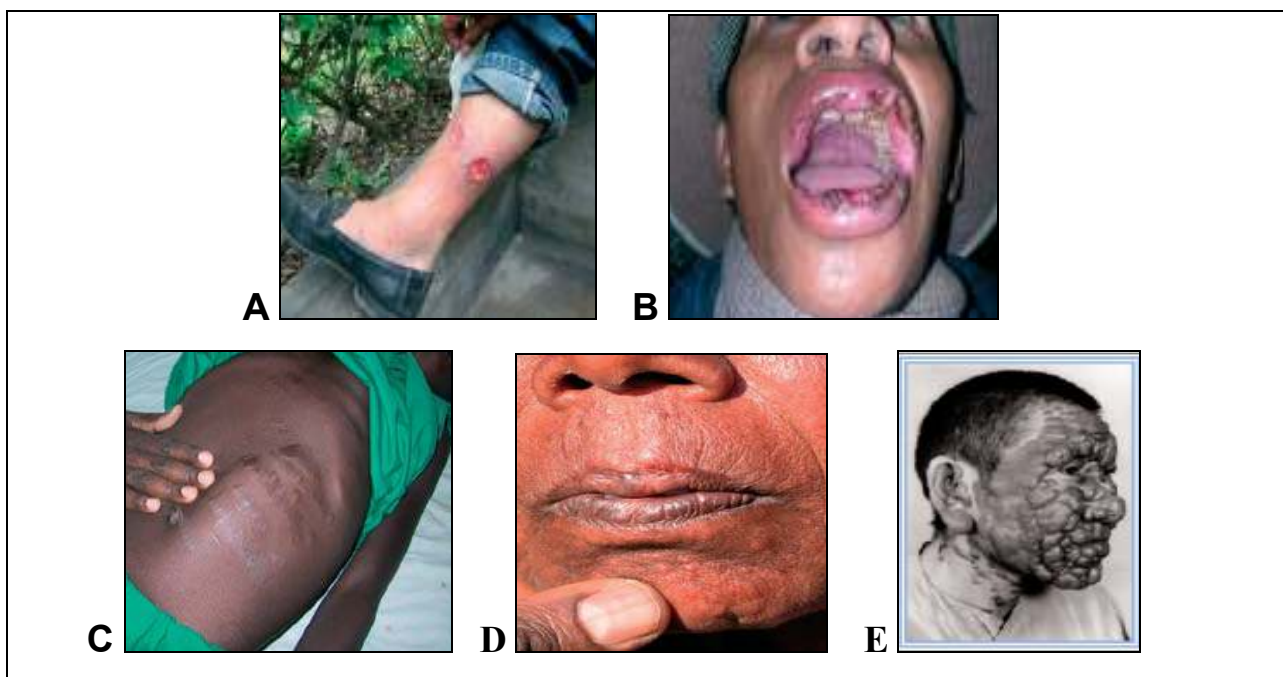


Figura 5: Formas clínicas das Leishmanioses. A) Leishmaniose cutânea. B) Leishmaniose mucocutânea. C) Leishmaniose visceral. D) Leishmaniose dermal pós-calazar. E) Leishmaniose cutâneo difusa. Fonte: Chappuis, 2007; WHO, [s.d.a].

A situação da doença torna-se ainda mais crítica em pacientes imunodeprimidos quando a *Leishmania* aparece como um agente oportunista importante (Desjeux & Avar, 2003; Santos *et al.*, 2008). Neste caso, leva a formas clínicas incomuns e os parasitos apresentam resistência aos tratamentos atuais.

Além das duas principais formas da doença LV e LC, sendo esta última incluindo LMC e Leishmaniose Cutâneo-difusa (LCD), está descrito ainda a Leishmaniose recidiva (LR) e Leishmaniose dermal pós-Kalazar (LDPK) (Fig. 5 D) (Santos *et al.*, 2008), que estão frequentemente ligadas ao estado imune do hospedeiro (pela geração de uma resposta Th1 ou Th2), a variações genéticas e condição nutricional (Romão *et al.*, 2008).

L. (L.) amazonensis, membro do subgênero *Leishmania*, é encontrado nas regiões do Brasil causando Leishmaniose Cutânea (Castro-Pinto *et al.*, 2007). Nas Américas Central e do Sul, os protozoários parasitos do subgênero *Viannia* (incluindo *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*) constituem uma crescente ameaça à saúde, com mais de 39 milhões de pessoas em risco de infecção e pelo menos 60000 novos casos ao ano. Estas espécies causam Leishmaniose Cutânea, mas também são capazes de disseminar, predominantemente através do sistema linfático do

hospedeiro, da lesão cutânea original, para gerar uma lesão secundária debilitante na mucosa nasofaríngea.

Tabela 1- Agente etiológico, síndrome clínica e distribuição geográfica das Leishmanioses que acometem seres humanos

Espécies de <i>Leishmania</i>	Síndrome clínica	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Cutânea e mucosa	América do Sul
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Cutânea	América do Sul
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	Cutânea	Amazônia (Brasil)
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	Cutânea	Amazônia (Brasil)
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	Cutânea	Pará (Brasil)
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Cutânea e cutâneo- difusa	América Central e Brasil
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	Cutânea e cutâneo- difusa	México e América Central
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	Cutânea	América do Sul
<i>Leishmania (Leishmania) pifanoi.</i>	Cutânea e cutâneo- difusa	Venezuela
<i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i>	Visceral	América Central e do Sul
<i>Leishmania (Leishmania) venezuelensis</i>	Cutânea	Venezuela
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	Cutânea	Peru
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	Visceral	Índia, Mediterrâneo
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	Cutânea	Ásia, África, Índia e Oriente Médio
<i>Leishmania (Leishmania) tropica</i>	Cutânea	Ásia, África, Índia e Oriente Médio

Fonte: Marzochi *et al.*, 1994; Aliaga *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2005; Shaw, 2006; Castro-Pinto, 2007; Rey, 2001; Santos *et al.*, 2008; Almeida & Santos, 2011.

Este tipo de disseminação, conhecida como metástase, pode ocorrer diversos anos após a cura da lesão cutânea original; sendo o principal fator que contribui para a morbidade associada com Leishmaniose Mucocutânea (Walker *et al.*, 2005). A patologia desta forma da doença é pouco entendida a nível molecular, embora parâmetros gerais, como o estado imune do hospedeiro, sejam conhecidos por influenciar o resultado clínico da infecção por *Leishmania* (Travi *et al.*, 1996).

A virulência do parasito é um parâmetro extremamente importante no estudo das Leishmanioses. Estudos prévios envolvendo a manipulação e análises de expressão de genes específicos têm identificado diversos fatores potencialmente ligados à infectividade e sobrevivência intracelular da *Leishmania*, incluindo, por exemplo, o estudo do gene Tripanotiona redutase. Dados da literatura mostram que a interrupção da atividade da enzima Tripanotiona

reduz-se em *Leishmania* diminui a habilidade deste parasito em sobreviver ao estresse oxidativo nos macrófagos (Dumas *et al.*, 1997).

Tabela 2- Síndromes clínicas e tipos de lesões causadas pelas Leishmanioses

Síndrome clínica	Tipos de Lesões
Leishmaniose cutânea	Produz lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas
Leishmaniose mucocutânea ou Leishmaniose cutâneo- mucosa	Produz lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe
Leishmaniose cutâneo- difusa	Produz lesões cutâneas disseminadas em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes tratados de Calazar
Leishmaniose visceral	Parasitas apresentam acentuado tropismo pelo Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides.

Fonte: Ministério da Saúde, 2008; Rey, 2001

A vacinação continua sendo uma grande esperança para o controle de todas as formas da doença e o desenvolvimento de uma vacina segura, eficaz e acessível é uma prioridade da saúde pública global. Porém, até o momento nenhuma vacina está disponível, apesar dos esforços de muitos pesquisadores (Kedzierski, 2011).

1.2.3 Perfil molecular do parasito *Leishmania*

Os avanços na tecnologia molecular são facilitadores no que diz respeito à ecologia de populações de *Leishmania*, por fornecerem informações sobre a infecção, padrões de transmissão, resposta ao tratamento e a importância da imunidade na prevenção da infecção. Baseado nesta importância tornou-se então necessário o conhecimento do perfil molecular do parasito (Read *et al.* 2003).

As *Leishmania* spp. são organismos eucariotos, com as seguintes peculiaridades comuns a outros Tripanosomatídeos: ausência de íntrons, regulação da expressão gênica realizada a nível pós-transcricional, agrupamento policistônico dos genes e o processamento do mRNA ocorrendo principalmente via *trans-splicing* (Teixeira, 1998; Ivens *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007; Depledge *et al.*, 2009). Além disso, estas espécies

apresentam o cinetoplasto, uma organela característica da ordem kinetoplastida, sendo que sua parede representa uma parte da única mitocôndria existente na célula. Na matriz que preenche seu interior se encontra uma estrutura filamentosa formada por DNA: o nucleóide. O DNA do cinetoplasto é conhecido como kDNA (extracromossômico) e constitui 20 a 25% do DNA celular (Rey, 2001).

L. major foi a primeira espécie de *Leishmania* a ter seu genoma sequenciado sequenciada e forneceu o modelo para subsequentes análises genômicas. O tamanho do seu genoma haplóide nuclear é de aproximadamente 34 Mb, composto por 36 cromossomos, variando de 0.3 Mb a 2.5 Mb (Wincker *et al.*, 1996). Cerca de treze anos mais tarde foram sequenciados três genomas completos de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*) (Peacock *et al.*, 2007), mostrando que a espécie mais divergente, *L. braziliensis*, possui 47 genes que estão ausentes nas outras duas espécies. Em comparação, *L. infantum* tem 27 genes espécie-específicos, enquanto *L. major* tem apenas cinco (Peacock *et al.*, 2007).

Através da análise de diversas espécies de *Leishmania*, foi indicada a ausência de retro-elementos ativos, sendo a organização dos telômeros distinta das espécies do Velho Mundo. Já a maquinaria de RNAi foi identificada em *T. brucei*, mas não foi demonstrada em *L. major* e *T. cruzi* (Robinson & Beverley, 2003; El- Sayed *et al.*, 2005). Entretanto, uma das mais inesperadas diferenças entre os genomas de *Leishmania* foi a presença de genes envolvidos no mecanismo de RNAi em *L. braziliensis*. Recentemente, foi descrito na literatura que a via do RNAi é funcional em espécies de *Leishmania* do sub-gênero *Viannia* (Peacock *et al.*, 2007; Lye *et al.*, 2010).

Quando comparados os genomas das espécies *L. infantum* (do subgênero *Leishmania*) e *L. braziliensis* (do subgênero *Viannia*) com o genoma de *L. major*, foram encontrados somente 78 genes espécie-específicos. Estes dados sugerem que poucos genes são importantes na patogenicidade e na determinação clínica da doença. 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).

Quanto às sequências de DNA repetitivo, estas compreendem 9-10% do genoma das três espécies de *Leishmania*, sendo que *L. braziliensis* tem o maior número destas repetições e a sintonia apresentada foi de 99% entre os três genomas. Em relação à arquitetura, *L. major* e *L. infantum* possuem 36 cromossomos, enquanto *L. braziliensis* apresenta 35, devido à fusão dos cromossomos 20 e 34. Além disso, a conservação das sequências codificantes entre as espécies foi alta, sendo a identidade da sequência de

aminoácidos e nucleotídeos de 77% e 81%, respectivamente, entre *L. infantum chagasi* e *L. braziliensis*.

1.3 Triparedoxina peroxidase

Os organismos da ordem Kinetoplastida, como *Crithidia*, *Trypanosoma* e *Leishmania* são desprovidos de catalase e glutathione peroxidase. Desta forma, a remoção de peróxidos nestes parasitos é realizada pela via da triparedoxina para regular o estresse oxidativo (Lin *et al.*, 2005).

A glutathione (GSH) possui a função de proteger proteínas e membranas celulares do ataque de peróxidos e outros radicais livres (Fig. 6). Diferente dos mamíferos, os tripanosomatídeos possuem a tripanotiona (T[SH]₂), que é formada por duas moléculas de glutathione ligadas por uma unidade de espermidina (Fig. 6). Sua principal função é fornecer equivalentes reduzidos para regular o balanço intracelular de tiol e facilitar a defesa do parasito contra o estresse químico e oxidativo (Fairlamb *et al.*, 1992; Flohé *et al.*, 1999; Castro-Pinto *et al.*, 2007; Wyllie *et al.*, 2008).

Durante seu ciclo de vida, o parasito *Leishmania* é exposto constantemente a espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH⁻), formados durante a reação de defesa do hospedeiro (Nogoceke *et al.*, 1997; Barr *et al.*, 2003), pela ação de drogas ou pelo metabolismo do próprio parasito; seja pela explosão oxidativa após a fagocitose dos parasitos, ou como produto do metabolismo aeróbico, cuja fonte mais importante é a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

Quando comparados aos mamíferos em relação à habilidade em lidar com o estresse oxidativo, os tripanosomatídeos se mostram deficientes. No entanto, a defesa antioxidante dos tripanosomatídeos é baseada no sistema da tripanotiona redutase que utiliza a tripanotiona como o principal transportador de elétrons que mantém o ambiente intracelular reduzido. Devido a estas diferenças em relação ao hospedeiro mamífero, o sistema de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos é um potencial alvo para quimioterapia (Fairlamb & Cerami, 1992; Temperton *et al.*, 1996). Estas fontes oxidantes podem causar danos aos componentes celulares, como lipídeos de membrana e ácidos nucléicos. Portanto, a sobrevivência do parasito depende de enzimas antioxidantes estrategicamente localizadas na mitocôndria, glicosomo, retículo endoplasmático e citosol e que sejam capazes de eliminar rapidamente as espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio em seus respectivos compartimentos (Flohé *et al.*, 1999; Turrens, 2004; Piñeyro *et al.*, 2005; Harder *et al.*, 2006).

O metabolismo do tiol de *Leishmania* tem se mostrado fundamental no estudo do mecanismo de ação e de resistência às drogas antimoniais. A evasão eficiente de moléculas tóxicas (EROS), produzidas em cada estágio da infecção, é crucial para a sobrevivência e replicação da *Leishmania* no hospedeiro mamífero (Eslami *et al.*, 2010). Quanto à infecção, os macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) como parte de um mecanismo dependente de oxigênio para criar um ambiente desfavorável, na tentativa de destruir os parasitos invasores (Lin *et al.*, 2005). Diversos estudos têm demonstrado que os parasitos *Leishmania* são susceptíveis à morte mediada por EROs e ERNs. ERNs têm se mostrado necessárias e suficientes para controlar a infecção por *L. donovani* em camundongos e que EROs e ERNs produzidas juntas pela ação dos macrófagos podem controlar infecções por *L. chagasi* e *L. donovani* (Lin *et al.*, 2005).

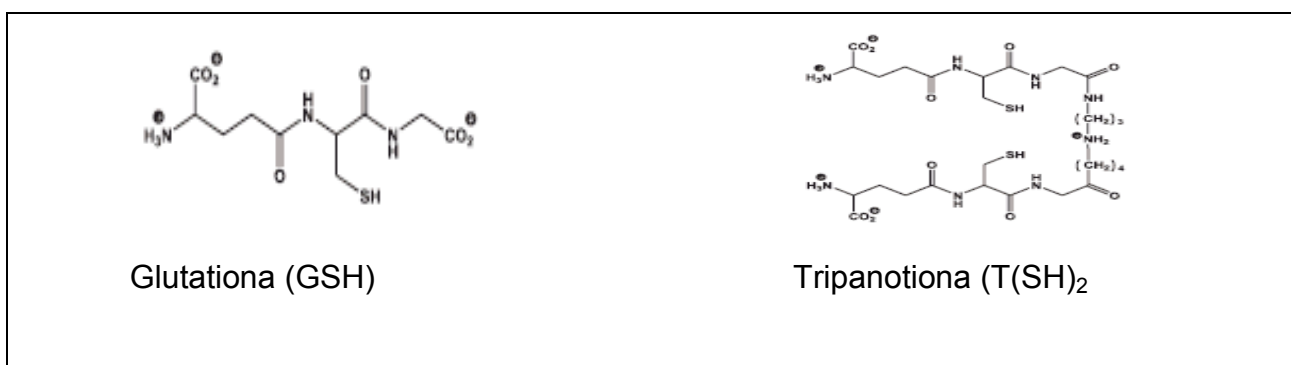


Figura 6: Glutathione e Tripanotiona. **Fonte:** Scielo, 2009.

As peroxirredoxinas representam uma família de enzimas de numerosos membros, estando presentes desde em bactérias a organismos complexos como os mamíferos (Chae *et al.*, 1994; Rhee *et al.*, 1999). A maioria das peroxirredoxinas são peroxidases. O primeiro exemplo deste tipo de peroxidase descrito na literatura foi a proteína antioxidante específica de tiol de levedura (Kim *et al.*, 1988) que foi mais tarde re-classificada como tiorredoxina peroxidase (Chae *et al.*, 1994). Sua função molecular é catalisar a redução de peróxido de hidrogênio, alquil hidroperóxido e peroxinitrito, todos importantes produtos do metabolismo oxidativo e nitrosativo. Pesquisas recentes têm mostrado a presença destas proteínas na regulação de cascatas de sinalização em diversos organismos, podendo ser importantes nos processos de proliferação celular, diferenciação e apoptose (Chen *et al.*

1998, Bryk *et al.* 2000). As Peroxirredoxinas são classificadas com base nas cisteínas que esta família possui em dois motivos conservados nas extremidades C e N terminais. A cisteína da extremidade N- terminal é altamente conservada, porém há algumas variações na extremidade C- terminal desta família.

A triparedoxina e triparedoxina peroxidase foram identificadas pela primeira vez no tripanosomatídeo *C. fasciculata* por Nogoceke *et al.* (2007). Estes autores identificaram um sistema de detoxificação de hidroperóxidos contendo além da tripanotiona e da tripanotiona redutase, duas novas proteínas: Cf16 e Cf21. A primeira, homóloga às tioredoxinas foi nomeada como triparedoxina (TXN) e a segunda, do grupo das peroxirredoxinas, homóloga à TSA (enzima antioxidante), foi denominada triparedoxina peroxidase (TxP).

Castro e colaboradores (2002) descreveram duas peroxirredoxinas em *L. infantum*, sendo uma citoplasmática e outra mitocondrial, que apresenta uma sequência Ile-Pro-Cys, ao invés da sequência comum Val-Cys-Pro no motivo C-terminal. Os autores ainda mostraram posteriormente que esta peroxirredoxina é uma triparedoxina peroxidase (TxP). Ambas as enzimas são expressas nas formas promastigotas e amastigotas e se complementam na proteção dos parasitos contra danos causados por peróxidos. Estudos *in vitro* realizados por Nogoceke e colaboradores (1997) em *C. fasciculata* demonstraram que triparedoxina e triparedoxina peroxidase (TxP) agem juntamente com a tripanotiona e tripanotiona redutase para metabolizar H_2O_2 e outros peróxidos. A triparedoxina peroxidase é um potencial alvo para a quimioterapia anti-tripanosomatídeo, devido ao fato de ser o único sistema antioxidante destes organismos (Nogoceke *et al.* 1997), sendo essencial para a sobrevivência destes parasitos em um ambiente oxidativo desfavorável. Além disso, outras funções têm sido atribuídas à TxP, como a proteção do genoma mitocondrial dos danos causados por peróxidos (Harder *et al.* 2006; Eslami *et al.*, 2008).

A triparedoxina peroxidase (TxP) é uma enzima do sistema de defesa antioxidante do parasito e pertence ao grupo das peroxirredoxinas, que são as peroxidases que fazem a redução de peróxidos a partir de seus grupamentos tióis por não possuírem nenhum grupo prostético. Tem peso molecular que varia entre 20 e 25 KDa e normalmente formam dímeros estáveis em torno de 50 KDa. Pertence à superfamília das tioredoxinasmediando o fluxo de equivalentes reduzidos da tripanotiona à triparedoxina peroxidase, que reduz peróxido de hidrogênio e alquilhidroperóxidos. É considerada um aceptor de ditióis, ou seja, de tripanotiona monomérica, com massa molecular de 16 KDa. (Nogoceke *et al.*, 1997; Turrens, 2004).

Os tripanosomatídeos apresentam variantes de TxP mitocondrial e citosólica, sendo esta última codificada por uma família multigênica, compreendendo cerca de 13 cópias (Walker *et al.*, 2005). Em *T. cruzi*, pelo menos 3 cópias do gene cTxP estão localizados em arranjos em série. *L. major* apresenta entre 8 e 13 cópias de TxP no genoma, sendo organizados em tandem, em arranjos de unidades repetidas, incluindo genes e sequências polimórficas intergênicas. TxP é um gene de múltiplas cópias dispostos em um complexo arranjo em série localizados no cromossomo 15 (Levick *et al.*, 1998).

