

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização molecular e bioquímica de *Leishmania*  
(*Sauroleishmania*) *tarentolae*: uma espécie não-  
patogênica**

**FILIFE FIDELES DUARTE ANDRADE**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Co-orientador: Dr. Juliano Simões de Toledo

BELO HORIZONTE

Julho – 2017

**FILIFE FIDELES DUARTE ANDRADE**

**Caracterização molecular e bioquímica de *Leishmania*  
(*Sauroleishmania*) *tarentolae*: uma espécie não-  
patogênica**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Fernandes**

**Co-orientador: Dr. Juliano Simões de Toledo**

**BELO HORIZONTE**

**Julho – 2017**

043 Andrade, Filipe Fideles Duarte.  
Caracterização molecular e bioquímica de *Leishmania (Sauroleishmania)*  
*tarentolae*: uma espécie não-patogênica [manuscrito] / Filipe Fideles Duarte  
Andrade. - 2017.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Fernandes. Co-orientador: Dr. Juliano  
Simões de Toledo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas.

1. Genética. 2. *Leishmania* - Teses. I. Fernandes, Ana Paula. II. Toledo, Juliano  
Simões de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências  
Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



**"Caracterização molecular e bioquímica de Leishmania  
(Sauroleishmania) tarentolae: uma espécie não-patogênica "**

**Filipe Fideles Duarte Andrade**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

*Ana Paula Salles Moura Fernandes*  
Ana Paula Salles Moura Fernandes - Orientadora  
UFMG

*Juliano Simões Toledo*  
Juliano Simões Toledo - Coorientador  
UFMG

*Rafael Ramiro Assis*  
Rafael Ramiro Assis  
CPQRR/FIOCRUZ

*Silvane Maria Fonseca Murta*  
Silvane Maria Fonseca Murta  
CPQRR/FIOCRUZ

Belo Horizonte, 27 de julho de 2017.

“Por que apressar?

Se nem sabe onde chegar

Correr em vão se o caminho é longo

Quem se soltar, da vida vai gostar

E a vida vai gostar de volta em dobro

E se tropeçar

Do chão não vai passar

Quem sete vezes cai, levanta oito”

(Thiago Iorc)

## AGRADECIMENTOS

À minha avó e meu avô que tem me apoiado incondicionalmente por toda a minha caminhada, sem jamais permitirem que eu desistisse dos meus objetivos e minhas metas. Além disso, pelo exemplo de vida e por todos os ensinamentos.

À minha mãe, que mesmo à certa distância, esteve envolvida em todas as minhas conquistas.

À minha orientadora, a Professora Dra. Ana Paula, pelas orientações e confiança que depositou em mim, e pelo seu exemplo de profissionalismo e dedicação.

Ao meu co-orientador Dr. Juliano Toledo pela confiança, paciência e pelos ensinamentos teóricos e práticos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Soares e sua equipe por todas as sugestões, fornecimento de materiais e auxílios na execução de experimentos.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Fernanda Freire, por toda a sua disponibilidade e incentivo.

Aos membros da banca, Prof<sup>a</sup> Dra. Silvane Murta, Dr. Rafael Assis e Dr. Wagner Magalhães por terem aceitado prontamente a participar da avaliação deste trabalho.

Aos laboratórios de Toxicologia e Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia/UFMG pela estrutura e suporte necessários para a execução do trabalho.

Ao Gabriel Marques, que foi uma peça fundamental de apoio e incentivo. E, além disso, por todos os conselhos e companheirismo.

À minha amiga, Jéssica Vitória, por todos os auxílios e conselhos. Espero poder levar essa amizade formada no mestrado para a vida.

As minhas najas favoritas, Isabela Aurora, Ana Carvalho e Cecília Cirelli, que ajudaram a tornar esses dois anos mais leves e divertidos.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular, pelo bom convívio e auxílios durante esse período;

Aos meus familiares, por todo o carinho e apoio incondicional.

À agência de fomento CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPQ e FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 <i>Leishmania</i> spp. e as leishmanioses.....	17
1.2 Ciclo biológico.....	18
1.3 As leishmanioses.....	21
1.3.1 <i>Leishmaniose cutânea</i> .....	22
1.3.2 <i>Leishmaniose mucosa</i> .....	22
1.3.3 <i>Leishmaniose visceral</i> .....	22
1.4 Epidemiologia das leishmanioses.....	23
1.5 Fatores de Virulência em <i>Leishmania</i> spp.....	24
1.5.1 <i>Lipofosfoglicano</i> .....	24
1.5.2 <i>Cisteíno-proteases (CPs)</i> .....	25
1.5.3 <i>gp63</i> .....	25
1.6 <i>L. tarentolae</i> : uma espécie não-patogênica.....	26
1.7 A importância das ômicas como ferramentas para o estudo da diversidade molecular de <i>Leishmania</i> spp.....	30
1.7.1 <i>Genômica comparativa entre as espécies do gênero Leishmania</i> .....	30
1.7.2 O controle da expressão gênica e a interação parasito-hospedeiro.....	32
1.7.3 <i>Proteômica</i> .....	34
1.7.4 <i>Metabolômica</i> .....	34
<b>JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....</b>	<b>38</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39



<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
3.1 Cultivo de <i>Leishmania</i> .....	40
3.2 Genotipagem de <i>Leishmania spp</i> por PCR-RFLP do gene HSP70.....	40
3.3 Avaliação da metaciclo gênese <i>in vitro</i> , composição da membrana celular e perfil proteolítico de <i>L. tarentolae</i> .....	41
3.3.1 Citometria de Fluxo.....	41
3.3.2 Lectinas.....	41
3.3.3 Ensaio de Aglutinação.....	41
3.3.4 Western blot de LPG.....	42
3.3.5 Extração e Purificação de LPGs.....	42
3.3.6 Ensaio de zimografia.....	43
3.3.7 Avaliação da lise pelo sistema complemento.....	44
3.4 Análise metabolômica comparativa de <i>Leishmania spp</i> .....	44
3.4.1 Extração e derivatização dos metabólitos.....	44
3.4.2 Parâmetros da injeção no GC-MS.....	45
3.4.3 Processamento dos dados.....	46
3.4.4 Análises estatísticas.....	46
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1 Genotipagem de <i>Leishmania spp.</i> por meio de PCR-RFLP do gene HSP70.....	47
4.2 Avaliação do perfil de crescimento <i>in vitro</i> das cepas de <i>Leishmania spp.</i> empregadas neste estudo.....	48
4.3 Análise das alterações morfológicas no cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. tarentolae</i> por citometria de fluxo.....	49
4.4 Aglutinação com lectinas como ferramenta para identificação de modificações na composição dos carboidratos de membrana.....	51
4.5 Avaliação da presença de LPG em <i>L. tarentolae</i> .....	51
4.6 Avaliação do perfil de proteases de <i>L. tarentolae</i> .....	53
4.7 Avaliação da susceptibilidade <i>L. tarentolae</i> ao sistema complemento.....	55
4.8 Comparação do metaboloma de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. tarentolae</i> por GC-MS.....	55
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i> .....	20
Figura 2. Árvore filogenética representativa das relações de parentesco de <i>Leishmania spp.</i> construída a partir da sequência codificadora da dihidrofolato redutase/timidilato sintase (DHFR-TS).....	28
Figura 3. Eletroforese dos produtos PCR-RFLP do gene HSP70 após eletroforese em gel de agarose 4%.....	47
Figura 4. Resultado da análise comparativa <i>in silico</i> da PCR-RFLP de <i>L. tarentolae</i> .....	48
Figura 5. Perfil de crescimento <i>in vitro</i> das cepas de <i>Leishmania spp.</i> empregadas neste estudo.....	49
Figura 6. Avaliação das alterações morfológicas durante cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. tarentolae</i> e <i>L. infantum</i> por citometria de fluxo.....	50
Figura 7. <i>Western blot</i> de LPG purificado e de extrato protéico.....	52
Figura 8. Avaliação do perfil e da atividade de proteases secretadas e intracelulares de <i>L. tarentolae</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	54
Figura 9. Avaliação da susceptibilidade de <i>L. tarentolae</i> e <i>L. infantum</i> ao sistema complemento.....	55
Figura 10. Análise de componentes principais construído com os <i>features</i> obtidos pelo GC-MS na presença dos QCs.....	56
Figura 11. Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais classificando as replicatas em espécies.....	57
Figura 12. Classificação bioquímica dos compostos identificados por GC-MS.....	58
Figura 13. Avaliação do perfil metabólico das diferentes espécies de <i>Leishmania</i> por <i>Heatmap</i> .....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies patogênicas de <i>Leishmania</i> .....	18
Tabela 2. Espécies pertencentes ao subgênero <i>Sauroleishmania</i> .....	19
Tabela 3. Constituição do genoma de <i>Leishmania spp.</i> .....	31
Tabela 4. Porcentagem de aglutinação de promastigotas de <i>L. tarentolae</i> em fase logarítmica e estacionária induzida pelas lectinas de <i>Triticum vulgare</i> e <i>Canavalia ensiformis</i> .....	51
Tabela 5. Metabólitos identificados por GC-MS e sua abundância iônica média em cada espécie de <i>Leishmania</i> .....	61
Tabela 6. Vias enriquecidas no MBRole com significância estatística em cada par de comparação.....	63
Tabela 7. Metabólitos identificados por GC/MS cuja expressão variou em pelo menos 50% de intensidade entre duas espécies.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AP-1	Proteína ativadora 1
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CE-MS	Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CP	Cisteíno-protease
CPA	Cisteíno-protease tipo A
CPB	Cisteíno-protease tipo B
CPC	Cisteíno-protease tipo C
DHFR-TS	Diidrofolato redutase/timidilato sintase
eV	Elétron-volt
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GIPLs	Glicoinositolfosfolipídeos
gp63	Glicoproteína de 63 kDa/Leishmanolisina
HPA	<i>Hide powder azure</i>
HSP70	Proteína de choque térmico 70
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilodalton
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LMC	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
m	Metro
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mM	Milimolar

mRNA	RNA mensageiro
m/z	Massa/carga
NM	Novo mundo
NMR	Ressonância nuclear magnética
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
OPLS	Projeção Ortogonal de Estrutura Latente
ORF	Fase de leitura aberta
P27	Proteína de superfície mitocondrial
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise de componentes principais
PI	Iodeto de propídeo
PLS-DA	Método de mínimos quadrados parciais
pmol	Picomol
PPG	Proteofosfoglicano
ppm	Partes por milhão
PSA-2	Antígeno 2 da superfície dos parasitos
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PCR	Reação em cadeia de polimerase
QC	Controle de qualidade
RFLP	Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA/ transcriptomas
rpm	Rotações por minuto
sAP	Fosfatase ácida secretada
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STAT-1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
TCMS	Trimetilclorosilano
VM	Velho mundo
WGA	Lectina de <i>Triticum vulgare</i>
U	Unidades
Uba5	Enzima ativadora de ubiquitina tipo E1
UTR	Região não-traduzida
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro

°C

Graus Celsius

## RESUMO

*Leishmania tarentolae* é uma espécie incapaz de causar doença, mesmo em indivíduos severamente imunocomprometidos. Esta espécie infecta répteis e representa um importante modelo para estudo da biologia do gênero *Leishmania*, uma vez que compartilha ancestral comum com as espécies patogênicas. *L. tarentolae* possui alto potencial biotecnológico e tem sido utilizada na produção de proteínas recombinantes e vacinas. Contudo, diversos aspectos de sua biologia são desconhecidos, como a presença de LPG, atividade de proteases, sensibilidade ao complemento e se formas metacíclicas são formadas. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar aspectos da biologia de *L. tarentolae*, utilizando metodologias moleculares e bioquímicas. Para tal, foram utilizadas a cepa LV-414 de *L. tarentolae*, *L. amazonensis* PH8, *L. major* Friedlin e *L. braziliensis* M2904. A ocorrência de metaciclogênese em *L. tarentolae* foi avaliada comparando promastigotas em fase logarítmica e em fase estacionária por citometria de fluxo e avaliação de alterações na composição de carboidratos de membrana por aglutinação com lectinas. Pequena quantidade de células pequenas pôde ser identificada e se manteve constante ao longo do cultivo. As lectinas de *Concanavalia ensiformis* e *Triticum vulgare* induziram a mesma porcentagem de aglutinação de promastigotas logarítmicas e estacionárias. A presença de LPG nestes parasitos foi analisada em extrato protéico total e extrato purificado por *western blotting* utilizando os anticorpos CA7AE e WIC 79.3. Nenhuma reatividade dos anticorpos ao extrato purificado foi visualizada, mas uma banda entre 100-130 kDa foi percebida no extrato protéico total. O desaparecimento das bandas, após o tratamento com proteinase K confirmou a interação de proteínas glicosiladas com o anticorpo CA7AE. O perfil de proteases intracelulares e secretadas de *L. tarentolae* foi analisado por ensaio de zimografia. Nenhuma protease foi detectada nesta espécie nas condições testadas, em oposição à *L. amazonensis*, que apresentou atividade proteolítica no extrato protéico e no sobrenadante da cultura. A susceptibilidade de *L. tarentolae* ao sistema complemento humano foi avaliada em comparação à *L. infantum*. *L. tarentolae* foi altamente susceptível ao complemento, nas fases logarítmica e estacionária. O perfil metabólico de *L. tarentolae* na fase estacionária foi analisado por GC-MS, diferindo nitidamente do perfil das espécies patogênicas, exibindo menor abundância e/ou a ausência de diversos metabólitos relacionados às vias de biossíntese de purinas, pirimidinas, via das pentoses-fosfato, glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Esse estudo permitiu caracterizar vários aspectos da biologia e do metabolismo de *L. tarentolae* para melhor utilização como modelo para estudos de genômica funcional, identificação de fatores de virulência, desenvolvimento de vacinas e de novos alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** *L. tarentolae*; não-patogênica; promastigotas metacíclicas; metabolômica; diversidade molecular.



## ABSTRACT

*Leishmania tarentolae* is a species incapable of causing disease, even in severely immunocompromised individuals. This species infects reptiles and represents an important model for studying the biology of the genus *Leishmania*, since it shares a common ancestor with the pathogenic species. *L. tarentolae* has high biotechnological potential and has been widely used in the production of recombinant proteins and vaccines. Though several aspects regarding its own biology are unknown, including the presence of LPG, protease activity, sensitivity to complement and whether metacyclic forms are formed. Thus, the aim of the present study was to characterize biological aspects of *L. tarentolae*, using molecular and biochemical methodologies. The strains used in this study were *L. tarentolae* LV-414, *L. amazonensis* PH8, *L. major* Friedlin and *L. braziliensis* M2904. Metacyclogenesis in *L. tarentolae* was evaluated by comparing promastigotes in logarithmic and stationary phase by flow cytometry and by assessing the occurrence of changes in the composition of membrane carbohydrates by agglutination with lectins. Only a little percentage of small cells could be identified and their amount remained constant throughout the culture. The lectins from *Concanavalia ensiformis* and *Triticum vulgare* induced same percentage of agglutination of logarithmic and stationary promastigotes. The presence of LPG in these parasites was evaluated using total protein extract and purified extract by western blotting using CA7AE and WIC 79.3 monoclonal antibodies. No antibody reactivity against purified extract was visualized, yet a band between 100-130 kDa was detected in the total protein extract. Disappearance of the bands after treatment with proteinase K confirmed the interaction of glycosylated proteins with CA7AE antibody. The profile of intracellular and secreted protease of *L. tarentolae* was analyzed by zymography assay. No proteases were detected in this species under the tested conditions, as opposed to *L. amazonensis*, which showed proteolytic activity both in the protein extract and culture supernatant. The sensitivity of *L. tarentolae* to the human complement system was evaluated in comparison to *L. infantum*. *L. tarentolae* was highly susceptible to complement in logarithmic and stationary phases of growth. The metabolic profile of *L. tarentolae* in the stationary phase was analyzed by GC-M and marked differences were seen among the profile of metabolites of the non-pathogenic and the pathogenic species, exhibiting lower abundance and/or absence of several metabolites related to the biosynthesis pathways of purines, pyrimidines, pentoses-phosphate pathway, glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. This study contributed to the characterization of several aspects of the biology and metabolism of *L. tarentolae*, improving the application of these parasites as a model for studies of functional genomics, identification of virulence factors, development of vaccines and therapeutic targets.

**Keywords:** *L. tarentolae*; non-pathogenic; metacyclic promastigotes; metabolomics; molecular diversity.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Leishmania* spp. e as leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas, de caráter infecto-parasitárias, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae). Aproximadamente 21 espécies de *Leishmania*, presentes nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, são consideradas patogênicas (HERWALDT, 1999; MURRAY et al., 2005)

As espécies que infectam humanos e outros mamíferos são diferenciadas de acordo com o local de desenvolvimento no trato digestivo do inseto vetor em dois subgêneros (tabela 1), *Leishmania* (*Leishmania*), quando o desenvolvimento se dá no intestino anterior e médio, e *Leishmania* (*Viannia*), quando o desenvolvimento ocorre no intestino posterior (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). O homem é um hospedeiro acidental e outros animais são considerados hospedeiros primários, incluindo animais silvestres, como roedores, canídeos selvagens, preguiças, porcos, gambás e guaxinins. Entre os animais domésticos, os cães são os animais mais importantes para epidemiologia da doença (HERWALDT, 1999; DAWIT, 2013; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Por outro lado, em locais onde a transmissão das leishmanioses ocorre de modo antroponótico, por exemplo, Nepal, Bangladesh e Índia (particularmente no estado de Bihar), o homem representa o único reservatório dos parasitos (HERWALDT; 1999; DESJEUX, 2001; 2004).