Como anteriormente mencionado, as proteínas da família das peroxirredoxinas (McGonigle *et al.*), incluindo a TxP, foram identificadas como essenciais para a sobrevivência do parasito na presença de agentes antioxidantes nas células do hospedeiro. Outras funções também tem sido atribuídas à TxP, como a proteção do genoma mitocondrial contra danos diretos ou indiretos gerados por peróxidos (Eslami *et al.*, 2010). A tripanotiona redutase (TR), por sua vez, é uma flavoproteína oxidorredutase dependente de NADPH essencial para a manutenção da concentração intracelular de T[SH]₂ reduzida, desempenhando um papel central no metabolismo do tiol em todos os tripanosomatídeos (Castro-Pinto *et al.*, 2007; Swenerton *et al.* 2010), sendo também essencial no processo de detoxificação. A TR catalisa a transferência de elétrons de NADPH para o substrato específico através do grupo prostético FAD e um redox ativo cisteína dissulfito. A via de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos, descrita por Turrens em 2004, está representada na figura 7.

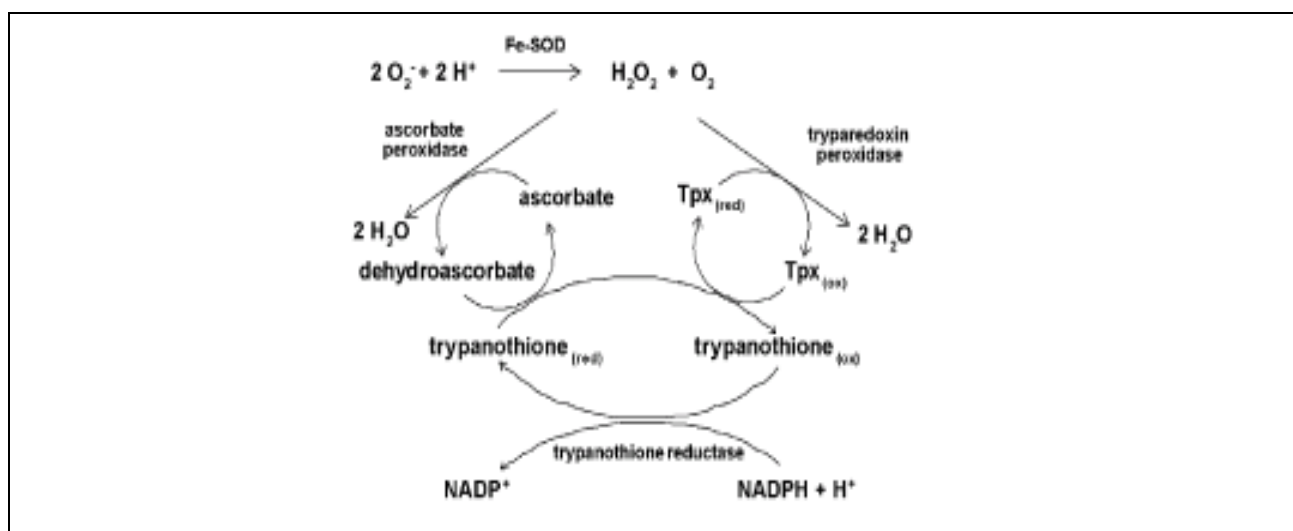


Figura 7: Via de defesa antioxidante dos Tripanosomatídeos. **Fonte:** Turrens, 2004

Estudos têm relacionado a superexpressão da TxP com a resistência tanto ao arsênico quanto ao antimonial em linhagens de *Leishmania* resistentes geradas em laboratório, indicando que a defesa antioxidante, através da superexpressão da TxP, pode ser um indício da resistência aos antimoniais nos isolados clínicos (Lin *et al.*, 2005; Wyllie *et al.*, 2010).

De acordo com Wyllie *et al.*, 2004, o mecanismo de ação dos antimoniais nos parasitos ocorre pela indução do efluxo tripanotiona ($T[SH]_2$) e inibição da atividade da enzima tripanotiona redutase (TR). O SbIII interfere no metabolismo do tiol, diminuindo sua capacidade protetora em *L. donovani* sensível à droga por indução rápida do efluxo de tripanotiona intracelular.

1.4 Quimioterapia das Leishmanioses

Na maioria dos países, o tratamento de primeira escolha para todas as formas de Leishmanioses é a administração de compostos contendo antimônio pentavalente: Estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]) (Murray *et al.*, 2005); seguido pelo uso da Anfotericina B. Esta última atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasito *in vivo* e *in vitro*, agindo através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) na membrana plasmática do parasito (Berman *et al.*, 1992; Ministério da Saúde, 2008). Outras drogas também têm sido usadas no tratamento das Leishmanioses como as Pentamidinas (isotionato e mesilato), Paramomicina e Miltefosina (Fig. 8) (Murray *et al.*, 2005).

No Brasil, os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram utilizados pela primeira vez no tratamento da Leishmaniose Tegumentar em 1913 por Gaspar Vianna. Mas o seu uso foi descontinuado devido aos diversos efeitos colaterais. O tratamento com os antimoniais pentavalentes foi inserido na década de 40 e permanece até os dias de hoje como o tratamento de primeira escolha para Leishmanioses Visceral e Cutânea (Amato *et al.*, 2008).

Estas drogas utilizadas no tratamento das Leishmanioses apresentam diversas limitações, incluindo uma alta toxicidade com a ocorrência de graves efeitos colaterais; sendo o principal deles a sua ação sobre o aparelho cardiovascular, além de apresentarem alto custo (Berhe *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008). Após mais de meio século como a principal quimioterapia, o valor clínico do antimonial está ameaçado ainda pelo surgimento de parasitos resistentes a esta droga.

Quanto ao mecanismo de ação do antimonial, este também não está totalmente elucidado, porém sabe-se que o efeito leishmanicida é exercido pela forma trivalente do antimonial (SbIII). Esta droga inibe enzimas da via glicolítica e a β -oxidação de ácidos graxos e que o SbIII causa distúrbios no potencial tiol-redox do parasito (Herwaldt, 1999; Wyllie *et al.*, 2004). De acordo com Sereno *et al.*, (2001) e Sudhandiran *et al.*, (2003), estas alterações no potencial redox fazem com que as células entrem em estado apoptótico em resposta ao SbIII, mostrando que a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio constitui em um enorme dano para o parasito. Dados da literatura mostraram que o SbIII inibe a enzima tripanotiona redutase *in vitro*, sugerindo que a inibição desta enzima essencial é de grande interesse, devido ao fato de ser intermediária na regulação do equilíbrio de tiol, bem como na defesa contra o estresse químico e oxidativo (Wyllie *et al.*, 2004). Mukhopadhyay e colaboradores (1996) observaram um aumento nos níveis de tripanotiona em parasitos resistentes ao SbIII.

Estudos têm mostrado que o SbV é uma pró-droga, não sendo tóxico para a *Leishmania*, precisando portanto, ser enzimaticamente reduzido à forma SbIII para se tornar biologicamente ativo, se tornando altamente tóxico para o parasito (Shaked-Mishan *et al.*, 2001; Natera *et al.*, 2007). Além disso, o sítio de redução ainda é desconhecido, podendo ocorrer no fagócito do hospedeiro, no citoplasma do parasito ou em um sistema extracelular (Shaked-Mishan *et al.*, 2001; Brochu *et al.*, 2003).

Na busca pelo entendimento dos mecanismos de resistência à droga em *Leishmania*, dados da literatura mostraram que o SbV se apresentou tóxico para amastigotas axênicos, mas não foi ativo para as formas promastigotas. Este resultado sugere que algumas reduções estágio-específicas ocorrem na forma amastigota do ciclo de vida do parasito. Entretanto há relatos de que o SbV pode ser convertido em SbIII em células humanas e modelos animais, assim ambos os mecanismos podem estar atuando. Estes dados mostram que o parasito reduz SbV a SbIII intracelularmente, e ainda que o SbIII é tóxico para amastigotas e promastigotas.

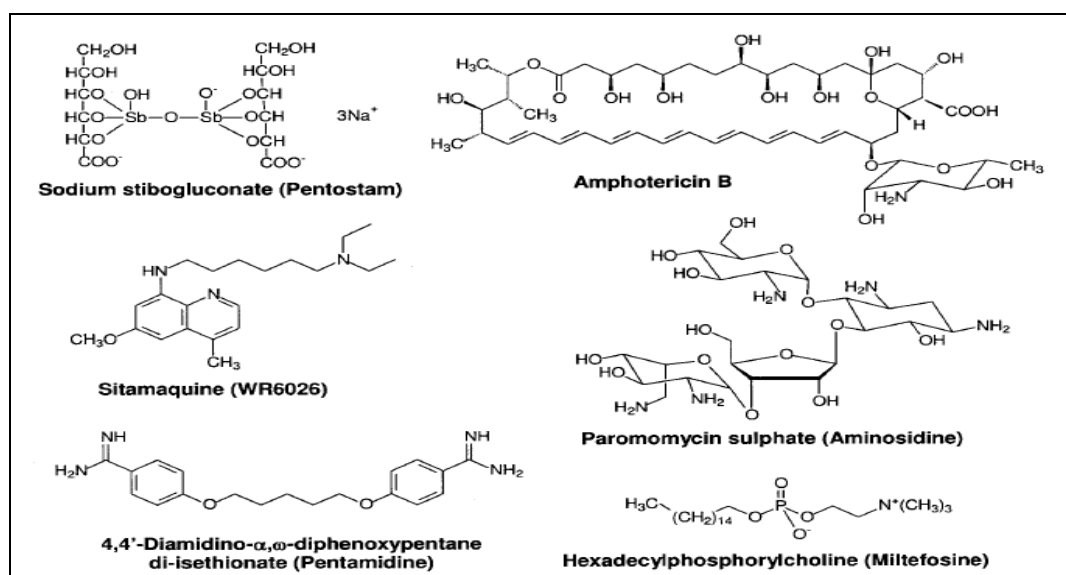


Figura 8: Drogas usadas no tratamento das Leishmanioses. **Fonte:** Croft, 2006.

Porém o fato de ambos os estados de oxidação do antimônio serem ativos contra a forma amastigota, reforça o indício de que o mecanismo de ação ainda permanece sem elucidação conclusiva (Ouellette *et al.*, 2004; Croft *et al.*, 2006; Ashutosh *et al.*, 2007).

Quanto às variações, estas também ocorrem na resposta clínica aos antimoniais pentavalentes em LV, LC e LMC e têm sido um problema persistente no tratamento da doença nos últimos 50 anos (Croft *et al.*, 2006). Uma explicação para este fenômeno é a diferença intrínseca na sensibilidade das espécies de *Leishmania* a esta droga. Porém, alguns estudos clínicos sugerem que tanto o uso de doses de 5 mg/Kg/dia de SbV, por via sistêmica, como a terapia intralesional com N-metil-glucamina podem ser eficazes, com menor toxicidade e menor custo (Rey, 2001).

Nos últimos 15 anos, a má administração clínica dos antimoniais e outros fatores como a transmissão antroponozoonótica do parasito permitiu o desenvolvimento de resistência generalizada destes compostos na Índia. Neste país ocorre metade dos casos de Leishmaniose Visceral no mundo, sendo que a maior parte dos pacientes não responde ao tratamento devido à resistência do parasito à droga (Sundar, 2001). Porém a falha terapêutica não se deve apenas à ocorrência de resistência aos antimoniais, mas a fatores ligados ao hospedeiro, como imunossupressão devido ao HIV e má nutrição; à própria droga, como problemas relacionados ao lote e falsificação; às espécies de *Leishmania* ou à prática do tratamento incompleto (Croft, 2001).

Além disso, o tratamento dos cães infectados constitui um problema para a quimioterapia, já que este promove a melhora clínica, mas não parasitológica, elevando o risco de ocorrência de parasitos resistentes à droga, levando à proibição do tratamento de cães pela OMS (Portaria Interministerial Número 1426 de 11 de julho de 2008).

1.5 Resistência aos antimoniais

Os mecanismos de resistência às drogas nos tripanosomatídeos não estão totalmente elucidados. Em *Leishmania*, a grande maioria dos estudos foi realizada com espécies do parasito do Velho Mundo e pouco se sabe a respeito desses mecanismos de resistência nas espécies predominantes no Novo Mundo. Alguns mecanismos de resistência em *Leishmania* incluem a inibição da captação da droga, eliminação da droga, bloqueio da ativação da droga e aumento da defesa antioxidante (Borst & Ouellette, 1995; Ullman, 1995; Pradines *et al.*, 2005).

Uma rota promissora para o desenvolvimento de compostos contra patógenos humanos, tal como *Leishmania*, é a identificação de diferenças entre o metabolismo do parasito e do hospedeiro, e o desenvolvimento de inibidores de enzimas específicas do parasito (Castro-Pinto *et al.*, 2007).

Os dados alarmantes de resistência aos antimoniais foram descritos em Bihar, norte da Índia, onde cerca de 60% dos 250.000 casos anuais de LV não apresentam resposta ao tratamento com SbV (Decuyper, 2005). Já no Brasil, insucessos terapêuticos têm sido observados em 10 a 25% dos casos (Rocha *et al.*, 1980; Marsden *et al.*, 1985; Sundar *et al.*, 2000; Ministério da Saúde, 2006). A complexidade dos estudos de resistência à droga se deve ao fato de que existem diversos mecanismos de resistência e a resistência a uma droga pode envolver vários mecanismos. Alguns destes mecanismos descritos na literatura em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo estão listados abaixo:

1- Diminuição da entrada da droga na célula, em que estudos mostraram que a Aquagliceroporina 1 (AQP1), responsável pelo influxo de droga na célula, apresenta expressão diminuída em amostras resistentes de *Leishmania* (Gourbal *et al.*, 2004) ;

2- Eliminação da droga pela célula, devido à superexpressão das fosfoglicoproteínas de membrana (PGP) e/ou outras proteínas transportadoras dependentes de ATP (MDR) (Zhou *et al.*, 2004; Haimeur *et al.*, 2000) em linhagens de *L. infantum* resistentes ao SbIII (El Fadili *et al.*, 2005) ;

3- Diminuição da ativação da droga, quando o SbV não é totalmente reduzido a SbIII devido à diminuição da expressão de uma redutase dependente de tiol (TDR1) (Borst & Ouellette, 1995; Denton *et al.*, 2004; Pradines *et al.*, 2005);

4- Defesa antioxidante, através do aumento da expressão da enzima TxP, em populações de *Leishmania* resistentes ao SbIII (Wyllie *et al.*, 2004). Além destes, Ubeda *et al.* (2008) descreveram alguns mecanismos de resistência frequentes em *Leishmania*, como deleção de genes, aneuploidia e formação de amplicons extracromossômicos circulares ou lineares.

Inicialmente, os estudos acerca dos mecanismos de resistência de *Leishmania* spp. ao antimonial se restringiam às linhagens resistentes obtidas no laboratório após indução de resistência *in vitro*. Recentemente, as falhas relacionadas à resistência ao SbV têm sido confirmadas em isolados clínicos resistentes a esta droga (Wyllie *et al.*, 2010). Além disto, os autores demonstram que os elevados níveis de tiol sozinhos não resultam na resistência ao SbIII. Entretanto, a modulação dos níveis de tripanotona através do uso de inibidores da biossíntese de tiol revertem a resistência, indicando que a resistência ao antimonial é multifatorial (Wyllie *et al.*, 2008), mostrando a importância do metabolismo do tiol nos mecanismos de resistência destes parasitos a esta droga (Wyllie *et al.*, 2010).

Como estratégias de controle das Leishmanioses, a Organização Mundial de Saúde recomenda o controle vetorial, a eliminação de cães soropositivos e o tratamento dos pacientes. Apesar dos avanços bioquímicos e moleculares, o controle das Leishmanioses baseia-se principalmente na quimioterapia, diante da dificuldade de um controle vetorial efetivo e do fato de vacinas contra este parasito ainda estarem em desenvolvimento (Palatnik-de-Sousa, 2008).

O antimonial pentavalente (SbV) tem sido o pilar da quimioterapia anti-*Leishmania* e continua a desempenhar um papel importante no tratamento. Porém, como já mencionado, este tratamento apresenta algumas limitações, como a alta toxicidade dos fármacos de uso clínico, o alto custo e a ocorrência de cepas do parasito resistentes ao medicamento.

O fenômeno da resistência a antimicrobianos tem sido um sério problema de saúde pública com implicações econômicas e sociais em escala global (WHO, [s.d.b]). Diante disto, estudos de mecanismos de resistência a drogas são importantes, pois permitem o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico para o reconhecimento precoce da resistência, impedindo assim uma quimioterapia desnecessária e muitas vezes tóxica. Eles sugerem ainda o uso racional dos medicamentos e combinações de drogas, minimizando, portanto, o desenvolvimento de resistência. Por último, estes estudos identificam alvos de drogas intracelulares e mecanismos de defesa, permitindo o desenvolvimento de análogos de drogas para contornar as defesas mais comuns.

Do ponto de vista molecular, muitos genes e mecanismos de resistência a drogas em *Leishmania* já foram descritos. No entanto, a grande maioria dos estudos foi realizada com espécies de *Leishmania* do Velho Mundo e pouco se sabe a respeito desses mecanismos de resistência nas espécies predominantes no Novo Mundo. Com o objetivo de estudar os mecanismos de resistência em espécies de *Leishmania* que acometem o nosso país, nosso grupo selecionou *in vitro* populações das espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi* e *L. guyanensis* resistentes ao tartarato potássico de antimônio (SbIII) (Liarte & Murta, 2010). Estes parasitos apresentam resistência à concentração de SbIII de 4 a 20 vezes maior comparada aos seus respectivos pares sensíveis.

O sistema de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos é um potencial alvo para quimioterapia, uma vez que ele difere daquele encontrado no hospedeiro vertebrado. Estes parasitos possuem um sistema baseado no tiol de baixa massa molecular tripanotiona, que mantém o ambiente intracelular reduzido pela ação de várias enzimas. A enzima triparedoxina peroxidase faz parte desta via, metabolizando o peróxido de

hidrogênio em moléculas de água. Wyllie e colaboradores (2008) observaram um aumento nos níveis da enzima triparedoxina peroxidase em amostras de *L. tarentolae* resistente ao antimônio trivalente, sugerindo uma possível associação desta enzima no fenótipo de resistência deste parasito.

Diante disto, no presente trabalho, o gene que codifica a enzima triparedoxina peroxidase foi caracterizado nas 8 populações de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente (SbIII). Posteriormente superexpressamos esta enzima nas amostras de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* sensíveis (Lb WTS, Lc WTS) e resistentes (Lb SbR e Lc SbR) ao SbIII, caracterizamos os parasitos transfectados e analisamos o fenótipo de resistência destes parasitos ao SbIII, verificando a existência ou não de alteração do fenótipo.

A análise funcional das enzimas da defesa antioxidante como a triparedoxina peroxidase, foco deste estudo, em amostras de *Leishmania* do Novo Mundo é de grande importância para o entendimento dos mecanismos de resistência do parasito e para a busca de novos alvos para o desenvolvimento de drogas.

3.1- Objetivo geral

Caracterizar o gene que codifica a enzima triparedoxina peroxidase em populações de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente.

3.2- Objetivos específicos

- Verificar o nível de mRNA do gene triparedoxina peroxidase em populações de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente;
- Determinar o número de cópias e possíveis polimorfismos desse gene nestas populações;
- Avaliar o nível de expressão da proteína triparedoxina peroxidase nas populações de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente;
- Clonar a sequência codificante do gene TxP para os ensaios de transfecção;
- Sequenciar os plasmídeos recombinantes;
- Transfectar o gene TxP nestes parasitos para superexpressar esta proteína;
- Avaliar a susceptibilidade dos parasitos transfectados ao antimonial trivalente.

4.1 Populações de *Leishmania* spp. e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas formas promastigotas de populações de *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* (Tabela 3) sensíveis e com resistência induzida *in vitro* ao antimonial trivalente (SbIII), obtidas por Liarte & Murta (2010). As populações foram mantidas a 27°C em meio M199, suplementado com 40 mM de HEPES, pH 7,4; 1 µg/ml de biotina; 5 µg/ml de hemina; 2 µg/ml de biopterina; 2mM de L-glutamina; 500U de penicilina; 50 µg/ml de estreptomicina e soro fetal bovino inativado 10%. Todos os experimentos foram realizados com os parasitos na fase exponencial de crescimento.

Tabela 3: Espécies e cepas de *Leishmania* utilizadas neste estudo

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

Fonte: Liarte & Murta, 2010.

4.2 Extração de DNA genômico de *Leishmania* spp.

O sedimento, obtido por centrifugação, contendo as formas promastigotas (1×10^8 parasitos) na fase exponencial de crescimento das populações sensíveis e resistentes de *Leishmania* spp. foi ressuspendido em tampão de extração (10 mM de Tris-HCl pH 8; 25 mM de EDTA pH 7-8; 0,15 M de NaCl e 0,5% de SDS) e incubado com 20 µg/ml de RNase A por 12h a 37°C. Posteriormente foram adicionados 100 µg/ml de proteinase K e as amostras foram incubadas por 1h a 37°C.

O DNA foi extraído pelo método Fenol/Clorofórmio conforme protocolo previamente descrito (Sambrook e colaboradores, 1989). Em cada amostra foi adicionado fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (1:1:24) e clorofórmio/álcool isoamílico (1:24) e o DNA precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 100% e acetato de sódio 3M pH 5,2, seguido de incubação por 1h a 4°C. Posteriormente, o DNA foi lavado com

etanol 70% e ressuspensionado em 100 µl de água pura (livre de DNase e RNase). A concentração do DNA foi determinada pelo espectrofotômetro Nanodrop (ND- 1000 Spectrophotometer V 3.2).

4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para amplificação de um fragmento de 136 pb do gene TxP. Este fragmento foi utilizado nos ensaios de Clonagem e PCR Quantitativo em Tempo Real. A sequência codificante do gene da Triparedoxina peroxidase (600 pb) foi utilizada no ensaio de Transfecção deste gene em *Leishmania*. As sequências dos iniciadores utilizados neste estudo estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação das regiões alvo do gene da triparedoxina peroxidase, SSU (rRNA) e do gene que confere resistência à blastomicina.

Ensaio	Gene	Iniciadores	Sequência (direção 5' → 3')	Tamanho fragmento
PCR Quantitativo em Tempo Real e Clonagem	Triparedoxina peroxidase	TxP F	CGGTGACGCCAAAATGAAC	136 pb
		TxP R	GAAGTCAAGCGGGTAGAAGAAGAG	
	SSU rRNA	SSU F	TCTAGGCTACCGTTTCGGCTT	60 pb
		SSU R	CACACACCGAACCGAAGTTG	
Transfecção	Triparedoxina peroxidase	TxP BglII F	<u>t</u> AGATCTccaccATGTCCTGCGGTGACGCCAA	600 pb
		TxP BglII R	ttAGATCTCTACACCGTGCTGAAGTAGC	
	Blasticidina	BSD F BSD R	ATGGCCAAGCCTTTGTCTCA TTAGCCCTCCCACACATAACCAGAG	399 pb
Southern blotting e Northern blotting	Triparedoxina peroxidase	TxP F TxP R	CGGTGACGCCAAAATGAAC ttAGATCTCTACACCGTGCTGAAGTAGC	592 pb

F – Iniciador direto R – Iniciador reverso. Sítios de restrição sublinhados.

Os iniciadores (Tabela 4) foram desenhados a partir da sequência nucleotídica completa do gene da triparedoxina peroxidase depositada no banco de dados GeneDB (LbrM15_V2.1080). Cada reação de PCR foi realizada, utilizando: tampão de reação (50mM KCl; e 10mM de Tris-HCl pH 8,5); 1,5 mM MgCl₂; dNTPs (10mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos); 10 pmoles de cada iniciador; enzima Taq DNA Polimerase Phoneutria 5U/µl; DNA de *L. braziliensis* (10 ng/µl), em volume final de reação de 10 µl.

As reações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) 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 a 72°C por 5 min.

4.4 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

Para verificação do resultado da PCR, 3 µl do produto da reação juntamente com 3 µl do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xilenocianol em 20% de glicerol) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (10 ml). Para a polimerização do gel foram utilizados persulfato de amônio (APS) 10% e TEMED (N,N,N',N' –tetrametil-etilenodiamina) a 0,05%, juntamente com Bis-acrilamida a 6%. Após a eletroforese a 100 V por 1h, o gel foi fixado em 150 ml de solução de etanol a 10% com 0,5% de ácido acético 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% com 0,5% de formaldeído, até a visualização das bandas (Sanguinetti *et al.*, 1994).

4.5 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 à coluna. O DNA permaneceu ligado à coluna e os outros componentes da reação de PCR (magnésio, tampão de reação e outros) foram lavados com o tampão PE contendo etanol e centrifugado a 17.900 xg por 1 min. O DNA foi eluído em 50 µl de água pura, livre de DNase e RNase, aquecida a 95°C por 2 min. Posteriormente foi realizada uma última centrifugação, para liberação do DNA purificado da coluna.

4.6 Extração de RNA total

O RNA total de 1×10^8 células de *Leishmania* spp. foi extraído com TRIZOL de acordo com o protocolo do fabricante (INVITROGEN). O sedimento contendo as formas promastigotas na fase exponencial de crescimento foi ressuspensionado com TRIZOL. 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. Foi adicionado o

mesmo volume de isopropanol 95% e incubado a -20° C por 12-18h. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70%, secado e ressuspendido em água pura, livre de RNase. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop (ND- 1000 Spectrophotometer V 3.2).

4.7 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA, foram utilizados 10 µg de RNA total. Primeiramente foi realizado o tratamento com DNase I, na concentração final de 1U/ µg de RNA a 25°C por 15 min e posteriormente incubado por 65°C por 10 min. Em seguida, o RNA tratado com DNase foi submetido à síntese de cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen- Carlsbad, CA). Foram então adicionados à amostra: tampão de reação 1X; 10 mM de DTT; 10 mM de cada dNTP; 40 U de RNase Out; 200 U da enzima transcriptase reversa e 500 µg de Oligo dT. As amostras foram incubadas a 37°C por 5 min e 42°C por 60 min. Em seguida a reação foi inativada a 72°C por 20 min e o cDNA foi diluído 10X em água deionizada para ser utilizado na RT-qPCR.

4.8 Preparação de bactérias cálcio-competentes

Amostras da bactéria *E. 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 colocadas 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 600nm entre 0,4 e 0,6. Atingindo este crescimento, as bactérias foram incubadas em gelo por 10 min e posteriormente centrifugadas a 4.170 xg a 4°C por 10 min. O sedimento foi ressuspendido em 25 ml 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 ressuspendido e lavado novamente com a solução de cloreto de cálcio, seguido de centrifugação por 15 min. O sedimento foi novamente ressuspendido em solução de cloreto de cálcio contendo glicerol 10% no volume final de 160 µl. As células foram aliquotadas (60 µl/tubo) e armazenadas a -70°C.

4.9 Clonagem dos genes da triparedoxina peroxidase e SSU (subunidade menor do RNA ribossomal)

A clonagem dos fragmentos dos genes TxP e SSU (rRNA), bem como a sequência codificante do gene TxP foram realizadas a fim de obter plasmídeos recombinantes contendo os genes de interesse. Estes plasmídeos foram utilizados na curva padrão para a reação de qPCR e para o ensaio de transfecção do gene TxP completo em *Leishmania*.

Para clonagem do fragmento do gene TxP foi utilizado o vetor pCR[®]2.1-TOPO[®]/Invitrogen (Fig. 9). O produto de PCR purificado utilizado para clonagem foi obtido conforme descrito nos itens 4.3 a 4.5, mantendo o mesmo par de iniciadores descrito na Tabela 4 para TxP. Para a etapa de ligação, foram utilizados: 1 µl da solução de reação do KIT TOPO (Invitrogen), 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.



Figura 9: Vetor pCR[®]2.1-TOPO[®]. **Fonte:** Invitrogen, 2012.

Para a clonagem do gene SSU, bem como a sequência completa do gene TxP, foi utilizado o vetor pGEM[®]-T easy/ Promega (Fig. 10). O produto de PCR purificado utilizado para clonagem também foi obtido conforme mencionado anteriormente, mantendo o mesmo par de iniciadores descrito na Tabela 4 para SSU e o gene TxP completo. Para a etapa de ligação, foram utilizados: 5 µl do tampão de ligação 2X, 3 µl do produto de PCR purificado, 1 µl da enzima T4 DNA ligase e 1 µl do vetor pGEM[®]-T easy (50 ng). A reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora.

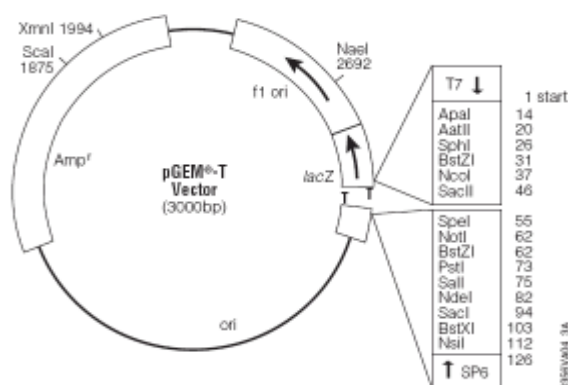


Figura 10: Vetor pGEM®-T easy. **Fonte:** Promega, 2012.

Para clonagem dos genes de interesse em bactérias foi realizada a transformação por choque térmico. Nesta etapa, 4 µl da reação de ligação do gene nos plasmídeos foram incubados com 60 µl da bactéria *E. coli* TOP 10 F' cálcio competentes durante 30 min em gelo. Em seguida a amostra foi incubada a 42°C por 40 seg para o choque térmico. Após este procedimento, foi adicionado à amostra 1 ml de meio LB líquido sem antibiótico e incubado a 37°C por 1 h sob agitação. Após este período, as bactérias foram plaqueadas em meio ágar sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina, 4 µl de IPTG (Isopropylthio-B-D-Galactoside, 0,4 mM) e 40 µl de X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-B-Galactosídeo, 4%) e incubado a 37°C durante 12 a 16h.

A confirmação da clonagem foi feita através de PCR das colônias transformadas com os iniciadores específicos (conforme protocolo descrito no item 1.5.3). As colônias positivas foram submetidas à criopreservação com glicerol 50% e extração de plasmídeos utilizando o Kit mini-prep (QIAGEN), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, o sedimento de bactérias foi ressuscitado em 250 µl de tampão de ressuspensão. Posteriormente, foi adicionado à amostra 250 µl de tampão de lise e 350 µl de tampão de neutralização. Após centrifugação a 12.000 xg por 10 min, o sobrenadante foi aplicado à coluna, centrifugado por 10 min e o eluato descartado. Após lavagens, o plasmídeo foi eluído em 50 µl de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min. O plasmídeo purificado foi dosado no espectrofotômetro (Nanodrop) e utilizado em diluições seriadas (para SSU e TxP) para obtenção da curva padrão para RT- qPCR.

4.10 PCR quantitativo em tempo real (RT- qPCR)

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para quantificar a expressão diferencial do gene Triparedoxina peroxidase nas amostras de *Leishmania* spp. As

reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador, tampão 1X SYBR GREEN (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1 U AmpliTaq Gold DNA polimerase, 5 µl de cDNA diluído 10X e água deionizada para completar o volume final da reação de 20 µl. A amplificação foi realizada no equipamento “Sistema de Detecção da Sequência 7500 System SDS Software/ Versão 2.0.4 (Applied Biosystems). Nesta etapa foi utilizado o seguinte programa de amplificação: 95 °C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg, seguido por anelamento e 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 o gene de interesse Triparedoxina peroxidase e do plasmídeo pGEM[®]-T easy (Promega) contendo o gene constitutivo SSU clonados.

O corante SYBR GREEN intercala na dupla fita de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Os resultados foram analisados utilizando o programa “Sequence Detection System” (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação e a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo.

O gene constitutivo ribossomal SSU de *L. braziliensis* foi usado para normalizar a quantidade de amostra analisada e a diferença no nível de expressão foi analisada entre as populações de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao SbIII.

4.11 Extração de proteínas totais de *Leishmania* spp

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 3 vezes e posteriormente submetidos à extração de proteínas. O sedimento de parasitos foi ressuspenso em 0,3 ml de tampão de lise pH 8.0 contendo 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, detergente NONIDET P-40 (SIGMA) 1% e coquetel de inibidores de proteases (1.000 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml aprotinina e 5 mM EDTA) da ROCHE, que contém PMSF (Phenylmethyl-Sulfonyl Fluoride- 44,2 mg/mL), Pepstatina 68,6 mg/mL, TPCK (tosil-amido-2-feniletil clorometil cetona- 2mg/mL), TLCK (tosil-lisina clorometil cetona- 0,5 mg/mL). Após homogeneização a solução foi submetida à centrifugação a 4500g por 1h a 4°C. A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Para tal, foi construída uma curva padrão, em triplicata, com a albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0.6; 1.2; 2.4; 3.6 e 4.8 µg. Foram aplicados na placa de ELISA, 20 µl da proteína diluída em PBS (1: 40) e 180 µL do Reagente de Bradford (100

mg de Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%). As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (BioRad), a um comprimento de onda de 595nm. O resultado foi visualizado utilizando o programa SoftMax. Após a dosagem, as amostras foram aliquotadas e armazenadas à -70°C.

4.12 Western blotting

O nível de expressão da proteína TxP nas populações de *Leishmania* spp em estudo foi verificado através do ensaio de *Western blot*. Neste estudo as proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% e em seguida transferidas para membranas de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979) a 100V por 1h no gelo em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; metanol 20%; pH 8.3).

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (PBS 1X-Tween20; leite em pó desnatado a 5%) por 1h e lavadas em PBS-Tween20 por 3x. Em seguida elas foram incubadas com o anticorpo primário anti-TxP de *T. cruzi* (Nogueira *et al.* 2008) na diluição 1:500 a 4°C durante 12 a 16h. As membranas foram lavadas e incubadas por 1h com o conjugado anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina, diluído a 1: 6000 (Promega). Depois de lavadas, as membranas foram reveladas com 33 µl e 66 µl dos substratos 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) e nitro blue tetrazolium (NBT), respectivamente, em tampão fosfatase alcalina (AP), de acordo com o protocolo do fabricante (Bio-Rad). A quantificação das bandas foi realizada através do programa Cpatlas, versão 2.0.

4.13 Southern blotting

Aproximadamente 10 µg de DNA genômico de *Leishmania* spp foram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RI por 16h a 37°C. A enzima *Bam*HI cliva e a *Eco*RI não cliva a sequência do gene TxP. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Os geis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL) e posteriormente transferidos para membranas de náilon (Hybond-Amersham Biosciences) em tampão SSC 10X (1,5 M NaCl; 150 mM citrato de sódio). As membranas foram hibridizadas com a sonda do gene TxP marcado com ³²P.

4.14 Northern blotting

O RNA das amostras de *Leishmania* spp (20 µg) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão MOPS 1X (0,04 M MOPS; 1 mM EDTA; 5 mM acetato de sódio pH 7,0 e 7,7% de formaldeído). Após eletroforese a 50 V por 4h o gel foi corado com brometo de etídeo, fotografado e transferido para a membrana de náilon durante 12h usando tampão SSC 10X. Em seguida, as membranas foram hibridizadas com a sonda do gene TxP marcado com ^{32}P , conforme descrito abaixo.

4.15 Preparação das sondas e ensaio de hibridização

As sondas para os ensaios de *Northern* e *Southern blotting* foram preparadas a partir da amplificação de um fragmento de 592 pb do gene da TxP, usando como molde o DNA de *L. braziliensis* e iniciadores específicos (Tabela 4). Após a amplificação, purificação e precipitação, o produto de PCR foi marcado com $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ utilizando o Kit nick translation (Invitrogen) conforme protocolo descrito pelo fabricante. As membranas foram incubadas por 2h a 60°C com 15 ml de solução de hibridização (BSA 1%; 500 mM NaH_2PO_4 ; 1 mM EDTA e 7% SDS), para uma pré- hibridização. Posteriormente as membranas foram hibridizadas nesta mesma solução contendo a sonda marcada com ^{32}P por 14h. A temperatura de 50°C foi utilizada para o ensaio de *Northern blotting* e 65°C para o ensaio de *Southern blotting*. Em seguida, as membranas foram lavadas com SSC 2X e 0,1% SDS à temperatura ambiente, sendo posteriormente expostas ao filme de raio-X e incubadas a -70°C. Após 3 a 6 dias, os filmes de raio X (KODAK) foram revelados e fixados.

4.16 Sequenciamento

O sequenciamento dos plasmídeos contendo a sequência parcial e completa do gene TxP de *L. braziliensis* foi realizado com o objetivo de verificar a sequência de bases correta deste gene. O produto de PCR do gene TxP foi clonado, conforme descrito no item 1.5.9. Seis clones de cada amostra foram sequenciados duas vezes com cada iniciador (direto e reverso). Uma alíquota de 1 µl (100ng) de DNA foi utilizada na reação de sequenciamento com o Kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), utilizando os iniciadores M13 direto 5'GTAAACGACGGCCAG3' e M13

reverso 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'. Primeiramente foi realizada a reação de seqüenciamento, na qual foram utilizados 1 µl de DNA (100ng); 0,5 µl do mix de reação BigDye; 2 µl de iniciador M13 forward ou reverse (0,8 pmoles/ µl); 1,5 µl de tampão de diluição 5X e 5 µl de água deionizada para completar um volume final de 10 µl. Esta reação de seqüenciamento foi submetida a variações de temperatura, iniciando com a desnaturação a 96 °C por 1 min; 44 ciclos de 96 °C por 15 seg/ 50 °C por 15 seg e 60 °C por 4 min. Após este procedimento, foi realizada a precipitação e lavagem das amostras para purificar o produto e obter melhor resolução no seqüenciamento.

As amostras foram seqüenciadas no seqüenciador capilar ABI 3130 (Applied Biosystems), no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares/ICB/UFMG. Os dados foram analisados usando os programas BioEdit, Sequence scanner e também o programa Phred. Apenas as seqüências com "Phred" > 20 foram utilizadas no alinhamento.

4.17 Sub-clonagem do gene triparedoxina peroxidase no vetor de expressão pIR1-BSD de *Leishmania*

Para a sub-clonagem do gene triparedoxina peroxidase no vetor pIR1-BSD as seqüências correspondentes ao sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição *Bgl*/II foram adicionadas às seqüências dos iniciadores (Tabela 4, sublinhadas). É importante salientar que na reação de PCR foi utilizada a Taq DNA polimerase de alta fidelidade (INVITROGEN). Após a obtenção do produto de PCR devidamente purificado foi realizada a reação TA-tailing ao produto de PCR. Para 10 µl de reação, foram usados: 1 µl tampão da enzima Taq 10X, 1 µl MgCl₂ 15mM, 1 µl dATP 2 mM, 6 µl de produto de PCR e 1 µl Taq polymerase (5 U/µl). A reação foi incubada a 70°C por 30 min. Após estas etapas, foi realizada a clonagem do gene no vetor pGEM[®]-T easy, conforme anteriormente descrito (item 4.9), seguida da purificação do DNA plasmidial utilizando kit Miniprep (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. Posteriormente foi feita uma Midiprep (QIAGEN) para obtenção de uma maior quantidade de DNA, de acordo com instruções do fabricante.

Para a subclonagem, o vetor de expressão utilizado foi o pIR1-BSD, gentilmente cedido pelo Dr Stephen Beverley (Washington University in St. Louis- E.U.A.) que apresenta sítios de restrição para a enzima *Bgl*/II (Fig. 11). A construção acima citada e o

plasmídeo pIR1-BSD (10 µg) foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl*II a 37 °C durante 12h. Após a digestão, as extremidades do vetor pIR1-BSD foram desfosforiladas com a enzima Fosfatase Alcalina Calf Intestinal –CIAP (PROMEGA) a 37 °C por 1h. Posteriormente foi feita a ligação da sequência do gene TxP (obtido da digestão da construção pGEM-TxP) no plasmídeo pIR1BSD. Para tal, foi utilizado o Kit de ligação rápida de DNA (Roche) conforme instruções do fabricante. Para confirmar a presença do gene no vetor, a construção pIR1BSD- TxP foi digerida com *Bgl*II. Para confirmar a direção correta do gene no vetor, a construção foi submetida à digestão com a endonuclease de restrição *Bam*HI. Adicionalmente, foi feita uma Midiprep (QIAGEN) para obtenção de uma maior quantidade de DNA, de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, 30 µg da construção pIR1BSD-T vetor pGEM®-T easy/ Promega foram digeridos com a enzima *Swa*I por 12h a 37°C. Em seguida, o fragmento desta digestão foi purificado a partir do gel de agarose, dosado e usado para transfecção em *Leishmania*. O vetor pIR1BSD não clonado também foi digerido com *Swa*I, para ser utilizado como controle da transfecção.