Algumas espécies de *Leishmania* infectam répteis e não são patogênicas para humanos (Tabela 2). A classificação destes parasitos no gênero *Leishmania* é controversa, principalmente devido ao fato de que amastigotas intracelulares em répteis são raramente observadas (SIMPSON; HOLZJR, 1988). No entanto, estudos de filogenia molecular apresentaram evidências que indicam que as espécies do subgênero *Sauroleishmania* evoluíram das espécies de *Leishmania* que parasitam mamíferos (CROAN; MORRISON; ELLIS, 1997; ORLANDO et al., 2002).

As espécies que infectam répteis podem servir como um modelo útil para o estudo da bioquímica e biologia molecular do gênero *Leishmania*. Estudos comparativos entre as espécies patogênicas e não-patogênicas são cruciais para auxiliar no entendimento da virulência e dos mecanismos moleculares envolvidos na interação parasito-hospedeiro (NOYES et al., 1998; MIZBANI et al., 2011). Além disso, estes parasitos tem um alto potencial na busca por novos quimioterápicos por apresentarem sensibilidade equiparável às espécies patogênicas, bem como a existência de sistema de expressão bem estabelecidos e o baixo risco de reversão para virulência podem permitir a utilização destes organismos para produção de uma vacina recombinante eficaz na prevenção das leishmanioses ( TAYLOR et al., 2010; MIZBANI et al., 2011; PINEDA et al., 2016).

**Tabela 1 - Espécies patogênicas de *Leishmania***

Subgênero	Espécie	Patologia	Localização	Ciclo de transmissão
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	LC, LCD	VM	Zoonótico
	<i>L. amazonensis</i>	LC, LCD, LMC	NM	Zoonótico
	<i>L. donovani</i>	LV, LDPC, LC	VM	Zoonótico/ antroponótico
	<i>L. infantum</i>	LV, LC	VM e NM	Zoonótico
	<i>L. major</i>	LC	VM	Zoonótico
	<i>L. mexicana</i>	LC, LCD	NM	Zoonótico
	<i>L. tropica</i>	LC, LV	VM	Zoonótico/ antroponótico
	<i>L. venezuelensis</i>	LC	NM	Zoonótico
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LMC	NM	Zoonótico
	<i>L. guyanensis</i>	LC, LMC	NM	Zoonótico
<i>Viannia</i>	<i>L. lainsoni</i>	LC	NM	Zoonótico
	<i>L. lindenbergi</i>	LC	NM	Zoonótico
	<i>L. panamensis</i>	LC, LMC	NM	Zoonótico
	<i>L. naiffi</i>	LC	NM	Zoonótico
	<i>L. peruviana</i>	LC, LMC	NM	Zoonótico
	<i>L. shawi</i>	LC	NM	Zoonótico
	<i>L. colombiense</i>	LC	NM	Zoonótico

Distribuição geográfica, ciclo de transmissão e patologias causadas pelas espécies patogênicas de *Leishmania*. Legendas: VM: velho mundo; NM: novo mundo; LC: leishmaniose cutânea; LV: leishmaniose visceral; LMC: leishmaniose mucosa; LCD: leishmaniose cutânea difusa; LDPC: leishmaniose dérmica pós-calazar. Fonte: REITHINGER *et al.*, 2007; AKHOUNDI *et al.*, 2016 (adaptado).

## 1.2 Ciclo biológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteroxênico, de modo que as diferentes formas do parasito se alternam entre os insetos vetores e os hospedeiros vertebrados. Os vetores naturais são fêmeas de flebotomídeos, pertencentes à família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Cerca de 30 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Velho e Novo Mundo, respectivamente (SACKS; KAMHAWI, 2001; DESJEUX, 2004).

Duas formas principais são encontradas no ciclo biológico da *Leishmania*, as promastigotas e as amastigotas (SILVA-ALMEIDA *et al.*, 2012). As promastigotas habitam o trato digestivo do inseto vetor, possuem formato alongado e são flageladas. Estas formas podem ser subdivididas em promastigotas procíclicas que multiplicam no intestino dos mosquitos e em promastigotas metacíclicas infectivas, não-replicativas, que são encontradas no aparato bucal e porção anterior do intestino do vetor (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; SACKS; KAMHAWI, 2001). As formas amastigotas desenvolvem-se no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos do hospedeiro vertebrado, são arredondadas ou ovais, o flagelo apresenta-se encurtado e restrito à bolsa flagelar, por isso são imóveis (SILVA-ALMEIDA *et al.*, 2012).