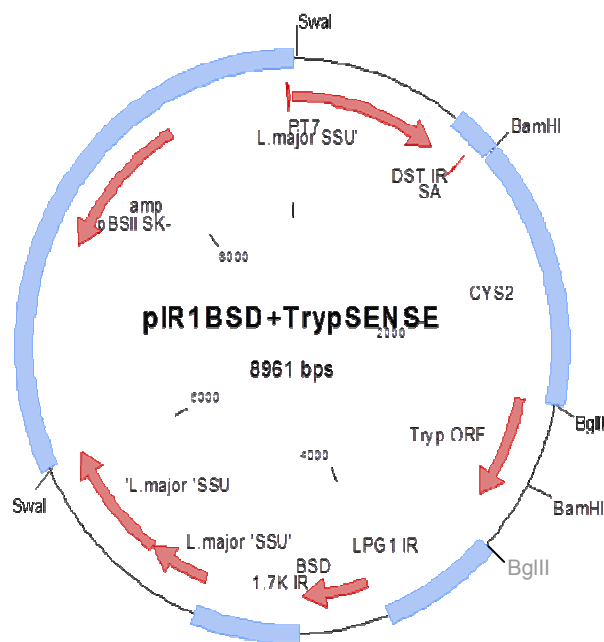


Figura 11: Vetor pIR1-BSD Fonte: Dr Stephen Beverley.

4.18 Transfecção estável em *Leishmania* spp.

Formas promastigotas das populações de *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi* e *L. guyanensis* sensíveis e resistentes ao SbIII na fase exponencial de crescimento (10^8 parasitos) foram transfectadas com a construção pIR1BSD-TxP e também com o vetor

original (pIR1-BSD) sem inserto, como controle da interferência do vetor na transfecção. Outro controle da transfecção as células eletroporadas sem vetor (MOCK). A eletroporação foi realizada no equipamento GenePulser XCell (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1500 V, 25 μ F, durante 10 segundos por 2 vezes. Após a eletroporação, as células foram incubadas por 16 a 24 h com 10 ml de meio M199 sem droga. Em seguida, os parasitos foram centrifugados e plaqueados em meio semi-sólido contendo blasticidina (10 μ g/ml). Após um período de 15 dias as colônias individuais foram incubadas em 1 ml de meio M199 sem droga em placa de 24 poços. Após 3-4 dias, 1 ml desta cultura de parasitos foi transferido para 10 ml de meio M199 com BSD (10 μ g/ml). Os clones foram mantidos em meio seletivo por cerca de 3-4 dias e posteriormente foram submetidas à confirmação da superexpressão do gene triparedoxina peroxidase.

4.19 Confirmação do experimento de transfecção

Para confirmar a eficiência da transfecção foi realizada a extração do DNA genômico de 1 ml de cultura dos clones, conforme descrito no item 4.2. Posteriormente foi realizada PCR, conforme descrito no item 4.3, utilizando iniciadores específicos para o gene BSD que confere resistência à blasticidina.

A análise por *Western blot* foi realizada para avaliar o nível de expressão da proteína TxP nos parasitos transfectados. Para esta análise foram utilizados 1×10^7 parasitos, que após lavagem com PBS, o sedimento foi ressuspendido em 300 μ l de tampão de amostra proteína 1X (0,5M Tris- HCl; 0,4% SDS, pH 6.8; glicerol, azul de bromofenol, 2 beta- mercaptoetanol e H₂O Mili-Q). Em seguida, as amostras foram fervidas a 95°C por 5 min e 25 μ l de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Todas as amostras de *Leishmania* foram criopreservadas, em solução de congelamento (soro fetal bovino- 20%, Meio M199 1X e DMSO 10%) a -70°C.

4.20 Teste de suscetibilidade dos parasitos ao antimonial trivalente

Os parasitos transfectados de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* sensíveis e resistentes, bem como os parasitos não transfectados e transfectados com o vetor sem inserto, foram submetidos à análise de susceptibilidade ao SbIII. Resumidamente,

formas promastigotas (2×10^6 parasitos/ml) de *Leishmania* ssp. foram mantidas em meio M199 contendo várias concentrações de SbIII (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 mg/ml) durante 2 dias. A concentração da droga que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC_{50}) foi determinada contando o número de parasitos crescidos na ausência e presença da droga.

4.21 Análises densitométricas

As imagens dos ensaios de *Northern blot*, *Southern blot* e *Western blot* foram capturadas pelo aparelho ImageQuant LAS 4000 e as análises densitométricas da intensidade das bandas de cTxP visualizadas nestes ensaios foram realizadas através do programa Cpatlas sendo que foi considerado como significativo os valores de densidade ótica das bandas superiores ou iguais a 2,0.

4.22 Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente usando Teste t- Student e valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.1 Gene triparedoxina peroxidase

A sequência completa do gene Triparedoxina peroxidase (LbrM.15.1080) de *L. braziliensis* (LbTxP) utilizada neste estudo foi obtida através do banco de sequências do NCBI (National Center for Biotechnology Information dos Estados Unidos) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). A busca por similaridade de sequência foi obtida através dos alinhamentos produzidos pelo algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A sequência nucleotídica apresentou uma identidade de 87%, 89% e 97% com a sequência de TxP de *L. amazonensis*, *L. infantum chagasi* e *L. guyanensis*, respectivamente (Anexo I). Já a sequência de aminoácidos, utilizando a ferramenta EMBOSS, apresentou identidades de 83.9%, 80.4% e 92.5%, para estas mesmas espécies de *Leishmania* acima citadas, respectivamente (Anexo II).

5.2 Nível de mRNA do gene TxP

O nível de expressão do gene TxP nas populações sensíveis e resistentes das espécies de *Leishmania* foi investigado através de análises por *Northern blot* e RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Para o ensaio de *Northern blot*, o RNA total foi separado em gel de agarose, transferido para membrana de náilon e hibridizado com a sonda de 592 pb específica do gene TxP marcada com ^{32}P (Fig. 12A). A sonda reconheceu um transcrito de aproximadamente 0.5 Kb em todas as populações de *Leishmania* spp. analisadas. Em geral, observamos que o perfil de hibridização deste gene nas populações resistentes de *Leishmania* foi mais bem definido quando comparado às populações sensíveis. Análises de densitometria dos transcritos comparados às bandas da membrana de náilon hibridizada com sonda específica para o gene rRNA marcada com ^{32}P utilizada como normalizador (Fig. 12B) mostraram um aumento da expressão do gene TxP de 8, 2 e 3 vezes nas populações resistentes de *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, comparando com seus respectivos pares sensíveis. Observamos também que a intensidade de hibridização do transcrito em ambas as populações sensíveis e resistentes de *L. infantum chagasi* foi muito fraco, provavelmente devido à baixa expressão deste gene nesta espécie ou à variabilidade da sequência nucleotídica do gene LbTxP usado como sonda.

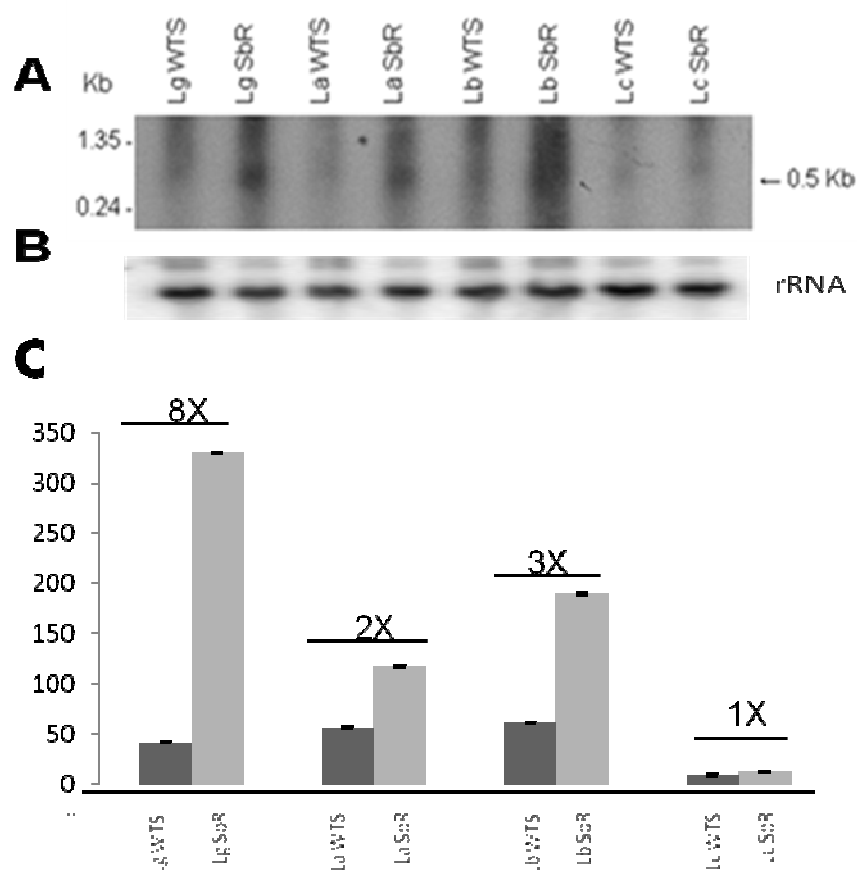


Figura 12: Níveis de mRNA do gene TxP em populações de *Leishmania* spp. sensíveis (WTS) e resistentes (SbR) ao SbIII. A) Perfil do *Northern blot* das amostras hibridizadas com sonda específica para o gene TxP marcada com ^{32}P . B) Membrana de náilon hibridizada com sonda específica para o gene rRNA marcada com ^{32}P , utilizada como normalizador. C) Gráfico de densitometria mostrando a intensidade das bandas dos transcritos do gene TxP nas populações de *Leishmania* spp.

Conforme mencionado anteriormente, o nível de expressão do gene TxP nas populações sensíveis e resistentes das espécies de *Leishmania* foi quantificado usando análise de RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para validação dos resultados, foram realizados ensaios utilizando triplicatas técnicas e biológicas. O par de iniciadores, específico para este gene, foi obtido através do Programa Primer Express® (Applied Biosystems) que amplifica um fragmento de 136 pb, tamanho apropriado para este ensaio. Para detecção das amplificações, foi usado o fluoróforo “SYBR Green” que intercala nas moléculas de DNA fita dupla. As amostras foram submetidas à quantificação absoluta. Para tal, foi construída uma curva-padrão utilizando diluições do plasmídeo ao décimo (10^7 a 10^2 moléculas) contendo o gene de interesse e o gene

normalizador clonados. Para normalização da reação foi utilizado o gene constitutivo SSU, da subunidade menor do RNA ribossomal. O gene constitutivo, usado como normalizador, tem um nível de expressão estável entre as amostras, sendo de extrema utilidade para obtenção de dados quantitativos robustos e confiáveis. Nas figuras 13A e 13C, observamos uma linearidade significativa da curva-padrão, apresentando uma correlação de 0,99 para SSU rRNA e 0,98 para TxP entre o ciclo de amplificação e a quantidade de moléculas de plasmídeos recombinantes. Foi observado ainda um valor de “slope” significativo, de -3,3 e -3,1 para SSU rRNA e TxP, respectivamente. Este valor indica que a amplificação foi eficiente.

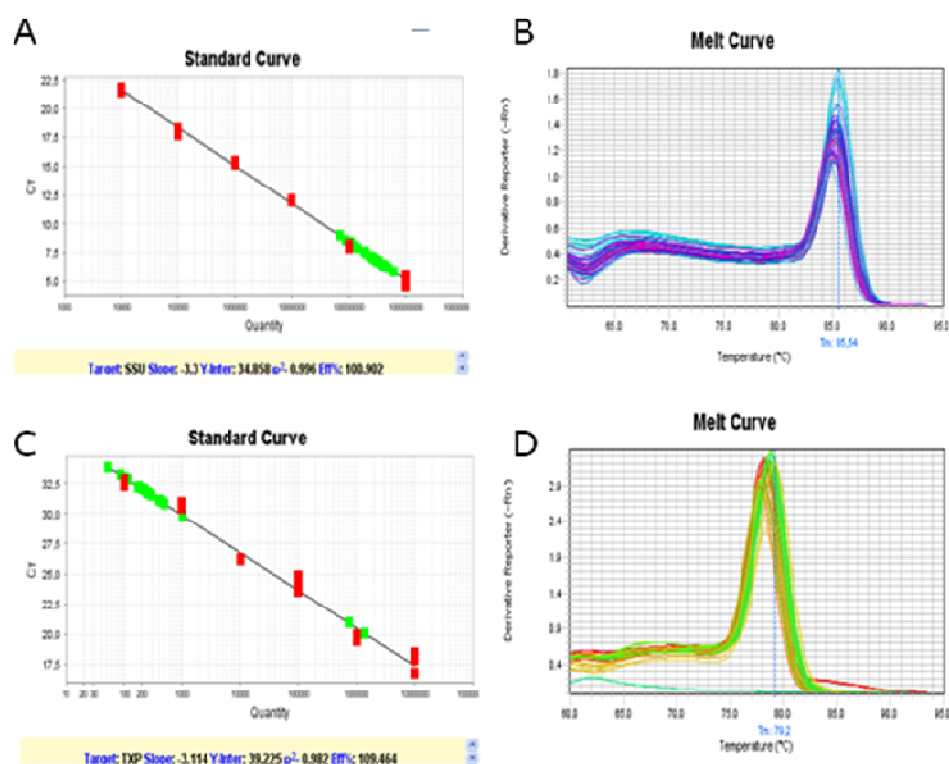


Figura 13: Quantificação do nível de mRNA do gene TxP em populações de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao SbIII por RT-qPCR. A e C) Curvas-padrão dos genes TxP e SSU rRNA (gene normalizador da reação), compreendendo de 10^7 a 10^2 moléculas de plasmídeos recombinantes contendo o gene de interesse e o constitutivo. B e D) Curvas de dissociação dos genes TxP e SSU rRNA.

Uma limitação do sistema de quantificação usando o fluoróforo “SYBR Green” é a detecção de produtos inespecíficos e dímeros de iniciadores. Para comprovar a especificidade da PCR analisamos também a curva de dissociação das amostras de cada gene analisado. Nas figuras 13B e 13D estão representadas as curvas de

dissociação dos genes SSU rRNA e TxP, respectivamente. Em ambas as curvas, observamos uma amplificação única (ausência de amplificação de dímeros de iniciadores e outros produtos inespecíficos), mostrando a especificidade da reação.

A quantidade de moléculas de cDNA do gene TxP para as espécies de *Leishmania* utilizadas neste estudo foi determinada por interpolação dos valores na curva padrão. Foram usados os valores de C_T obtidos pela curva-padrão gerada com as quantidades conhecidas do plasmídeo do TxP, normalizado com os valores de SSU. Os resultados mostraram um aumento de aproximadamente 2 e 4 vezes no nível de mRNA do gene TxP nas populações resistentes de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, respectivamente comparado com seus respectivos pares sensíveis (Figura 14A e 14B). Por outro lado, os resultados de expressão deste gene nas espécies de *L. guyanensis* e *L. infantum chagasi* não foram conclusivos apresentando resultados muito discrepantes (dados não mostrados).

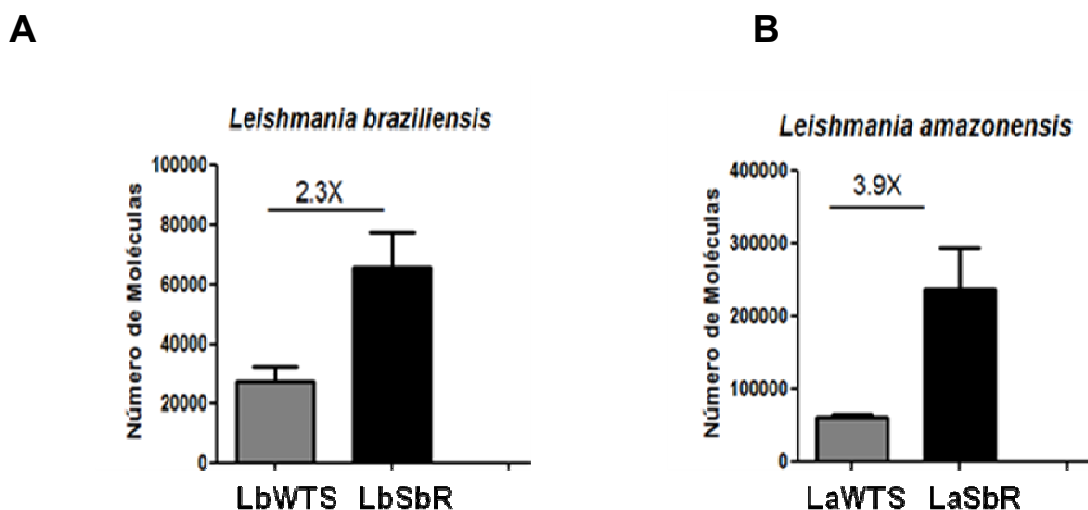


Figura 14: Nível de expressão do gene TxP nas populações sensíveis e resistentes ao SbIII de (A) *L. braziliensis* e (B) *L. amazonensis* através de ensaios de PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR).

5.3 Organização genômica do gene TxP

Para verificar a organização genômica, bem como a presença de amplificação do gene TxP nas populações de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao SbIII, o DNA genômico destas amostras foi digerido com a endonuclease de restrição *EcoRI*, que não apresenta sítio de restrição na região codificante do gene TxP de *L. braziliensis* (Fig. 15A) e com *BamHI*, que possui um sítio de restrição nesta região do gene (Fig. 15B). Para análise comparativa e normalização do ensaio foi utilizada membrana de náilon

hibridizada com sonda específica para o gene rRNA marcada com $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Fig. 15C e D), respectivamente.

O perfil apresentado pela digestão com *EcoRI* mostrou que a sonda do gene TxP reconheceu um fragmento de 14 Kb em todas as amostras de *Leishmania* spp. analisadas (Fig. 15A). Entretanto, foi observado um polimorfismo deste gene na espécie *L. infantum chagasi*, uma vez que fragmentos de 4.0, 0.8 e 0.6 Kb também foram detectados em ambas as populações sensíveis e resistentes Lc WTS e Lc SbR. É interessante ressaltar também que o perfil de hibridização entre as populações sensível (La WTS) e resistente (La SbR) de *L. amazonensis* foi diferente. A população resistente La SbR apresentou fragmentos de 4.0, 0.8 e 0.6 Kb, além do fragmento principal de 14 Kb, similar à espécie *L. infantum chagasi*.

A sonda TxP hibridizada com o DNA genômico digerido com *BamHI* reconheceu um fragmento de 12 Kb em todas as amostras de *Leishmania* spp. analisadas (Fig. 15B). Similar ao resultado apresentado com a *EcoRI*, também foi observado um polimorfismo deste gene nas populações sensíveis e resistentes (LcWTS e Lc SbR) de *L. infantum chagasi* e na população resistente de *L. amazonensis* (La SbR) apresentando fragmentos de 0.5 e 0.6 Kb, além do fragmento principal.

Apesar da análise *in silico* ter indicado a presença de sítio de restrição de *BamHI* na sequência do gene TxP de *L. braziliensis*, o perfil de hibridização desta espécie mostrou a presença de apenas um fragmento. Por outro lado, o perfil de ambas as enzimas para a espécie *L. infantum chagasi* e a população resistente de *L. amazonensis* sugere que este gene apresenta polimorfismo de sequência nucleotídica ou um maior número de cópias. Este resultado deverá ser mais bem investigado utilizando outras enzimas de restrição e análise de sequência *in silico* detalhada.

Através de análise por densitometria, foi verificado que não houve diferença na intensidade das bandas específicas, independente do fenótipo de resistência, sugerindo que este gene não está amplificado no genoma das diferentes espécies de *Leishmania* analisadas.

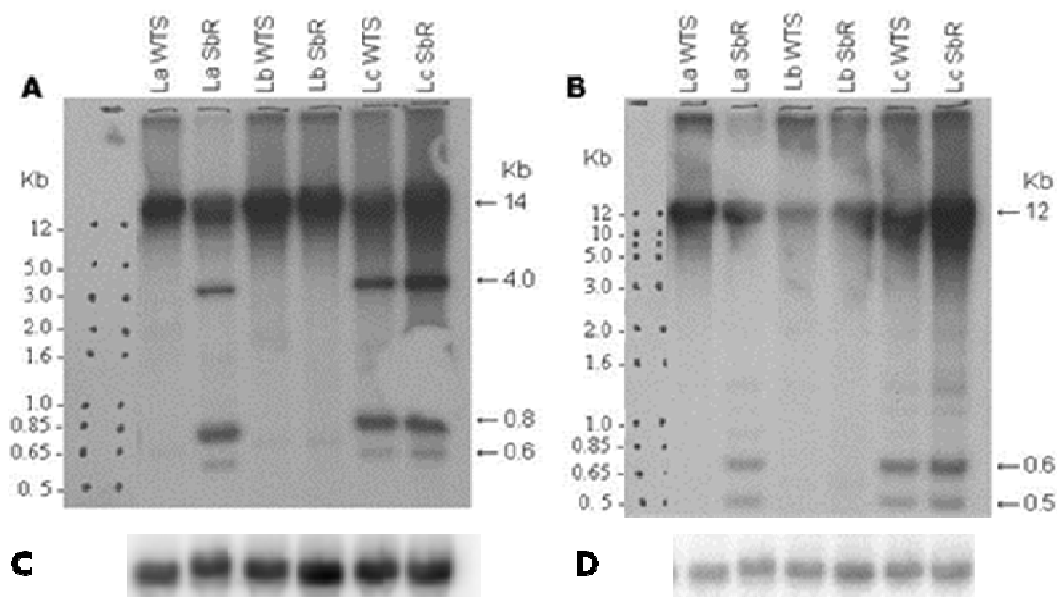


Figura 15: Análise de *Southern blot* do gene TxP nas populações de *Leishmania* spp sensíveis e resistentes ao SbIII. O DNA genômico foi digerido com as endonucleases de restrição *Eco*RI (A) e *Bam*HI (B), e corado com brometo de etídeo. C e D) Membrana de náilon hibridizada com sonda específica para o gene rRNA marcada com $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, usada como normalizador.

5.4 Nível de expressão da proteína TxP

Com o objetivo de avaliar o nível de expressão proteica da triparedoxina peroxidase nas populações de *Leishmania* spp sensíveis e resistentes ao SbIII, foi realizado um ensaio de *Western blotting* utilizando anticorpo policlonal anti-TxP de *T. cruzi*.

Inicialmente foi realizado um estudo de similaridade entre a sequência de aminoácidos de TxP de *T. cruzi* (número de acesso AF320771) e as sequências da TxP das espécies *L. infantum chagasi* (A); *L. braziliensis* (B); *L. guyanensis* (C) e *L. amazonensis* (D). Os alinhamentos das sequências de TxP de *T. cruzi* e das espécies de *Leishmania* em estudo depositadas no GeneDB mostraram consideráveis graus de identidades e similaridades (Fig. 16).

TxP de *T. cruzi* X TxP de *L. infantum chagasi*

A

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: AF312397_1
# 2: AF320771_1
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 196
# Identity:   138/196 (70.4%)
# Similarity: 165/196 (84.2%)
# Gaps:     1/196 ( 0.5%)
# Score: 762.0

AF312397_1      1  MSCGDAKINCPAPPFEEVALMPNGSFKKISLAAYKGKVVVLFYPLDFTF      50
      |||||:|.|||.|.|.|||||:||||:|:|||||:|||||:|
AF320771_1      1  MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALSSYKGKWLVLFFYPMDFTF      50

AF312397_1     51  VCPTEIIAFSENVSRFNELNCEVLACSMDSYAHLQWTLQDRKKGGLGAM     100
      |||||.|||.|||.|||.|||||:|||||:|.|||.|||.||
AF320771_1     51  VCPTEICQFSDRVKEFSDIGCEVLACSMDSYSHLAWTSVEAKRGGLGQM     100

AF312397_1    101  AIPMLADKTKSIARAYGVLAEKQGVAYRGLFIIDPNGMVRQITVNDMPVG     150
      .||:|||||.|.||:|||||.||.|||||:|||||:|
AF320771_1    101  NIPILADKTKCIMKSYGVLEEDGVAYRGLFIIDPKQNLRQITVNDLPVG     150

AF312397_1    151  RNVEEVLRLLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGAPTMPKPEKASVEGYF      196
      |:|:|.|||:|:|||||:|||||:|.|||.|||:|.||
AF320771_1    151  RDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKP GDKAMKPDPEKSKE-YF      195
```

TxP de *T. cruzi* X TxP de *L. braziliensis*

B

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: CAM42127.1
# 2: AF320771_1
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 196
# Identity:   141/196 (71.9%)
# Similarity: 167/196 (85.2%)
# Gaps:     1/196 ( 0.5%)
# Score: 779.0

CAM42127.1      1  MSCGDAKMNEPAPPFEEMALMPNGSFKKINLAS YKGKVVVLFYPLDFTF      50
      |||||:|.|||.|.|.|||||:||||:|:|||||:|||||:|
AF320771_1      1  MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALSSYKGKWLVLFFYPMDFTF      50

CAM42127.1     51  VCPTEIIQFSDSIKRFNELDCEVMSCSVDSYAHLQWTLQERKKGGLGPM     100
      |||||.|||.|||.|||.|||||:|||||:|.|||.|||.||
AF320771_1     51  VCPTEICQFSDRVKEFSDIGCEVLACSMDSYSHLAWTSVEAKRGGLGQM     100

CAM42127.1    101  EIPMLADKTKICRAYGVLEKKG VAYRGLFIIDPKGILRQIIVNDMPVG     150
      .||:|||||.|.||:|||||.||.|||||:|||||:|
AF320771_1    101  NIPILADKTKCIMKSYGVLEEDGVAYRGLFIIDPKQNLRQITVNDLPVG     150

CAM42127.1    151  RNVEEALRLLEALQFVEKHGEVCPANWKKGDATMPKPERQASIEGYF      196
      |:|:|.|||:|:|||||:|||||:|.|||.|||:|.||
AF320771_1    151  RDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKP GDKAMKPDPEKSKE-YF      195
```

TxP de *T. cruzi* X TxP de *L. guyanensis*

C

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: AAV31765.1
# 2: AF320771_1
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 196
# Identity: 142/196 (72.4%)
# Similarity: 169/196 (86.2%)
# Gaps: 1/196 (0.5%)
# Score: 792.0

AAV31765.1      1  MSCGNAKQNEPAPAFEETALMPNGAFKKISLASYGKQWVLFYPLDFTF      50
               |||:|:|:|.|||.|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1      1  MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALSSYGKQWLVLFYPMDFTF      50

AAV31765.1     51  VCPTEIIQFSENIKRFSELDCEVIACSVDSYAHLQWTLQERKKGGLGPM     100
               |||:|:|:|.|||.|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1     51  VCPTEICQFSDRVKEFSDIGCEVLACSMDSEYSHLAWTSVEAKRGGLGQM     100

AAV31765.1    101  EIPMLADKTKCICRAYGVLDEKQGVAYRGLFIIDPKGILRQITINDMPVG     150
               .||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1    101  NIPILADKTKCIMKSYGVLKEEDGVAYRGLFIIDPKQNLQITVNDLPVG      150

AAV31765.1    151  RNVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGDATMKPERQASIEGYF      196
               |:|:|.|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1    151  RDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKKPGDKAMKPDPEKSKE-YF      195
```

TxP de *T. cruzi* X TxP de *L. amazonensis*

D

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: AAV31765.1
# 2: AF320771_1
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 196
# Identity: 142/196 (72.4%)
# Similarity: 169/196 (86.2%)
# Gaps: 1/196 (0.5%)
# Score: 792.0

AAV31765.1      1  MSCGNAKQNEPAPAFEETALMPNGAFKKI SLASYGKQWVLFYPLDFTF      50
               |||:|:|:|.|||.|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1      1  MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALSSYGKQWLVLFYPMDFTF      50

AAV31765.1     51  VCPTEIIQFSENIKRFSELDCEVIACSVDSYAHLQWTLQERKKGGLGPM     100
               |||:|:|:|.|||.|||:|:~|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1     51  VCPTEICQFSDRVKEFSDIGCEVLACSMDSEYSHLAWTSVEAKRGGLGQM     100

AAV31765.1    101  EIPMLADKTKCICRAYGVLDEKQGVAYRGLFIIDPKGILRQITINDMPVG     150
               .||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1    101  NIPILADKTKCIMKSYGVLKEEDGVAYRGLFIIDPKQNLQITVNDLPVG      150

AAV31765.1    151  RNVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGDATMKPERQASIEGYF      196
               |:|:|.|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
AF320771_1    151  RDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKKPGDKAMKPDPEKSKE-YF      195
```

Figura 16: A a D) Alinhamento das sequências de aminoácidos da TxP de *T. cruzi* em relação às espécies *L. infantum chagasi* (A), *L. braziliensis* (B); *L. guyanensis* (C) e *L. amazonensis* (D).

Os valores de identidade da sequência TxP de *T. cruzi* em relação às espécies *L. infantum chagasi*, *L. braziliensis*; *L. guyanensis* e *L. amazonensis* foram 70.4%, 71.9%, 72,4 e 83,2% respectivamente. Devido aos valores de conservação das sequências, provavelmente este anticorpo de *T. cruzi* deveria reconhecer a TxP destas espécies de *Leishmania*, sendo portanto utilizado em nossos ensaios.

Na primeira etapa do *Western blotting*, extratos de proteínas totais das formas promastigotas das populações sensíveis e resistentes das 4 espécies de *Leishmania* foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE. O perfil eletroforético demonstrou a presença de proteínas com massa molecular variando de 250 a 25 kDa. As proteínas totais foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose e esta incubada com o anticorpo policlonal anti-TcTxP de *T. cruzi* (gentilmente cedido pela Dra Fernanda Nogueira) na diluição de 1:500. Os resultados mostraram que este anticorpo reconheceu um polipeptídeo de 25 kDa (Fig. 17A) em todas as amostras de *Leishmania* analisadas.

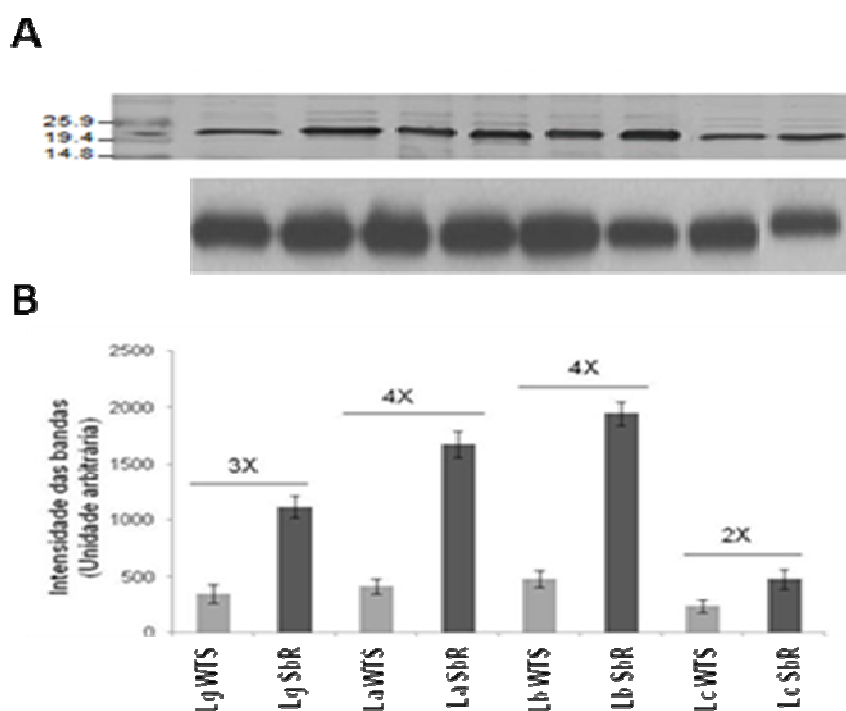


Figura 17: Análise da expressão do gene TxP por *Western blotting* em populações sensíveis e resistentes ao SbIII das quatro espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. A) Análise por *Western blotting* do perfil apresentado pela TxP, usando anticorpo policlonal anti-TxP de *T. cruzi* e perfil eletroforético da proteína α -tubulina usada como normalizador do ensaio. B) Análise densitométrica das bandas obtidas no perfil eletroforético da TxP.

Conforme dados da literatura, este polipeptídeo corresponde ao tamanho esperado para a triparedoxina peroxidase. Análise densitométrica da intensidade dos polipeptídeos comparada com o perfil eletroforético apresentado pela proteína α -tubulina, usado como normalizador deste ensaio, mostrou que esta enzima está 3 e 2 vezes mais expressa nas populações resistentes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, respectivamente e 4 vezes nas populações resistentes das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* comparado com seus respectivos pares sensíveis.

5.5 Superexpressão do gene TxP

Para investigar se a superexpressão do gene TxP favorece o fenótipo de resistência, foi realizada a análise funcional deste gene em amostras de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* sensíveis e resistentes ao antimonial trivalente. Para tal, o gene TxP foi transfectado nestas amostras para obter parasitos expressando altos níveis da enzima triparedoxina peroxidase. Posteriormente, estes parasitos foram submetidos ao teste de susceptibilidade ao SbIII para investigar uma possível alteração no fenótipo de resistência a este composto.

Inicialmente, a sequência completa do gene TxP de *L. braziliensis* foi clonada no vetor pGEM[®]-T easy (Promega). Após confirmação da clonagem por PCR, seis colônias foram submetidas ao sequenciamento para confirmar a sequência correta do gene. A figura 18A mostra o alinhamento da sequência completa de nucleotídeos do gene TxP, contendo o gene TxP de *L. braziliensis* clonada no vetor pGEM[®]-T easy comparado com a sequência (LbrM.15.1080) do banco de dados.

Observamos uma completa identidade entre estas duas sequências e ausência de mutação, indicando que ela poderia ser utilizada em nossos ensaios. Esta colônia foi então selecionada para subclonagem do gene TxP no vetor pIR1BSD (gentilmente cedido pelo Dr Stephen Beverley - Washington University in St. Louis- E.U.A.) (Fig. 19A). Ambos os plasmídeos pGEM-TXP e pIR1BSD foram digeridos com a enzima de restrição BglII. Posteriormente, o fragmento do gene TxP foi clonado no vetor pIR1BSD, produzindo a construção pIR1BSD-TxP. A direção senso e antisenso do gene no plasmídeo foi investigada utilizando digestão com a endonuclease de restrição *Bam*HI. Conforme mostrado na figura 19B, o plasmídeo contendo o gene na direção senso após a digestão com *Bam*HI libera fragmentos de 1772 e 7189 pb. Por outro lado, o plasmídeo na direção “antisenso” gera fragmentos de 1543 e 7418 pb. A colônia contendo o gene na direção correta “senso” foi submetida à extração de plasmídeo (Midi-prep).

Posteriormente, o plasmídeo foi digerido com a enzima *SwaI* para ser linearizado, permitindo, durante a transfecção, a correta integração desta sequência no gene do RNA ribossomal do parasito.

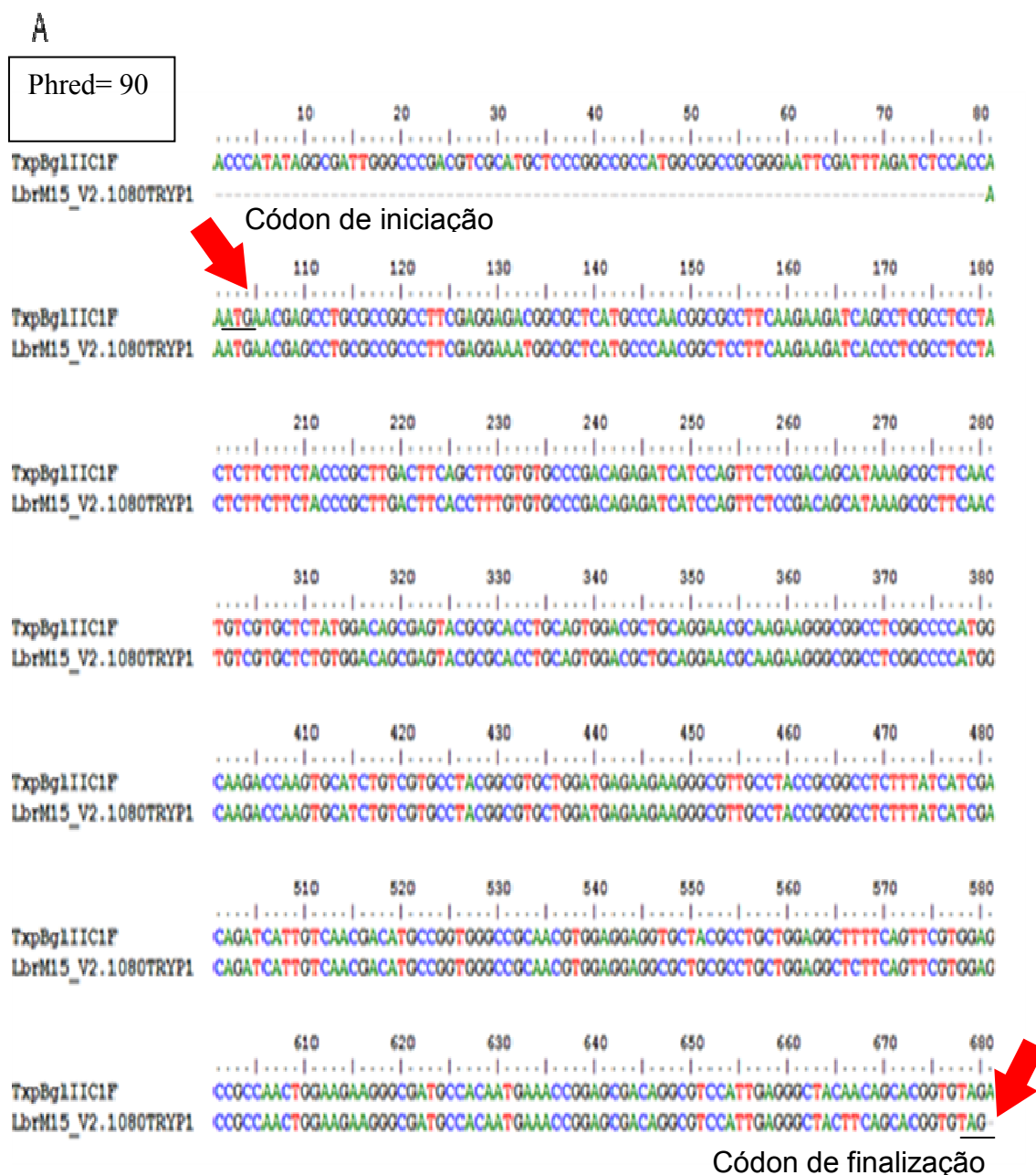


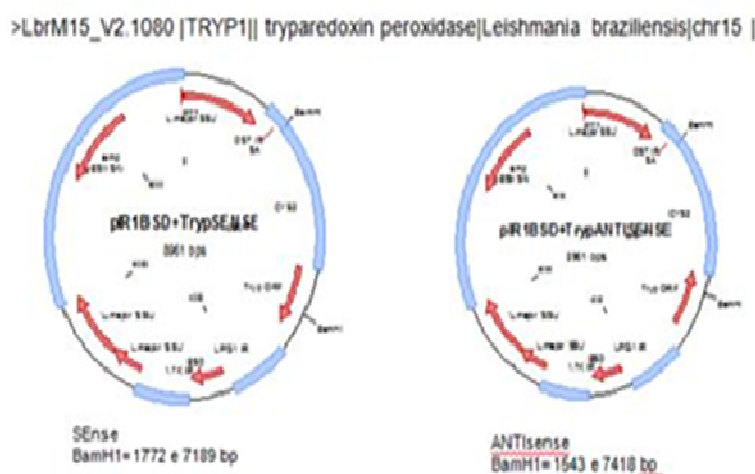
Figura 18: Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene Triparedoxina peroxidase de *L. braziliensis* (LbTxP) do banco de dados (LbrM.15.1080) comparado com a sequência do plasmídeo pIR1BSD-TxP da colônia contendo o gene TxP de *L. braziliensis*.

Após um período de aproximadamente 15 dias, observamos a presença de colônias na placa indicando eficiência da transfecção. Em seguida, 12 colônias individuais de cada amostra foram incubadas em 1 ml de meio M199 líquido em placas

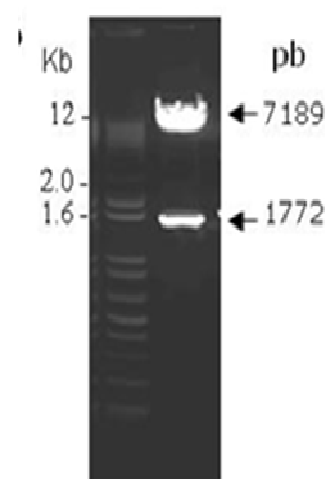
de 24 poços. Após 3-4 dias, os parasitos (1 ml de cultura) foram transferidos para 10 ml de meio M199 contendo 10ug/ml de blasticidina (BSD). Os clones resistentes ao BSD foram selecionados para ensaios de PCR e *Western blotting*.

Formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. infantum chagasi* e *L. guyanensis* em fase exponencial de crescimento foram transfectadas com a construção pIR1BSD-LbrTxP, com o vetor vazio (controle da interferência do vetor no parasito) e parasitos transfectados com PBS (como controle da eletroporação). Após a transfecção, as células foram incubadas por 24h em meio M199 sem droga. Em seguida os parasitos foram centrifugados e plaqueados em meio semi-sólido contendo 10 ug/ml de blasticidina.

A



B



Fig

direção da clonagem do gene TxP no vetor de transfecção pIR1BSD. B) Visualização do resultado da digestão da construção pIR1BSD-TxP em gel de agarose 1%, confirmando a clonagem com sentido senso nesta colônia.

Para confirmar a eficiência da transfecção foi realizada a extração do DNA genômico dos clones resistentes ao BSD. Em seguida as amostras de DNA foram submetidas à PCR utilizando iniciadores específicos para o gene BSD que confere resistência à blasticidina. Conforme mostrado na Figura 20 A, B e C observamos a amplificação de um fragmento de 399 pb, correspondente ao gene BSD nas amostras de *Leishmania* transfectadas com o vetor pIR1BSD-TxP, confirmando a eficiência da transfecção. No total, foram analisadas 24 colônias de cada população sensível e resistente de cada espécie de *Leishmania*, totalizando 96 colônias analisadas.

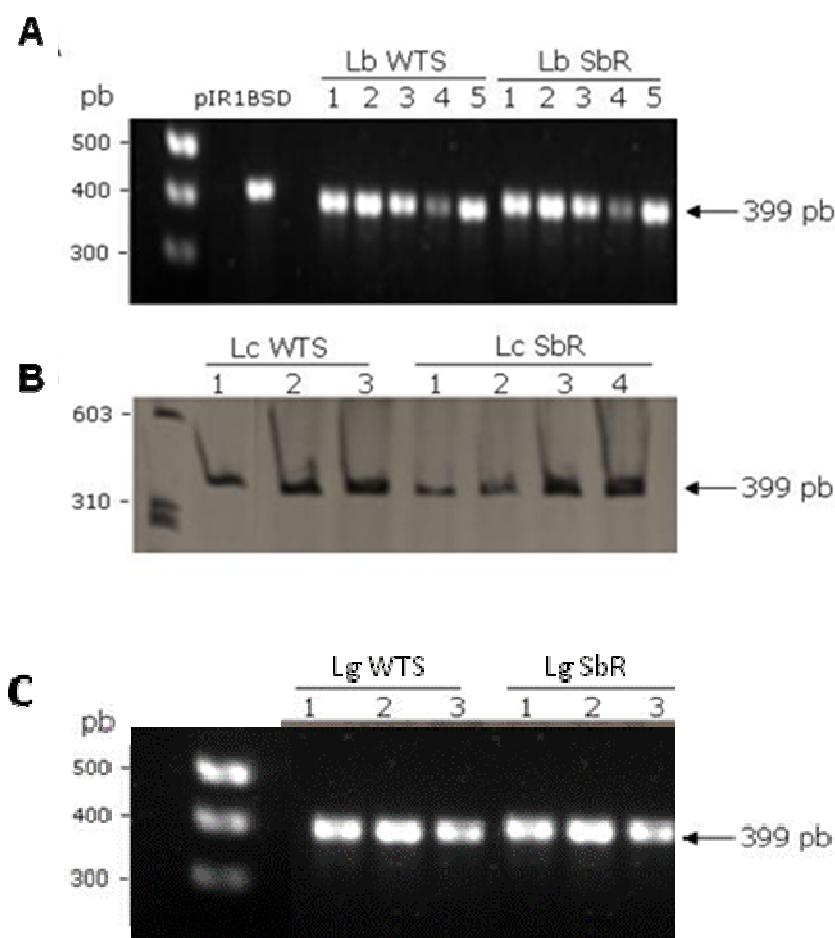


Figura 20: Confirmação por PCR da presença do gene que confere resistência à blasticidina nas linhagens de *Leishmania* spp transfectadas com pIR1-BSDTxP. A) Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os produtos de PCR dos clones de *L. braziliensis*. B) Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata mostrando os produtos de PCR dos clones de *L. infantum chagasi*. C) Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os produtos de PCR dos clones de *L. guyanensis*.

Os clones de *Leishmania* positivos para o gene BSD (PCR positivo) foram submetidos ao *Western blotting* (Fig. 21 A e B) para avaliar o nível de expressão da proteína TxP nestes parasitos transfectados. Nesta análise, 1×10^7 parasitos foram ressuspensos em tampão de amostra, aquecidos a 95°C por 5min e submetidos à eletroforese SDS-PAGE 12%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal anti-TcTxP.

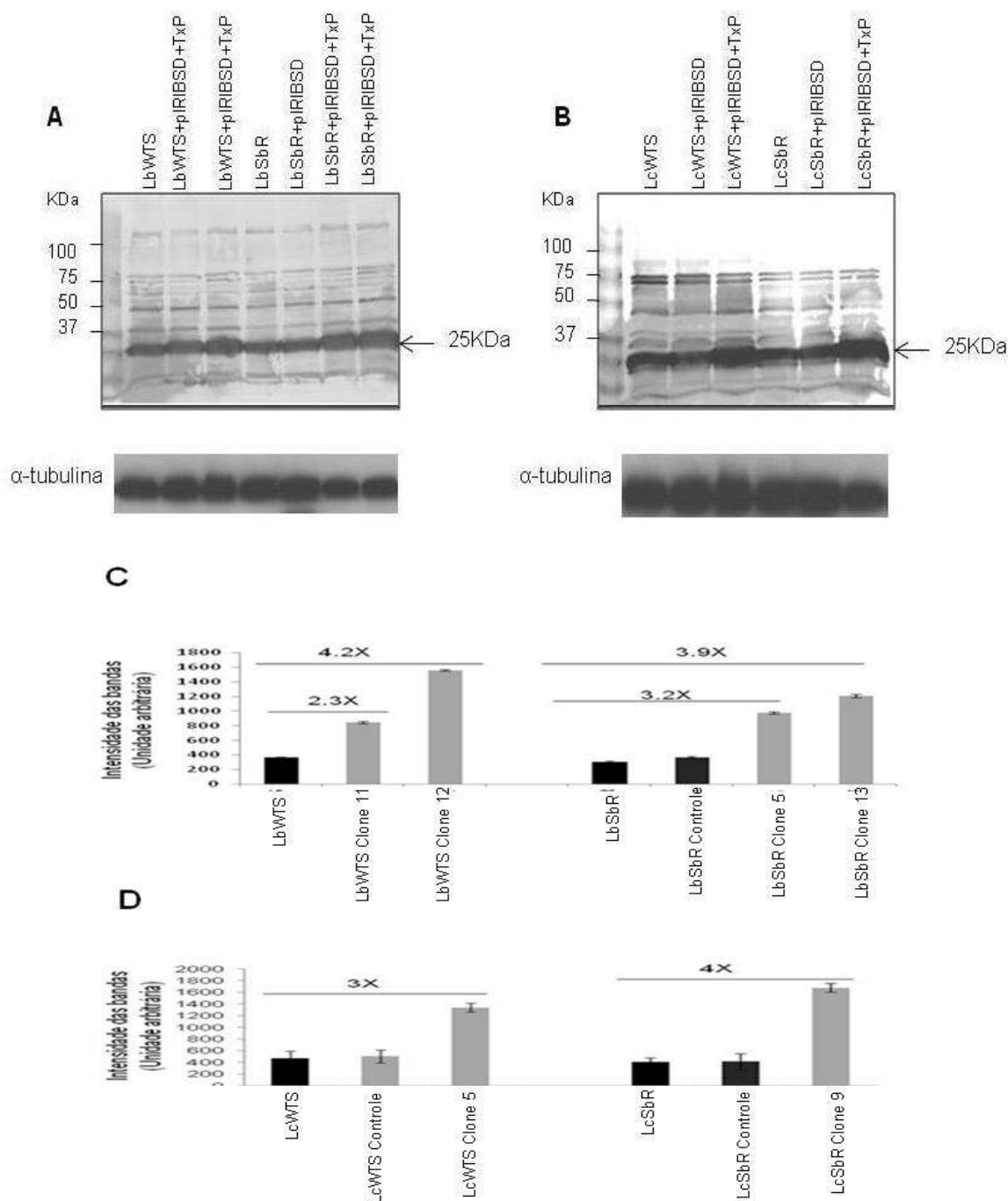


Figura 21: Análise por Western blotting de populações de *L. braziliensis* (A) e *L. infantum chagasi* (B) transfectadas com o gene TxP. Abaixo o padrão eletroforético apresentado pelo normalizador α -tubulina. C e D) Gráfico de densitometria das bandas correspondentes à proteína TxP em populações de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*, respectivamente.

Os resultados, normalizados pelo perfil proteico apresentado pela α -tubulina, mostraram que ambos parasitos sensíveis e resistentes das espécies *L. braziliensis* e *L.*

infantum chagasi transfectados com o gene TxP mostraram um aumento de 2 a 4 vezes no nível da proteína TxP quando comparado com seus respectivos pares não transfectados ou transfectados com o vetor vazio (Fig. 21 C e D). Os resultados do nível de expressão da TxP para *L. guyanensis* não foram conclusivos, necessitando posterior investigação.

5.6 Teste de susceptibilidade dos parasitos transfectados ao antimonial trivalente

Para confirmar o papel da TxP na resistência ao SbIII, os parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* sensíveis e resistentes ao SbIII, transfectados com o gene TxP, bem como os não-transfectados e transfectados com o vetor vazio, foram submetidos à análise de susceptibilidade ao SbIII. Neste teste, formas promastigotas (2×10^6 parasitos/ml) de *Leishmania* ssp. foram mantidas em meio M199 contendo várias concentrações da droga (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg/ml) durante 2 dias. A concentração da droga que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC_{50}) foi determinada contando o número de parasitos crescidos na ausência e presença de antimônio (SbIII).

Nos gráficos (Figs. 22 e 23), observamos a porcentagem dos parasitos que sobreviveram ao SbIII em relação às diferentes concentrações da droga. Conforme mostrado na Figura 22 A, com o aumento das concentrações de SbIII, observamos um rápido declínio na porcentagem de parasitos vivos da população sensível parental da *L. braziliensis* (LbWTS) comparado com os clones transfectados com TxP analisados (LbWTS clones 11 e 12) que foram mais resistentes. Análise estatística mostrou uma diferença significativa ($p < 0,002$ a $p < 0,04$) nas concentrações 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/ml de SbIII quando comparado parental e clones transfectados de *L. braziliensis* WTS. O IC_{50} da população parental sensível LbWTS para o SbIII foi aproximadamente 0,025 mg/ml, por outro lado o IC_{50} de ambos clones transfectados LbWTS+PIR1-BSD-TxP foi 0,05 mg/ml de SbIII. De acordo com estes dados, podemos concluir que a superexpressão do gene TxP em *L. braziliensis* sensível alterou o fenótipo de sensibilidade ao SbIII, aumentando 2 vezes a resistência desta população ao SbIII, quando comparado à população parental.

Surpreendentemente, a superexpressão de TxP em populações resistentes de *L. braziliensis* LbSbR (Fig. 22B) aumentou a susceptibilidade dos parasitos transfectados com TxP ao SbIII. O aumento das concentrações de SbIII provocou um rápido declínio

na porcentagem de parasitos vivos dos clones transfectados com TxP analisados (LbSbR clones 5 e 13) comparado com população resistente parental de *L. braziliensis* (LbSbR) que foi mais resistente. Neste estudo utilizamos como controle, parasitos da população resistente LbSbR transfectados com o vetor vazio (PIR1-BSD), para verificar possível interferência do vetor neste fenótipo. Conforme esperado, estes parasitos apresentaram o mesmo índice de resistência ao SbIII comparado aquele da população resistente parental de *L. braziliensis* (LbSbR). Análise estatística mostrou uma diferença significativa ($p < 0,002$) em todas as concentrações testadas 0,05 a 1 mg/ml de SbIII quando comparado parental/parental+vetor e clones transfectados de *L. braziliensis* WTS. O IC_{50} da população parental sensível LbSbR para o SbIII foi aproximadamente 1mg/ml, por outro lado o IC_{50} de ambos clones transfectados LbSbR+PIR1-BSD-TxP foi 0,05 mg/ml de SbIII, uma diferença de 20 vezes. Podemos concluir que a superexpressão do gene TxP na população resistente de *L. braziliensis* interferiu no metabolismo deste parasito alterando o fenótipo de susceptibilidade ao SbIII. Esta superexpressão em termos de resistência foi maléfica para os parasitos que já eram resistentes e se tornaram sensíveis.

Este mesmo estudo utilizando populações de *L. infantum chagasi* sensíveis e resistentes ao SbIII, mostrou que a superexpressão da TxP não alterou o fenótipo de resistência dos parasitos transfectados ao SbIII (Figura 23). Várias concentrações de SbIII foram utilizadas e em todas elas a porcentagem dos parasitos vivos da população parental e parental+vetor sensível ou resistente (LcWTS ou LcSbR) foi similar ao dos clones transfectados com TxP. O valor de IC_{50} da população parental sensível LcWTS, parental + vetor e o clone transfectado com TxP para o SbIII foi 0,1 mg/ml. Por outro lado o IC_{50} da população parental resistente LcSbR, parental + vetor e os clones transfectados com TxP para o SbIII foi 1 mg/ml, uma diferença de 10 vezes.

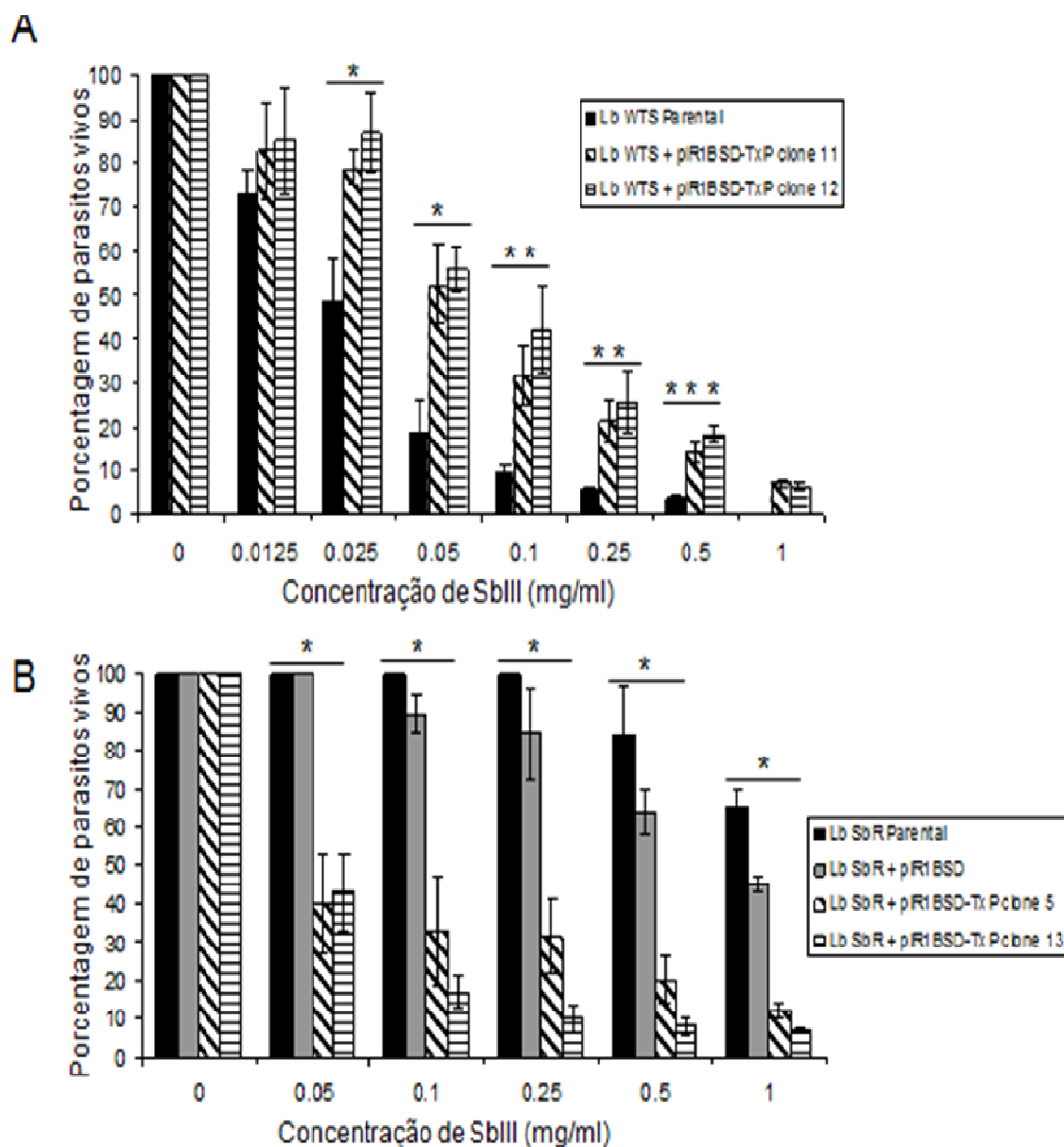


Figura 22: Teste de susceptibilidade *in vitro* de populações de *L. braziliensis* sensíveis LbWTS (A) e resistentes Lb SbR (B) ao SbIII e transfectadas com o vetor pR1-BSD-TxP (triparedoxina peroxidase). Parasitos foram cultivados na presença de concentrações crescentes de SbIII (0.0125 a 1 mg/ml). Após 48h de incubação com o SbIII, a concentração dos parasitos foi determinada usando o contador Coulter. Três experimentos independentes em triplicata foram realizados. Comparação entre a parental/parental+plasmídeo e os clones transfectados mostrou diferença significativa conforme teste *t' student*: * $p < 0.002$; ** $p < 0.007$ e *** $p < 0.04$.

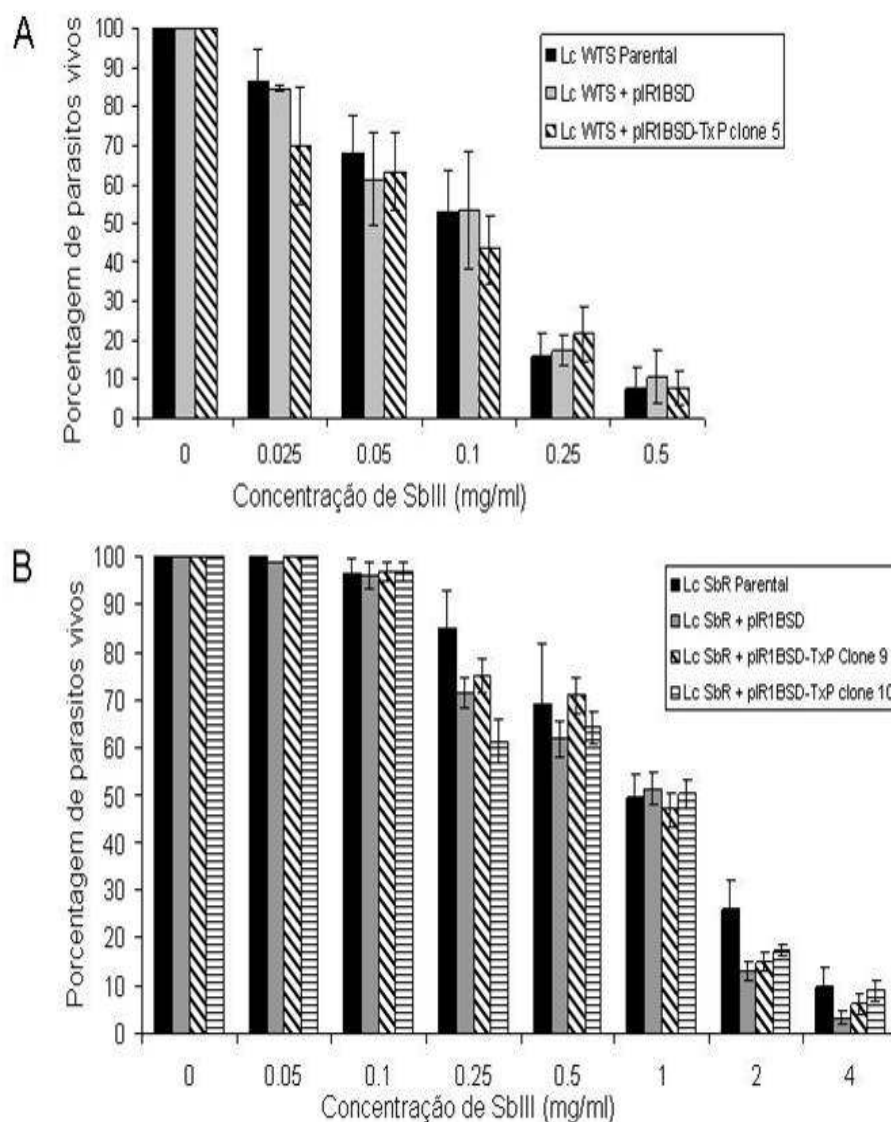


Figura 23: Teste de susceptibilidade *in vitro* de populações de *L. chagasi* sensíveis LcWTS (A) e resistentes Lc SbR (B) ao SbIII e transfectadas com o vetor pIR1-BSD-TxP (triparedoxina peroxidase). Parasitos foram cultivados na presença de concentrações crescentes de SbIII (0.025 a 4 mg/ml). Após 48h de incubação com o SbIII, a concentração dos parasitos foi determinada usando o contador Coulter. Três experimentos independentes em triplicata foram realizados. Comparação entre a parental/parental+plasmideo e os clones transfectados não mostrou diferença significativa.