**Tabela 2 - Espécies pertencentes ao subgênero *Sauroleishmania***

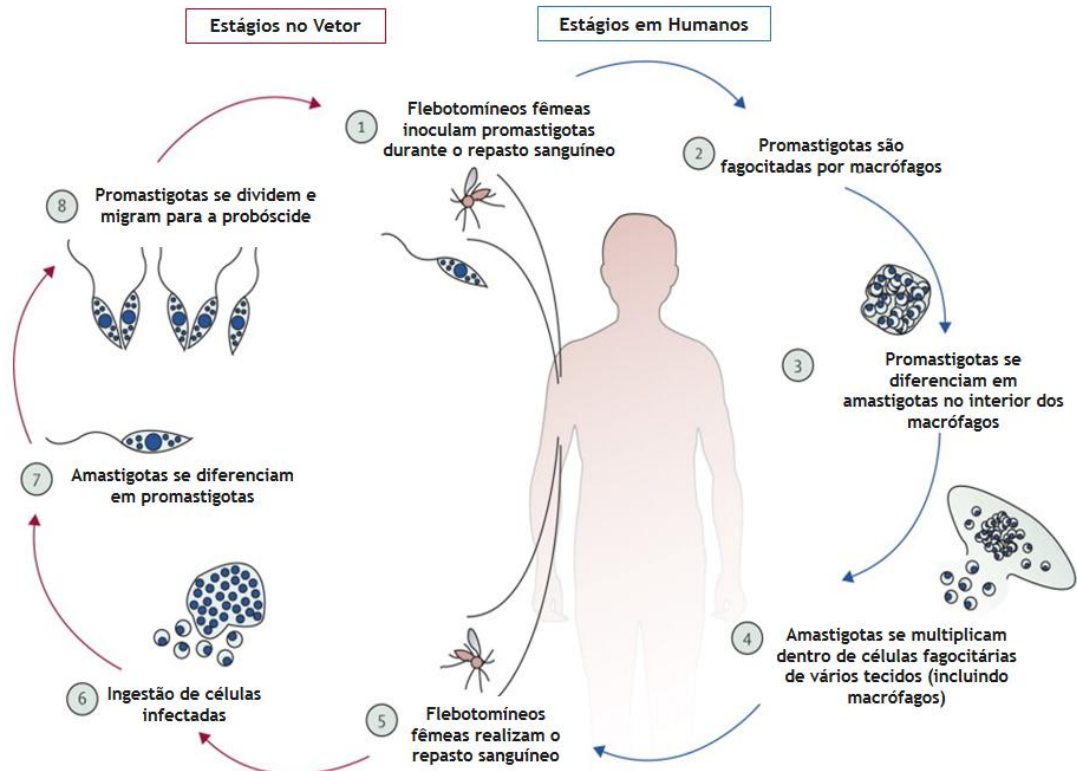
<b>Espécie</b>	<b>Vetor</b>	<b>Distribuição</b>
<i>L. adleri</i>	<i>S. (Si.) clydei</i> , <i>S. (S.) dentata</i>	Irã, Quênia
<i>L. agamae</i>	<i>P. (Pa.) caucasicus</i> , <i>P. (P.) papatasi</i> , <i>S. (S.) sintoni</i>	Palestina, Líbano, Turquemenistão, Israel, Mediterrâneo Oriental
<i>L. ceramodactyli</i>	<i>P. (Pa.) caucasicus</i> , <i>P. (P.) papatasi</i> , <i>S. (S.) sintoni</i>	Sudão, Iraque, Mediterrâneo Oriental, Turquemenistão
<i>L. chameleonis</i>	Desconhecido	Egito, Israel
<i>L. davidi</i>	Desconhecido	África Central
<i>L. gulikae</i>	Desconhecido	Turquemenistão
<i>L. gymnodactyli</i>	<i>P. (Pa.) caucasicus</i> , <i>S. (Si.) clydei</i> , <i>S. (S.) dentata</i> , <i>P. (P.) papatasi</i> , <i>S. (S.) sintoni</i>	Sudão, Irã, Turquemenistão
<i>L. helioscopi</i>	Desconhecido	Turquemenistão
<i>L. hemidactyli</i>	Desconhecido	Índia
<i>L. henrici</i>	Desconhecido	Martinica
<i>L. hoogstraali</i>	<i>S. (Si.) clydei</i>	Sudão, Senegal
<i>L. nicollei</i>	Desconhecido	Turquemenistão
<i>L. phrynocephali</i>	Desconhecido	Turquemenistão
<i>L. platycephala</i>	Desconhecido	Tanzânia
<i>L. senegalensis</i>	<i>S. (S.) dubia</i>	Senegal
<i>L. sofieffi</i>	Desconhecido	Rússia
<i>L. tarentolae</i>	<i>S. (S.) antennata</i> , <i>S. (S.) minuta</i> , <i>P. (P.) papatasi</i>	Norte da África, Malta, Algéria, Sudão, Itália, França
<i>L. zmeevi</i>	<i>S. (S.) arpaklensis</i> , <i>P. (P.) papatasi</i>	Turquemenistão
<i>L. zuckermani</i>	Desconhecido	Sul da África, Sudão
<i>L. (S.) sp. I</i>	Desconhecido	Paquistão
<i>L. (S.) sp. II</i>	Desconhecido	Paquistão

Espécies pertencentes ao subgênero *Sauroleishmania*, sua distribuição geográfica e seus respectivos vetores. Legendas: *P.* *Phlebotomus*; *Pa.* *Paraphlebotomus*; *S.* *Sergentomyia*; *Si.* *Sintonius*. Fonte: AKHOUNDI *et al.*, 2016 (adaptado).

A infecção se inicia quando fêmeas infectadas de flebotomíneos inoculam promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (Figura 1). A lesão tecidual resultante da picada induz um processo inflamatório local, no qual um intenso recrutamento de neutrófilos é observado (PETERS *et al.*, 2009). Os neutrófilos constituem a primeira célula hospedeira para uma alta parcela dos parasitos (PETERS *et al.*, 2009). Evidências obtidas em experimentos realizados com *L. major* sugerem que os parasitos são capazes de sobreviver no interior destes granulócitos, utilizando estas células como esconderijo no período inicial da infecção, durante a transição para o estágio adaptado para sobrevivência nos macrófagos (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; PETERS *et al.*, 2009).

A depleção dos neutrófilos em um modelo de infecção por *L. major* demonstrou uma redução significativa no número de parasitos viáveis no local da inoculação e do número de *Leishmanias* recuperadas após 1 a 4 semanas de infecção (PETERS *et al.*, 2009). Durante a infecção dos neutrófilos, os parasitos retardam a apoptose espontânea destes granulócitos, que tornam-se apoptóticos cerca de 2-3 dias após a infecção. A exposição de moléculas sinalizadoras na membrana, como fosfatidilserina, resulta na fagocitose dos neutrófilos apoptóticos infectados pelos macrófagos. A ingestão de células em apoptose é

uma atividade rotineira dos macrófagos e não ativa os mecanismos de defesa contra microrganismos. Além disso, a ausência de interação física direta entre os macrófagos e os protozoários também previne a ativação dos mecanismos microbicidas (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).



**Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.** Durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, promastigotas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado (1). Estas formas podem invadir ativamente ou serem fagocitadas por células hospedeiras (2). No interior dos fagolisossomos, diferenciam-se em amastigotas (3), que se multiplicam, levando à ruptura da célula hospedeira. No meio extracelular, as amastigotas são fagocitadas, infectando novas células (4). Quando um novo inseto se alimenta do hospedeiro infectado (5), ingere sangue contendo células infectadas com *Leishmania* (6). As amastigotas diferenciam-se em promastigotas no interior do intestino do vetor (7), onde se dividem e se transformam em promastigotas metacíclicas, que migram para probóscide do inseto (8), e serão transmitidas durante o próximo repasto sanguíneo. Fonte: REITHINGER *et al.*, 2007.

As amastigotas multiplicam-se continuamente no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos. O mecanismo pelo qual as amastigotas são liberadas dos macrófagos para o meio extracelular é ainda desconhecido. O processo de transferência das amastigotas de células infectadas para as células vizinhas pode variar de acordo com a espécie e pode estar relacionado à cronicidade da infecção. Os mecanismos de transmissão podem ocorrer por meio da (1) liberação dos parasitos em consequência de morte celular e rompimento dos compartimentos membranares; (2) fagocitose de células apoptóticas infectadas sem rupturas. Um estudo recente demonstrou a indução da apoptose de macrófagos infectados

por *L. amazonensis*, levando à exposição de fosfatidilserina e a consequente fagocitose por outros macrófagos (DAMATA *et al.*, 2015). Em contrapartida, macrófagos infectados com *L. guyanensis* parecem morrer por necrose, e a infecção é mais amena do que por *L. amazonensis*; (3) exocitose dos parasitos no interior de estruturas membranosas na ausência de morte celular e; (4) extrusão a partir de células em morte celular (DAMATA *et al.*, 2015). Real e colaboradores (2014) demonstraram que diante da iminência da apoptose, os macrófagos infectados com *L. amazonensis* emitem sinais que promovem a transferência das amastigotas por meio de estruturas zeióticas contendo componentes da membrana lisossomos.

As promastigotas metacíclicas perdem sua capacidade de adesão ao epitélio intestinal devido a alterações estruturais nos lipofosfolícanos (LPG), migrando para a porção intestinal anterior e probóscide, permitindo que estas formas sejam inoculadas no hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sanguíneo do inseto vetor, concluindo o ciclo biológico da *Leishmania* (SACKS; KAMHAWI, 2001; TURCO; SPÄTH; BEVERLEY, 2001).

A transmissão da leishmaniose visceral pode ocorrer também através de outros mecanismos raros, que incluem a transfusão sanguínea, transplante de órgãos, o compartilhamento de agulhas contaminadas por usuários de drogas injetáveis, acidentes laboratoriais e transmissão congênita (CRUZ *et al.*, 2002; HARHAY *et al.*, 2011; HERWALDT, 1999; PAGLIANO *et al.*, 2005).

### 1.3 As leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças caracterizadas por ampla diversidade clínica. Apesar da espécie da *Leishmania* ser o principal determinante do tipo de patologia, o estado imunológico e *background* genético do hospedeiro vertebrado e a espécie do inseto vetor também podem influenciar o desfecho da infecção (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013; MURRAY *et al.*, 2005; VOLF *et al.*, 2014).

As leishmanioses podem ser classificadas em dois tipos principais: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LT ainda pode ser subdividida em leishmaniose cutânea localizada, difusa e disseminada e em leishmaniose mucosa (GOTO; LINDOSO, 2012). Fatores como estado imunológico e susceptibilidade genética do hospedeiro desempenham papel crítico no desfecho da infecção, entretanto, o fator determinante parece ser a espécie de *Leishmania* (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006; MURRAY *et al.*, 2005; ROGERS *et al.*, 2011). Contudo, pouco se sabe sobre as diferenças moleculares intra- e interespecíficas associadas com as diferentes patologias e tropismos teciduais.

### **1.3.1 Leishmaniose cutânea**

Na leishmaniose cutânea, os pacientes apresentam lesões ulcerativas ou nodulares, normalmente localizadas em regiões expostas do corpo, como o rosto, braço e pernas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A manifestação inicial da infecção é um eritema no local da picada, que progride para uma pápula, seguida por um nódulo que ulcera gradativamente (REITHINGER *et al.*, 2007). Lesões satélites e linfadenopatia localizada podem estar presentes em alguns casos da doença (DAVID; CRAFT, 2009). A cura espontânea da úlcera pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes, deixando cicatrizes permanentes e conferindo proteção duradoura contra reinfecção pela mesma espécie e/ou infecção por outras espécies de *Leishmania spp* (CHAPPUIS *et al.*, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007). Nas américas, a LC é causada pelas espécies *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis*, enquanto que no Velho Mundo é causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* (MURRAY *et al.*, 2005).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma variante anérgica rara de LC, descrita em diferentes regiões das Américas do Sul e Central, Etiópia e Quênia ( REITHINGER *et al.*, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012). Esta forma é caracterizada pela presença de múltiplos nódulos, pápulas ou tubérculos não-ulcerativos altamente parasitados (GOTO; LINDOSO, 2012). O tratamento de LCD é complicado e não ocorre cura espontânea (REITHINGER *et al.*, 2007).

### **1.3.2 Leishmaniose mucosa**

A leishmaniose mucosa usualmente ocorre meses ou anos após a resolução da leishmaniose cutânea, porém eventualmente ambas as manifestações podem ocorrer simultaneamente (MURRAY *et al.*, 2005; REITHINGER *et al.*, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012) . Os sinais iniciais são eritema e ulcerações nas narinas, seguido por perfuração do septo nasal. Em determinados casos, o acometimento dos lábios, bochechas, palato mole, faringe e laringe é observado (REITHINGER *et al.*, 2007). As lesões podem resultar em desfiguração facial e, por consequência, produzir estigma social (MURRAY *et al.*, 2005; REITHINGER *et al.*, 2007). Embora LMC também possa ser causada por *L. amazonensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, a maioria dos casos está associada com *L. braziliensis* (CHAPPUIS *et al.*, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012).

### **1.3.3 Leishmaniose visceral**

Leishmaniose visceral ou calazar é uma doença sistêmica e a forma mais severa dentre as leishmanioses. A LV é causada por *L. donovani* na África e Ásia e na região do

Mediterrâneo, sudoeste e centro da Ásia e América do Sul é causada por *L. infantum* (também denominada *L. chagasi* ou *L. infantum chagasi*) (MURRAY *et al.*, 2005).

As manifestações da LV iniciam após um período de incubação variável. Os pacientes tipicamente apresentam febre, fadiga, fraqueza, perda de peso, esplenomegalia proeminente e hepatomegalia. Anemia, trombocitopenia e neutropenia são achados frequentes, que decorrem da supressão medular e do sequestro esplênico (CHAPPUIS *et al.*, 2007; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Na ausência de tratamento, os indivíduos desenvolvem pancitopenia e estão propensos a infecções secundárias, sangramentos intensos e anemia severa, podendo chegar ao óbito (MURRAY *et al.*, 2005; CHAPPUIS *et al.*, 2007; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O aparecimento de lesões maculares difusas, maculopapulares ou nodulares em um subgrupo de indivíduos após o tratamento efetivo da LV é um quadro característico da leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC). Esta complicação é considerada um indício do restabelecimento da imunidade celular contra o parasito. LDPC é comumente observada no Sudão e, mais raramente, na Índia (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). As lesões cutâneas geralmente apresentam um número significativo de parasitos e, por esse motivo, estes pacientes atuam como reservatórios, contribuindo com a transmissão da doença (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

#### **1.4 Epidemiologia das leishmanioses**

A transmissão das leishmanioses ocorre de forma endêmica em 98 países e 3 territórios, localizados na Ásia, África, Europa e Américas (ALVAR *et al.*, 2012). Estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção por *Leishmania spp* (WHO, 2010). Aproximadamente 58.000 casos de LV e 220.000 casos de LC são registrados oficialmente a cada ano. No entanto, devido a muitos casos não serem notificados, é estimado que ocorram cerca de 200.000 a 400.000 casos de LV e 700.000 a 1.000.000 de casos de LC anualmente (ALVAR *et al.*, 2012).

O Brasil está entre os países com maior incidência anual de LV e LC, apresentando uma média anual de 3.481 casos reportados de LV e de 26.008 de LC. Entretanto, em decorrência de uma parcela significativa dos casos não ser notificada, estima-se uma incidência anual no país de 72.800 a 119.600 casos da forma cutânea e de 4.200 a 6.300 da forma visceral (ALVAR *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços para controlar as leishmanioses, a incidência e a distribuição dessas doenças estão aumentando, devido a fatores antrópicos, como o desflorestamento, a urbanização desordenada, a migração e o aumento da susceptibilidade a infecções associadas com imunossupressão e desnutrição (DESJEUX, 2001, 2004). Em locais onde a



transmissão da LV ocorre de forma zoonótica, a presença de cães no ambiente doméstico está associada com o aumento da incidência da doença, haja vista que estes animais são considerados os principais reservatórios nas áreas urbanas (BELO *et al.*, 2013; HARHAY *et al.*, 2011). O aquecimento global é um fator ambiental que pode estar associado com um possível aumento da área transmissão dos parasitos pelo inseto vetor e, conseqüentemente, da população em risco de infecção (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010).

### **1.5 Fatores de Virulência em *Leishmania spp.***

Os fatores de virulência são componentes dos parasitos que favorecem sua invasão no hospedeiro e o estabelecimento da infecção, de modo a contribuir com sua patogenicidade (MATLASHEWSKI, 2001). O gênero *Leishmania* apresenta ampla diversidade destes fatores, que podem variar de acordo com a espécie e o tipo de hospedeiro (TURCO; SPÄTH; BEVERLEY, 2001). Dentre estes elementos, a metaloprotease gp63, os lipofosfoglicanos (LPG), proteofosfoglicanos (PPG), glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs), A2 e as cisteíno-proteases são os mais estudados.

#### **1.5.1 Lipofosfoglicano**

O lipofosfoglicano é o glicoconjugado de superfície mais abundante em promastigotas. Esta macromolécula é composta por uma âncora de glicosilfostadilinositol (âncora GPI), uma porção central formada por um heptassacarídeo unida à uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados (Gal $\beta$ 1, 4Man-PO $_4$ ) e terminada por um pequeno oligossacarídeo denominado “cap” (OLIVIER *et al.*, 2012).

O LPG é um fator de virulência multifuncional, que desempenha um papel proeminente nas fases iniciais da infecção no hospedeiro vertebrado e na sobrevivência das promastigotas no vetor (ILG, THOMAS, 2000; MATLASHEWSKI, 2001; OLIVIER *et al.*, 2012). A importância do LPG na infecção foi demonstrada em ensaios utilizando parasitos mutantes de *L. major* deficientes do gene *lpg1*, que codifica uma galactofuranosiltransferase, uma enzima necessária para a síntese da porção central do lipofosfoglicano. Estes mutantes apresentam virulência atenuada, sendo susceptíveis ao sistema do complemento e aos oxidantes produzidos pelas células hospedeiras, além de não possuírem a habilidade de inibir a fusão dos fagossomos aos lisossomos (SPÄTH *et al.*, 2003).

No inseto vetor, o LPG está implicado na adesão das promastigotas ao epitélio intestinal, o que impede a eliminação do parasito durante a excreção do sangue digerido e, juntamente com outros fosfoglicanos, protege estes organismos da ação de enzimas digestivas (SACKS *et al.*, 2000). O LPG sofre modificações estruturais durante a metaciclogênese que levam à perda da habilidade das promastigotas de se ligarem ao

intestino, permitindo a liberação das formas infectivas no repasto sanguíneo (TURCO; SPÄTH; BEVERLEY, 2001).

Análises estruturais de LPG de diferentes espécies de *Leishmania* revelaram a ocorrência de polimorfismos intra- e interespecíficos, que estão relacionados com a especificidade dos parasitos a vetores distintos (DE ASSIS *et al.*, 2012). A similaridade observada na estrutura do lipofosfoglicano de *L. major* e *L. turanica*, por exemplo, pode estar relacionada à capacidade de ambas as espécies se ligarem ao intestino de *P. papatasi* (VOLF *et al.*, 2014). A âncora glicolípídica e a porção central de glicano se mantêm conservadas nas diferentes espécies, enquanto que a estrutura e a composição dos açúcares, das cadeias laterais e do *cap* são variáveis (DESCOTEAUX; TURCO, 2002).

### **1.5.2 Cisteíno-proteases (CPs)**

As cisteíno-proteases são fatores de virulência prevalentes em espécies do complexo *L. mexicana* (SILVA-ALMEIDA *et al.*, 2012). CPA, CPB e CPC são proteases mais estudadas deste grupo. Evidências da importância das CPBs como um dos principais fatores de virulência de espécies do complexo *L. mexicana* são provenientes de experimentos utilizando parasitos geneticamente modificados, nos quais os genes codificadores de CPA e/ou CPB foram deletados. Nestes estudos foi observado que as cepas incapazes de produzir CPB apresentam virulência reduzida, produzindo lesões pequenas e de progressão lenta e induzem a alteração do perfil de resposta de Th1 para Th2 (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998). O CPB de *L. mexicana* também está envolvido na degradação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e na inibição de STAT-1 e AP-1, impedindo sua translocação para o núcleo e, desse modo, comprometendo a síntese de NO pelos macrófagos em resposta ao IFN- $\gamma$  (ABU-DAYYEH *et al.*, 2010).

Amastigotas de *L. amazonensis* internalizam moléculas de MHC de classe II sintetizadas pelas células hospedeiras e promovem sua degradação nos megassomos. A participação das cisteíno-proteases neste processo foi demonstrada através do uso de inibidores de CPs que previnem a clivagem destes complexos e, conseqüentemente, acumulam no interior dos parasitos. Estas observações evidenciam o envolvimento das CPs na inibição da apresentação de antígeno (LEAO *et al.*, 1995).

### **1.5.3 gp63**

gp63 é uma metaloprotease de 63 kDa dependente de zinco presente na membrana de *Leishmania* (SEAY; HEARD; CHAUDHURI, 1996). Estas moléculas são as proteínas de superfície mais abundantes em promastigotas, enquanto que são expressas em níveis reduzidos em amastigotas (SCHNEIDER *et al.*, 1992). A presença de gp63 em ambas as

formas biológicas dos parasitos sugere que esta protease desempenhe funções diferentes de acordo com o estágio de desenvolvimento (OLIVIER *et al.*, 2012). Em promastigotas, gp63 está envolvida na evasão ao sistema de complemento e favorece a migração dos parasitos através da matriz extracelular, possivelmente pela degradação de fibronectina e colágeno tipo IV, como demonstrado em experimentos *in vitro* utilizando matrigel (MCGWIRE; CHANG; ENGMAN, 2003; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2014). Durante esta fase, a metaloprotease interage com receptores de fibronectina, auxiliando na adesão dos parasitos aos macrófagos e, possivelmente favorecendo a internalização destes protozoários pelos fagócitos (BRITTINGHAM *et al.*, 1999).

A contribuição precisa da gp63 na sobrevivência de amastigotas no interior dos macrófagos ainda é uma questão em debate (OLIVIER, MARTIN *et al.*, 2012). A diminuição da expressão de gp63 por meio do uso de RNA antisense resulta em parasitos com capacidade reduzida de sobreviver no interior de fagócitos (CHEN *et al.*, 2000). De modo adicional, experimentos realizados com lipossomos cobertos com gp63 e contendo quantidades variáveis de albumina de soro bovino marcada radioativamente, demonstraram um papel protetor do revestimento contra a degradação dessas partículas no interior dos fagolisossomos (SEAY; HEARD; CHAUDHURI, 1996). Coletivamente estes dados apontam que a gp63 desempenha um papel na sobrevivência e multiplicação das amastigotas no ambiente intracelular dos macrófagos.

### **1.6 *L. tarentolae*: uma espécie não-patogênica**

O estudo de espécies não-patogênicas, em especial a *L. tarentolae*, apresenta um alto potencial na busca por novas drogas e na produção de vacinas para o tratamento e prevenção das leishmanioses. Por exemplo, a sensibilidade às drogas leishmanicidas de amastigotas axênicas e intracelulares de *Leishmania tarentolae* é equiparável à das espécies patogênicas, o que sugere o potencial da utilização destes organismos em etapas preliminares de pesquisas por novos fármacos (TAYLOR *et al.*, 2010; PINEDA *et al.*, 2016).

Além disso, a capacidade de produzir proteínas de difícil expressão, como por exemplo, a enzima superóxido dismutase e a eritropoietina, coloca a *L. tarentolae* como uma potencial plataforma de produção de proteínas. A facilidade de manipulação genética, a possibilidade de produção em larga escala e, em especial, a habilidade destes organismos de realizar N-glicosilações semelhantes às produzidas por mamíferos, são as principais vantagens da utilização destes protozoários como sistema de expressão (BASILE; PETICCA, 2009; BREITLING *et al.*, 2002; NIIMI, 2012). Além disso, estes parasitos também realizam outras modificações pós-traducionais importantes para a produção de proteínas na

forma ativa, como processamento de sequências sinalizadoras, dobramento de proteínas e formação de pontes dissulfeto (BASILE; PETICCA, 2009; NIIMI, 2012).

*Leishmania tarentolae* é uma espécie pertencente ao subgênero *Sauroleishmania*, incapaz de causar doença em humanos, cujos hospedeiros naturais são pequenos lagartos (BRETON *et al.*, 2005; NOVO *et al.*, 2015). Estes parasitos foram isolados inicialmente em um geconídeo da espécie *Tarentola mauritanica* (WENYON, 1921) e, é a espécie mais estudada deste subgênero.

A distribuição geográfica desta espécie está limitada ao Velho Mundo (ORLANDO *et al.*, 2002). Estudos envolvendo infecções experimentais em espécies de lagartos do Novo Mundo demonstraram que a *L. tarentolae* é incapaz de estabelecer infecção em diversas espécies distribuídas pelas Américas. Além disso, estes parasitos não são observados em populações naturais de geconídeos encontrados nestes territórios (DOLLAHON; JANOVY, 1974).

A transmissão para os répteis pode ocorrer por meio da picada de insetos ou pela ingestão do vetor infectado (ADLER, 1962). Os vetores são insetos pertencentes ao gênero *Sergentomyia*, que se alimentam do sangue de répteis e de outros vertebrados, incluindo humanos (BATES, 2007; BRAVO-BARRIGA *et al.*, 2016).