A utilização dos antimoniais pentavalentes tem sido o pilar da quimioterapia das Leishmanioses por mais de 60 anos. Apesar das limitações apresentadas, como alta toxicidade e ocorrência de parasitos resistentes, este tratamento permanece efetivo e disponível na maioria dos países endêmicos. Para que a efetividade da droga seja mantida, a concentração de uso e o tempo de duração do tratamento têm sido aumentados (Olliaro *et al.*, 1993; Hadighi *et al.*, 2006), sugerindo a ocorrência de mutações com consequente redução da susceptibilidade do parasito à droga. Entretanto, a falha do tratamento se deve também à deficiência do sistema imune do hospedeiro em lidar com o parasito, bem como às propriedades farmacocinéticas da droga e conduta indevida de tratamento (Croft, 2001; Sundar, 2001).

Na década de 90, um estudo acerca da falha terapêutica do antimonial na Índia mostrou que parte da ineficácia do tratamento em pacientes infectados por *L. donovani* devia-se à diminuição da susceptibilidade do parasito ao SbV (Lira *et al.*, 1999). A maioria das Leishmanioses é zoonótica, porém em áreas com Leishmaniose Visceral antroponótica, como ocorre na Índia, a resistência adquirida ao SbV é alarmante. Diante disto, na Índia a droga de primeira escolha para o tratamento das Leishmanioses é a Anfotericina B. Apesar deste relato, o tratamento clínico com SbV ainda se mantém efetivo em diversos outros países (Lira *et al.*, 1999).

Na ausência de uma vacina efetiva, a quimioterapia é a principal forma de controle das Leishmanioses. Diante disso, o monitoramento e a prevenção dos fenômenos de resistência a drogas são agora uma prioridade da Organização Mundial de Saúde (WHO,[s.d.a]). Atualmente, novos tratamentos para a Leishmaniose Visceral têm sido introduzidos e outros estão passando por testes clínicos. Porém, cuidados devem ser tomados para que a resistência a estes medicamentos não se desenvolva e as práticas de alternância, bem como combinações de drogas precisam ser considerados, bem como sistemas para monitorar o uso das drogas, a resposta às drogas e à disseminação de resistência (Croft, 2006).

Diante de dados da literatura sobre a importância da via de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos, bem como das enzimas peroxidases que são essenciais ao processo de detoxificação de peróxidos, neste estudo fizemos a caracterização molecular da enzima TxP em populações de *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* sensíveis e resistentes ao antimonial.

Inicialmente fizemos análises de similaridade de nucleotídeos do gene TxP de *L. braziliensis* comparado com as outras espécies *L. amazonensis*, *L. infantum chagasi* e *L.*

guyanensis utilizando programas do pacote BLAST. Os resultados mostraram consideráveis níveis de identidade entre estas espécies (87% a 97% de identidade). Diante destes dados, os iniciadores utilizados neste estudo foram desenhados em regiões conservadas da sequência deste gene nestas espécies.

Alguns estudos têm mostrado que parasitos resistentes à droga podem superexpressar genes como resultado de sua amplificação no genoma. Entretanto, alguns genes apresentam aumento dos níveis de mRNA e proteína mas eles não estão amplificados no genoma dos parasitos (Guimond *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2006). Como por exemplo, os genes cTxP e mTxP em populações de *T. cruzi* resistentes ao BZ apresentaram aumento no nível de mRNA, mas não apresentaram amplificação do gene no genoma deste parasito (Nogueira *et al.*, 2006). O perfil apresentado pela digestão com *EcoRI* e *BamHI* mostrou que a sonda do gene TxP reconheceu um fragmento de 14 Kb e 12 Kb em todas as amostras de *Leishmania* spp. analisadas, respectivamente. Em ambas as digestões foi observado um polimorfismo deste gene na espécie *L. infantum chagasi*. O perfil apresentado em *L. amazonensis* resistente também indicou polimorfismo em relação ao seu par sensível. Análises de densitometria mostraram que o gene TxP não está amplificado no genoma de *Leishmania* spp.

Foi descrito na literatura que a modulação nos níveis de RNA está associada com a resistência à droga em *Leishmania* (Haimeur *et al.*, 1998; Decuypere *et al.*, 2005). Estas mudanças na expressão do RNA geralmente são estáveis, sendo que estas mudanças ou uma mutação pontual do gene poderia explicar o fenótipo de resistência encontrado nos isolados. Diversos elementos envolvidos na transcrição estágio-específica têm sido identificados na região 3'UTR por regular a estabilidade do mRNA, bem como sua degradação e tradução (Clayton *et al.*, 2007; Haile *et al.*, 2007). Embora a maior parte ou todo o controle da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorra a nível pós-transcricional, diferenças estágio-específicas na abundância de mRNA já foram descritas, sendo provavelmente o resultado de mecanismos seletivos de degradação de mRNA (Minning *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2002).

Neste estudo inicialmente investigamos o nível do mRNA do gene TxP triparedoxina peroxidase (TxP) em populações *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial utilizando o *Northern blotting* e RT-PCR quantitativo em tempo real. Ambas as metodologias mostraram que os níveis de mRNA do gene TxP estão 2 a 4 vezes aumentados nas populações resistentes de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* comparado com seus respectivos pares sensíveis. Os resultados de *Northern blotting* e qPCR não foram conclusivos para a espécie *L. infantum chagasi*. Por outro lado, para a espécie *L.*

guyanensis o *Northern blotting* mostrou aumento de 8 vezes no mRNA do gene TxP da população resistente comparado com seu par sensível. Já o qPCR apresentou resultados discrepantes para esta espécie. Acreditamos que este resultado se deve à sequência do iniciador usado neste ensaio ser específica para a espécie *L. braziliensis*. Iniciadores específicos do gene TxP de *L. guyanensis* e *L. infantum chagasi* deverão ser desenhados para estas espécies com objetivo de obter resultados reais de amplificação do gene.

Na etapa seguinte, analisamos se os níveis de mRNA do gene TxP nas diferentes populações de *Leishmania* spp. refletia na quantidade de proteína produzida. Nossos resultados mostraram um aumento no nível de expressão de 2 a 4 vezes em todas as populações resistentes de *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, quando comparado aos seus respectivos pares sensíveis. É interessante observar que na literatura existem vários trabalhos mostrando aumento no nível de expressão de enzimas da via antioxidante em parasitos resistentes a drogas. Em *Trypanosoma cruzi*, Nogueira e colaboradores (2008) mostraram que as enzimas ferro superóxido dismutase e triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial tiveram um nível de expressão aumentado em populações de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ. *Entamoeba histolytica* resistente ao metronidazol apresentou um aumento de 3 vezes no nível de mRNA do gene TxP (Wassmann *et al.*, 1999). Em *Leishmania* spp. vários autores também observaram aumento de expressão da TxP. Lin e colaboradores (2005) observaram em *L. amazonensis* resistente ao arsenato um aumento de 4 a 5 vezes no nível de transcrição do gene TxP. Posteriormente, Wyllie e colaboradores (2008) observaram um aumento de 6.5 e 1.8 vezes nas enzimas TxP citosólica e mitocondrial, respectivamente, em *L. tarentolae* resistente ao antimônio trivalente. Estes estudos corroboram nossos resultados, mostrando um aumento na expressão da enzima triparedoxina peroxidase em parasitos resistentes a drogas. Estes dados sugerem que a superexpressão da TxP está associada com resistência de *Leishmania* spp. ao SbIII.

Diante disso, para melhor investigar o papel da TxP na proteção do parasito contra o estresse oxidativo, bem como seu papel na resistência ao SbIII, a enzima TxP de *L. braziliensis* foi superexpressa em populações sensíveis e resistentes de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*. Nos experimentos de transfecção utilizamos o vetor pIR1-BSD que permite que o gene transfectado seja integrado no gene do RNA ribossomal de *Leishmania* (Robinson & Beverley, 2003). Além de propiciar uma transfecção estável, este plasmídeo favorece a alta expressão do gene, uma vez que o gene do RNA ribossomal é um gene de múltiplas cópias. Entretanto, como a regulação de genes em tripanossomatídeos é predominantemente pós-transcricional, dependendo do gene a ser

expresso existe uma regulação específica. Nossos dados de transfecção mostraram um aumento de 2 a 4 vezes no nível de expressão da proteína TxP nos parasitos transfectados quando comparado com seus respectivos pares não transfectados ou com o vetor sem inserto. Esta expressão não é muito alta comparada com outros genes transfectados com este plasmídeo (10 a 20 vezes maior) (Vickers *et al.*, 2010). Entretanto, este resultado se deve ao gene TxP transfectado. Wyllie e colaboradores (2008) também superexpressaram TxP de *L. major* em populações de *L. tarentolae* sensíveis ao SbIII. Análises de *Western blotting* dos parasitos transfectados mostraram um aumento de 2,2 vezes no nível de expressão desta proteína quando comparado aos parasitos transfectados com o vetor original (não recombinante), corroborando os nossos resultados.

Após verificar a superexpressão da proteína triparedoxina peroxidase nas amostras de *Leishmania* spp. transfectadas, realizamos o teste de susceptibilidade ao SbIII para avaliar o possível envolvimento desta enzima no fenótipo de resistência deste parasito ao antimonial. Os resultados obtidos foram muito interessantes. Observamos que a superexpressão do gene TxP na população sensível (parental) de *L. braziliensis* aumentou 2 vezes a resistência desta população ao SbIII, quando comparado à população parental não transfectada. Por outro lado, quando a população resistente (parental) de *L. braziliensis* foi transfectada com o gene TxP, ocorreu uma reversão do fenótipo de resistência. Os parasitos antes resistentes, após a transfecção se tornaram muito sensíveis ao antimonial. A superexpressão deste gene na população resistente com certeza causou algum distúrbio no metabolismo destes parasitos transfectados, descompensando outras enzimas da via e favorecendo o fenótipo de susceptibilidade.

Outro dado interessante foi obtido com a espécie *L. infantum chagasi*. A transfecção do gene TxP em populações de *L. infantum chagasi* sensíveis e resistentes ao SbIII, apesar de apresentarem superexpressão da proteína (aproximadamente 2 vezes), o fenótipo de resistência dos parasitos transfectados ao SbIII não foi alterado. Este resultado mostra, portanto, que a superexpressão desta enzima não tem relevância no fenótipo de resistência da espécie de *L. infantum chagasi* ao SbIII. Entretanto, em *L. braziliensis* esta enzima está envolvida com o fenótipo de resistência juntamente com outras enzimas, uma vez que o fenótipo de resistência a drogas é multifatorial e multigênico.

Wyllie e colaboradores (2008) superexpressaram TxP de *L. major* em populações de *L. tarentolae* sensíveis ao SbIII. Ensaios de susceptibilidade dos parasitos transfectados com TxP ao SbIII mostraram um aumento de aproximadamente 2,5 vezes na resistência

dos parasitos ao antimonial. Esses resultados corroboram os nossos resultados obtidos com *L. braziliensis* mostrando que a superexpressão desta enzima pode ser uma característica chave na resistência de algumas espécies de *Leishmania* ao antimonial.

Dados da literatura mostram que parasitos que superexpressam TxP apresentam maior resistência aos radicais reativos de oxigênio. Lyer e colaboradores (2008) observaram um aumento nos níveis de TxP citosólica em promastigotas de *L. donovani* após exposição ao H_2O_2 , não ocorrendo morte celular. Entretanto, a exposição conjunta ao H_2O_2 e óxido nítrico resultou na redução significativa dos níveis de cTxP acompanhada de morte celular dos parasitos. Por outro lado, os autores também demonstraram que *L. donovani* transfectados com cTxP são mais resistentes à ação do antimonial e apresentam aumento na virulência em relação aos parasitos parentais. Estes dados sugerem uma associação entre a expressão de TxP com a sobrevivência, virulência e resposta à droga em *L. donovani*.

Yu Hsu e colaboradores (2008) demonstraram a diferença na cinética da regulação de genes mitocondrial e citosólico na cascata da triparedoxina dependente de tripanotona quando parasitos *L. amazonensis* foram expostos ao arsenato. Harder e colaboradores (2006) mostraram que a superexpressão de uma peroxirredoxina mitocondrial em *L. donovani* protege os parasitos contra o peróxido de hidrogênio induzido pela morte programada da célula.

De acordo com Luz *et al.* 2009, testes de susceptibilidade *in vitro* com diferentes estágios de vida de *Leishmania* ainda constituem a principal ferramenta para o mapeamento epidemiológico de resistência à droga, uma vez que marcadores moleculares de resistência ainda não foram identificados ou totalmente validados.

Mittal e colaboradores (2007) investigaram o mecanismo de resistência ao SbIII em isolados clínicos de *L. donovani*, na Índia. Estes isolados foram classificados como resistentes ou sensíveis em relação à resposta clínica ao tratamento. Os autores observaram que os isolados resistentes apresentam altos níveis de tióis intracelulares. Segundo os autores, este aumento dos níveis de tiol é devido à amplificação do gene tripanotona redutase (TxP) e do gene transportador ABC (MRP-A).

Wyllie e colaboradores (2010) também estudaram o papel da via antioxidante dependente de tripanotona em isolados clínicos de pacientes resistentes ao tratamento com antimonial da Índia. Neste estudo, eles observaram elevados níveis das enzimas triparedoxina e triparedoxina peroxidase nos parasitos resistentes, favorecendo o aumento do metabolismo de peróxidos. A explicação para os elevados níveis de

triparedoxina e TxP nos isolados clínicos ainda não foi determinada. Porém estes dados sugerem que o aumento na expressão das enzimas da defesa antioxidante em *Leishmania* pode desempenhar um importante papel na resistência clínica ao antimonial.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pretendemos realizar ainda um teste de atividade enzimática a fim de verificar se a TxP é realmente funcional em *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- O nível de mRNA do gene cTxP foi 2 a 6 vezes maior nas populações resistentes de *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, comparado com as respectivas populações sensíveis;
- O gene cTxP não está amplificado no genoma das populações resistentes de *Leishmania* spp. analisadas;
- A proteína cTxP está 2 a 4 vezes mais expressa em todas as populações resistentes de *Leishmania* spp. analisadas neste estudo;
- A superexpressão do gene TxP na população de *L. braziliensis* sensível aumentou 2 vezes a resistência dos parasitos transfectados ao SbIII, quando comparado à população parental;
- A superexpressão de TxP na população resistente de *L. braziliensis* reverteu o fenótipo de resistência. Os parasitos antes resistentes, após a transfecção se tornaram muito sensíveis ao SbIII;
- A superexpressão da TxP em populações sensíveis e resistentes de *L. infantum chagasi* não alterou o fenótipo de resistência ao SbIII.

Nossos resultados de análise funcional mostraram que a enzima triparedoxina peroxidase está envolvida no fenótipo de resistência de *L. braziliensis* ao antimonial.

Como perspectiva deste trabalho, pretendemos realizar ainda um teste de atividade enzimática a fim de verificar se a TxP é realmente funcional em *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*.

8 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; 82:147-58.

Almeida R, Norrish A, Levick M, *et al*. From genomes to vaccines: *Leishmania* as a model. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci* 2002;357:5–11.

Almeida OLS, Santos JB. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *Annu Bras Dermat*. 2011; 86(3):497-506

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.

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(4):379-380.

Ashutosh S S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* 2007; 56:143-153.

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

Barr, S. D., and L. Gedamu. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J. Biol. Chem*. 2003.278:10816–10823.

Bates, PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int.J. Parasitol*. 2007.37: 1097-106.

Berhe N, Abraham Y, Hailu A, Ali A, Mengistu G, Tsige K, Abebe Y. Electrocardiographic findings in Ethiopians on pentavalent antimony therapy for visceral leishmaniasis. *East Afr Med J*. 2001; 78(11):608-10.

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.

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

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

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral. Brasília: MS, 2008. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/3252/415/glossario-de-doencas-doencas-de-a-a-z.html>. Acesso em 10 Mar 2011.

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.

Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*. 2000; 14;407(6801):211-5.

Castro, H., H. Budde, L. Flohe, B. Hofmann, H. Lunsdorf, J. Wissing, and A. M. Tomas. Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.* 2002a 33:1563–1573.

Castro, H., C. Sousa, M. Santos, A. Cordeiro-da-Silva, L. Flohe, and A. M. Tomas. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.* 2002b 33:1552–1562

Castro-Pinto DB, Genestra M, Menezes GB, Waghbi M, Gonçalves A, De Nigris Del Cistia C, et al. Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. Arch. Microbiol. 2007;189:375–384.

Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J Biol Chem 1994;269:27670-8.

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

Chawla B, Madhubala R. Drug targets in Leishmania.J Parasit Dis. 2010; 34(1):1-13.

Clayton C, Shapira M: Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol 2007, 156(2):93-101.

Clayton C, Schwede A, Stewart M, Robles A, Benz C, Po J, et al. Control of mRNA degradation in trypanosomes. Biochem Soc Trans 2008; 36(6):520-1.

Croft SL Monitoring drug resistance in leishmaniasis. Trop Med Int Health. 2001;6: 899–905.

Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev. 19:111–126.

Cupolillo, E., E. Medina-Acosta, H. Noyes, H. Momen, and G. Grimaldi, Jr. 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitol. Today 16:142–144.

Cupollilo E, Ibrahim LR, Toaldo CB et al Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different host and geographic areas in Brazil. J. Clin. Microbiol. 2003 41(7):3126–3132.

Da Luz RI, Vermeersch M, Dujardin JC, Cos P, Maes L. In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(12):5197-203.

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.

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.

Depledge DP, Evans KJ, Ivens AC, Aziz N, Maroof A, Kaye PM, Smith DF. Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(7):e476.

Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: Epidemiology in Europe. *Annu Trop Med Parasitol*. 2003; 97: 3-15.

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

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.

Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J* 1997;16:2590-8.

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.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 2005;15:309(5733):404-9.

Eslami G, Frikha F, Salehi R, Khamesipour A, Hejazi H, Nilforoushzadeh MA. Cloning, expression and dynamic simulation of TRYP6 from *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). Mol Biol Rep. 2010; DOI101007/s11033-010-0492-5.

Fairlamb AH, Cerami A, 1992. Metabolism and functions of trypanothione in kinetoplastida. Annu Rev Microbiol. 46: 695–729.

Finzi JK, Chiavegatto CWM, Corat KF, Lopez JA, Cabrera OG, Mielniczki-Pereira AA, et al. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. Mol. Bioch. Parasit 2004;133:37-43.

Flohe L, Hecht HJ, Steinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. Free Radic Biol Med. 1999;27:966-84.

Flohe, L., H. Budde, K. Bruns, H. Castro, J. Clos, B. Hofmann, S. Kansal-Kalavar, D. Krumme, U. Menge, K. Plank-Schumacher, H. Sztajer, J. Wissing, C. Wylegalla, and H. J. Hecht. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity and catalytic mechanism. Arch. Biochem. Biophys. 2002; 397:324–335.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7 (3): 338-349.

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.

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.

Haile S, Papadopoulou B: Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2007, 10(6):569-577.

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

Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Poulin R, Ouellette M. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol*. 1999; 34(4):726-35.

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

Hadighi R, Mohebbi M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med*. 2006;3(5):e162.

Harder, S, Bente, M, Isermann, K, and Bruchhaus, I. 2006. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Eukaryot Cell* 5: 861-870.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999; 2: 1191- 9

Hsu, J. Y., Y. C. Lin, S. C. Chiang, and S. T. Lee. 2008. Divergence of trypanothione-dependent trypanothione cascade into cytosolic and mitochondrial pathways in arsenite-resistant variants of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 157:193–204.

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

Kedzierski L. Leishmaniasis. *Hum Vaccin*. 2011.1; 7(11).

Kim, K. H., Kim I.H., Lee K. Y., Rhee, S. G. & Stadtman, E.R. 1988 J. Biol.Chem.263, 4704-4711

Levick MP, Tetaud E, Fairlamb AH, Blackwell JM. Identification and characterisation of afunctional peroxidoxin from *Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol 1998;96:125-37.

Liarte DB, Murta SMF. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. Parasitology Res 2010; 107:205-12.

Lin YC, Hsu JY, Chiang SC, Lee ST. Distinct overexpression of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidases results in preferential detoxification of different oxidants in arsenite-resistant *Leishmania amazonensis* with and without DNA amplification. Mol Biochem Parasitol. 2005;142:66-75.

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

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.

Lyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary ML, Shaha C. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. Mol Microbiol 2008; 68(2):372-91.

Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18: 187-198.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica 10. 1994; 2: 359-375.

McGonigle S, Dalton JP, James ER. Peroxidoxins: a new antioxidant family. Parasitol Today. 1998; 14 (4): 139-45.

Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 131(1):55-64.

Mittal K, Rai S, Ravinder A, Gupta S, Sundar S, Goyal N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76: 681- 688.

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. USA* 1996; 93:10383-10387.

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

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.

Nogoceke E, Gommel DU, Kiess M, Kalisz HM, Flohe L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem*. 1997;378:827-36.

Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop*. 2006;100:119-32.

Nogueira FB, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SM. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res*. 2008; 104(4):835-44.

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

Ouellette M. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1994; 67:49-57.

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

Palatnik-de-Sousa CB: Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Rev Vaccin*. 2008, 26:1709-1724.

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.

Piñeyro MD, Pizarro JC, Lema F, Pritsch O, Cayota A, Bentley GA, Robello C. Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Struct Biol* 2005;150:11-22.

Pradines B, Pagès JM, Barbe J. Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2005;5(4):411-31.

Read, A. F., and L. H. Taylor. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292:1099–1102.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3rd ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2001. P. 137-150.

Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001;52:35–41.

Robinson, K. A., and S. M. Beverley. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2003; 128:217–228.

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

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Press; 1989.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques. 1994;17:914-21.

Santos OD, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernadino A, Bourguignon CS, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. Parasitol Res. 2008; 103: 1-10.

Scielo. Disponível em www.scielo.org. Acesso em 16 Out 2009.

Seifert K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti- Leishmanial Drug Discovery and Development. Open Med Chem J 2011; 5: 31-39.

Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmüller P, Ouaisi 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 2001; 80:195-205.

Shaw, JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101: 577-579.

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.

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

Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimarães LH, *et al.* Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. BMC Infect Dis. 2010; 10: 209.

Sudhandiran, G., and Shaha, C. 2003 J. Biol. Chem. 278, 25120–25132.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. Clin Infect Dis. 2000; 31: 1104–1107.

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

Swenerton RK, Knudsen GM, Sajid M, Kelly BL, McKerrow JH. *Leishmania* subtilisin is a maturase for the trypanothione reductase system and contributes to disease pathology. J Biol Chem. 2010; 285(41): 31120-9.

Teixeira SMR. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Braz. J. Med. Biol. Res 1998;31:1503-16.

Temperton, N. J., Wilkinson, S. R., and Kelly, J. M. Mol. Biochem. Parasitol. 1996; 76, 339–343.

Tiuman TS, Santos AO, Nakamura TU, Filho BPD, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. Int J Infect Dis 2011; 15: e525- e532.

Travi BL, Osorio Y, Saravia NG. The inflammatory response promotes cutaneous metastases in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. J Parasitol. 1996; 82:454-7.

Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Mol. Aspects of Medicine. 2004;25:211-220.

Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, et al. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. Genome Biol. 2008;9(7):115.

Ullman B. Multidrug resistance and P-glicoprotein in parasitic Protozoa. J. Bioenerg. Biomemb. 1995;27:77-84.

Walker J, Acestor N, Gongora R, Quadroni M, Segura I, Fasel N, Saravia GN. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. Mol Biochem Parasitol 2005;145:254-264.

Walker J, Acestor N, Gongora R, Quadroni M, Segura I, Fasel N, Saravia NG. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. Mol Biochem Parasitol 2006;145:254-64.

Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. J Biol Chem 1999;274:26051-6.

Watson JD, Myers RM, Caudy AA, Witkowski, JA. DNA Recombinante. 2nd ed. Artmed; 2009. Cap. 12.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, Bastien P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Res. 1996; 24(9):1688-94.

World Health Organization. Leishmaniasis: cutaneous, mucocutaneous, visceral. Geneva: WHO, [s.d.a]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em 20 dez 2011a.

World Health Organization. Leishmaniasis. Geneva WHO, [s.d.b]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis>. Acesso em 21 Dez 2011.

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. J. Biol. Chem. 2004; 279:39925-39932.

Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH. Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Ant Agents Chem* 2008;52(4):1359-65.

Wyllie S, Mandal G, Singh N, Sundar S, Fairlamb A H, Chatterjee M. Elevated levels of tryparedoxin peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 2010; 173: 152-164.

Yuan Y, Knaggs MH, Poole LB, Fetrow JS, Salsbury FR Jr. Conformational and oligomeric effects on the cysteine pK(a) of tryparedoxin peroxidase. *J Biomol Struct Dyn*. 2010; 28(1):51-70.

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.

A) Alinhamento das sequências do gene da triparedoxina peroxidase de *Leishmania braziliensis* X *Leishmania amazonensis*

>gb|AY842247.1| *Leishmania amazonensis* cytosolic tryparedoxin peroxidase gene, complete cds
Length=600

Score = 667 bits (361), Expect = 0.0
Identities = 525/602 (87%), Gaps = 20/602 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1  ATGTCCTGCGGTGACGCCAAAATGAAC-GAGCCTGCGCGCCCTTCGAGGAAATGGCGCT  59
      |||
Sbjct 1  ATGTCCTGCGGTGACGCCAAGATCAACTGCGCC-GCGCCGACCTTCGAGGAGGTGGCGCT  59

Query 60  CATGCCAACGGCTCCTTCAAGAAGATCACCTCGCCTCTACAAGGGCAAGTGGGTCGT  119
      |||
Sbjct 60  CATGCCAACGGCAGCTTCAAGAAGATCAGCCTCTCCGCTACAAGGGCAGGTGGGTCGT  119

Query 120 GCTCTTCTTCTACCCGCTTGACTTCACCTTTGTGTGCCCGACAG-AGATCA-TCCAGTTC  177
      |||
Sbjct 120 GCTCTTCTTCTACCCGCTCAACTTCACCCCGTGTGCCCGACAGAAG-TCATTGC-GTTC  177

Query 178 TCCGACAGCATAAAGCGCTTCAACGAGCTTGA-CTGCGAGGTCAT-GTCGTGCTCTGTGG  235
      |||
Sbjct 178 TCCGACAACGTGGCTCGCTTCAACGAGC-TCAGCTGCGACGTCATCG-CGTGCTCCACGG  235

Query 236 ACAGCGAGTACGCGCACCTGCAGTGGACGCTGCAGGAACGCAAGAAGGGCGGCTCGGCC  295
      |||
Sbjct 236 ACAGCGAGTACGCGCACCTGCAGTGGACGCTGCAGGACCGCAAGAAGGGCGGCTCGGCA  295

Query 296 CCATGGAGATCCCGATGCTGGCCGACAAGACCAAGTGCATCTG-TCGTGCCTACGGCGTG  354
      |||
Sbjct 296 CCATGGCGATCCCAATACTGGCCGACAAGACCAAGTCCATC-GCTCGTGCCTACGGCGTG  354

Query 355 CTGGATGAGAAG-A-AGGGCGTTGCCTACCGCGGCTCTTTATCATCGA-CCCCAAGGGG  411
      |||
Sbjct 355 CTGG-CG-GAGGCACAGGGCGTGGCCTACCGCGGTCTCTTCATCATCGACCCCGTGGCG  412

Query 412 ATCTGCGCCAGATCATTGTCAACGACATGCCGGTGGGCCGCAACGTGGAGGAGGCGCTG  471
      |||
Sbjct 413 -TCCTGCGCCAGATCACCGTCAACGACATGCCGGTGGGCCGCAACGTGGAGGAGGTTCTG  471

Query 472 CGCCTGCTGGAGGCTCTTCAGTTCTGTGAGAGCACGGCGAGGTGTGCCCGCCAACTGG  531
      |||
Sbjct 472 CGCCTGCTGGAGGCTTTTCAGTTCTGTGAGAGCACGGCGAGGTGTGCCCGCCAACTGG  531

Query 532 AAGAAGGGCGATGCCACAATGAACCGGAGC-GACAGGCGTCCATTGAGGGCTACTTCAG  590
      |||
Sbjct 532 AAGAAGGGCGACCCACACAATGAACCGGAACCGA-AGGCATCTGTCGAGGGGTACTTCAG  590

Query 591 CA 592
      ||
Sbjct 591 CA 592

```

B) Alinhamento das sequências do gene da triparedoxina peroxidase de *Leishmania braziliensis* X *Leishmania infantum chagasi*

>ref|XM_001464409.1|  Leishmania infantum JPCM5 tryparedoxin peroxidase (TRYP) mRNA, complete cds
Length=600

GENE ID: 5067840 TRYP | tryparedoxin peroxidase [Leishmania infantum JPCM5]

Score = 734 bits (397), Expect = 0.0
Identities = 534/599 (89%), Gaps = 14/599 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   ATGTCCTGCGGTGACGCCAAATGAACGAG-CCTGCGCGCGCCCTTCGAGGAAATGGCGCT  59
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1   ATGTCCTGCGGTGACGCCAAGATCAAC-TGTCCCGCGCGCCCTTCGAGGAGGTGGCGCT  59

Query 60  CATGCCCAACGGCTCCTTCAAGAAGATCACCCTCGCCTCCTACAAGGGCAAGTGGGTCGT  119
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 60  CATGCCCAACGGCAGCTTCAAGAAGATCAGCCTCGCGCGCTACAAGGGCAAGTGGGTCGT  119

Query 120 GCTCTTCTTCTACCCGCTTGACTTCACCTTTGTGTGCCCGACAGAGATCATC-CAGTTCT  178
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 120 GCTCTTCTTCTACCCGCTCGACTTCACCTTCGTGTGCCCGACAGAGATCATCGC-GTTCT  178

Query 179 CCGACAGCATAAAG-CGCTTCAACGAGCTTGACTGCGAGGTGAT-GTCGTGCTCTGTGGA  236
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 179 CCGAAAACGT-GAGTCGCTTCAACGAGCTCAACTGCGAGGTCTCTG-CGTGCTCCATGGA  236

Query 237 CAGCGAGTACCGGCACCTGCAGTGGACGCTGCAGGAACGCAAGAAGGGCGGCCCTCGGCC  296
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 237 CAGCGAGTACCGGCACCTGCAGTGGACGCTGCAGGACCGCAAGAAGGGCGGCCCTCGGCC  296

Query 297 CATGGAGATCCCGATGCTGCGCGACAAGACCAAGTGCATCTG-TCGTGCCTACGGCGTGC  355
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 297 CATGGCGATTCCAATGCTGCGCGACAAGACCAAGAGCATC-GCTCETGCCTACGGCGTGC  355

Query 356 TGGATGAGAAGA-AGGGCGTGCCTACCGCGGCCTCTTTATCATCGACCCCAAGGGGATC  414
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 356 TGGCGGAGAA-ACAGGGCGTGGCCTACCGCGGTCTCTTCATCATCGACCCCAATGGCATG  414

Query 415 CTGCGCCAGATCATTGTCAACGACATGCCGGTGGGCCGCAACGTGGAGGAGGCGCTGGCG  474
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 415 GTGCGCCAGATCACCGTCAACGACATGCCGGTGGGCCGCAACGTGGAGGAGGTTCTGGCG  474

Query 475 CTGCTGGAGGCTCTTCAGTTCGTGGA3AAGCACGGCGAGGTGTGCCCGGCAACTGGGAG  534
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 475 CTGCTGGAGGCTTTTCAGTTCGTGGA3AAGCACGGCGAGGTGTGCCCGGCAACTGGGAG  534

Query 535 AAGGGCGATGCCACAATGAAACCGGAGC-GACAGGCGTCCATTGAGGGCTACTTCAGCA  592
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 535 AAGGGCGCCCCACGATGAAGCCGAGCCGA-AGGCGTCTGTCGAGGGGTACTTCAGCA  592

```

**C) Alinhamento das sequências do gene da triparedoxina peroxidase de
Leishmania braziliensis X
*Leishmania guyanensis***

```
>gb|AY753537.1| Leishmania guyanensis tryparedoxin peroxidase 2 gene, complete
cds
Length=600

Score = 989 bits (535), Expect = 0.0
Identities = 574/593 (97%), Gaps = 2/593 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   ATGTCCTGCGGTGACGCCAAAATGAACGAGCCTGCGCCGCCCTTCGAGGAAATGGCGCTC 60
Sbjct 1   ATGTCCTGCGGTAACGCCAAAATGAACGAGCCTGCGCCGCCCTTCGAGGAGACGGCGCTC 60

Query 61  ATGCCAACGGCTCCTTCAAGAAGATCACCTTCGCTCTCTACAAGGGCAAGTGGGTCGTG 120
Sbjct 61  ATGCCAACGGCGCCTTCAAGAAGATCAGCCTTCGCTCTCTACAAGGGCAAGTGGGTCGTG 120

Query 121 CTCTTCTTCTACCGCTTGACTTCACCTTTGTGTGCCCACAGAGATCATCCAGTTCTCC 180
Sbjct 121 CTCTTCTTCTACCGCTTGACTTCACCTTCGTGTGCCCACAGAGATCATCCAGTTCTCC 180

Query 181  GACAGCATAAAGCGCTTCAACGAGCTTGACTGCGAGGTCAT-GTCGTGCTCTGTGGACAG 239
Sbjct 181  GAAAACATAAAGCGCTTCAGCGAGCTTGATTGCGAGGTCATCG-CGTGCTCTGTGGACAG 239

Query 240  CGAGTACGCGCACCTGCAGTGGACGCTGCAGGAACGCAAGAAGGGCGGCCTCGGCCCAT 299
Sbjct 240  CGAGTACGCGCACCTGCAGTGGACGCTGCAGGAACGCAAGAAGGGCGGCCTCGGCCCAT 299

Query 300  GGAGATCCCGATGCTGGCCGACAAGACCAAGTGCATCTGTCTGCTACGGCGTGTGGA 359
Sbjct 300  GGAGATCCCGATGCTGGCCGACAAGACCAAGTGCATCTGTCTGCTACGGCGTGTGGA 359

Query 360  TGAGAAGAAGGGCGTTGCCTACCGCGGCCTCTTTATCATCGACCCCAAGGGGATCCTGCG 419
Sbjct 360  TGAGAAGCAGGGCGTTGCCTACCGCGGCCTCTTTATCATCGACCCCAAGGGGATCCTGCG 419

Query 420  CCAGATCATTGTCAACGACATGCCGGTGGGCCGCAACGTGGAGGAGGCGCTGCGCCTGCT 479
Sbjct 420  CCAGATCACCATCAACGACATGCCGGTGGGCCGCAACGTGGAGGAGGTGCTGCGCCTGCT 479

Query 480  GGAGGCTCTTCAGTTTCGTGGAGAAGCACGGCGAGGTGTGCCCCGCCAACTGGAAGAAGGG 539
Sbjct 480  GGAGGCTTTTCAGTTTCGTGGAGAAGCACGGCGAGGTGTGCCCCGCCAACTGGAAGAAGGG 539

Query 540  CGATGCCACAATGAAACCGGAGCGACAGGCGTCCATTGAGGGCTACTTCAGCA 592
Sbjct 540  CGATGCCACAATGAAACCGGAGCGACAGGCGTCCATTGAGGGCTACTTCAGCA 592
```


A) Alinhamento de aminoácidos de *Leishmania braziliensis* X *Leishmania chagasi*

```
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: CAM42127.1
# 2: AF312397_1
# Matrix: EBL0SUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 199
# Identity:   167/199 (83.9%)
# Similarity: 184/199 (92.5%)
# Gaps:       0/199 ( 0.0%)
# Score: 907.0
#
#
#=====
CAM42127.1      1  MSCGDAKMNEPAPPFEEMALMPNGSFKKINLASYGKGVVLFYPLDFTF      50
      |||||:|.|||||:|||||||:|:|||||||
AF312397_1      1  MSCGDAKINCPAPPFEEVALMPNGSFKKISLAAYKGVVLFYPLDFTF      50

CAM42127.1     51  VCPTEIIQFSDSIKRFNLDCEVMSCSVDSEYAHLQWTLQERKKGGLGPM     100
      |||||.||:::.||||:||||:|:|||||||:|||||.
AF312397_1     51  VCPTEIIAFSENVSRFELNCEVLACSMDSYAHLQWTLQDRKKGGLGAM     100

CAM42127.1    101  EIPMLADKTKICRAYGVLDEKKGVAIRGLFIIDPKGILRQIIVNDMPVG     150
      .|||||.|.|||||.||:|||||||.||:|.|||||
AF312397_1    101  AIPMLADKTKSIARAYGVLAEKQGVAYRGLFIIDPNGMVRQITVNDMPVG     150

CAM42127.1    151  RNVEEALRLLEALQFVEKHGEVCPANWKKGDATMKPERQASIEGYFSKQ     199
      |||||.|||||.|||||||.....|||.||:|||||
AF312397_1    151  RNVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGAPTMKPEPKASVEGYFSKQ     199
```

B) Alinhamento de aminoácidos de *Leishmania braziliensis* X *Leishmania amazonensis*

```
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: CAM42127.1
# 2: AAX47428.1
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 199
# Identity:   160/199 (80.4%)
# Similarity: 180/199 (90.5%)
# Gaps:       0/199 ( 0.0%)
# Score: 871.0
#
#
#=====
CAM42127.1      1  MSCGDAKMNEPAPPFEEMALMPNGSFKKINLASYGKQWVVLFFYPDFTF      50
      |||||:|..||:|||||||:|:|:|||||||:|.
AAX47428.1      1  MSCGDAKINCAAPTFEVALMPNGSFKKISLSAYKGRWVVLFFYPLNFTP      50

CAM42127.1     51  VCPTEIIQFSDSIKRFNELDCEVMSCSVDSEY AHLQWTLQERKKGGLGPM     100
      ||||:|.||:|.||||. |:|:|.|||||||:|||||.|
AAX47428.1     51  VCPTEVIAFSDNVARFNELSCDVIACSTDSEY AHLQWTLQDRKKGGLGTM     100

CAM42127.1    101  EIPMLADKTKCICRAYGVLDEKKG VAYRGLFIIDPKGILRQIIVNDMPVG     150
      .|:|||||.|.|||||. |:|:|||||||:|:|:|||||
AAX47428.1    101  AIPILADKTKSIARAYGVLA EAQGVAYRGLFIIDPRGVL RQITVNDMPVG     150

CAM42127.1    151  RNVEEALRLLEALQFVEKHGEVCPANWKKGDATMKPERQASIEGYFSKQ     199
      |||||.|||||.|||||||:|||||.|||:|:|:|||||
AAX47428.1    151  RNVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGDPTMKPEPKASVEGYFSKQ     199
```


C) Alinhamento de aminoácidos de *Leishmania braziliensis* X *Leishmania guyanensis*

```
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: CAM42127.1
# 2: AAV31765.1
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 199
# Identity:   184/199 (92.5%)
# Similarity: 194/199 (97.5%)
# Gaps:       0/199 ( 0.0%)
# Score: 998.0
#
#
#=====
```

CAM42127.1	1	MSCGDAKMNEPAPPFEEMALMPNGSFKKINLASYGKGVVLFYPLDFTF	50
		: . . : :	
AAV31765.1	1	MSCGNAKMNEPAPAFEETALMPNGAFKKISLASYGKGVVLFYPLDFTF	50
CAM42127.1	51	VCPTETIIQFSDSIKRFNLDCEVMSCSVDSEYHLQWTLQERKKGGLGPM	100
		:: : :	
AAV31765.1	51	VCPTETIIQFSENIKRFSELDCEVIACSVDSYHLQWTLQERKKGGLGPM	100
CAM42127.1	101	EIPMLADKTKCICRAYGVLDEKKGVAIRGLFIIDPKGILRQIIVNDMPVG	150
		: : .:	
AAV31765.1	101	EIPMLADKTKCICRAYGVLDEKQGVAYRGLFIIDPKGILRQITINDMPVG	150
CAM42127.1	151	RNVEEALRLLEALQFVEKHGEVCPANWKKGDATMKPERQASIEGYFSKQ	199
		. .	
AAV31765.1	151	RNVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGDATMKPERQASIEGYFSKQ	199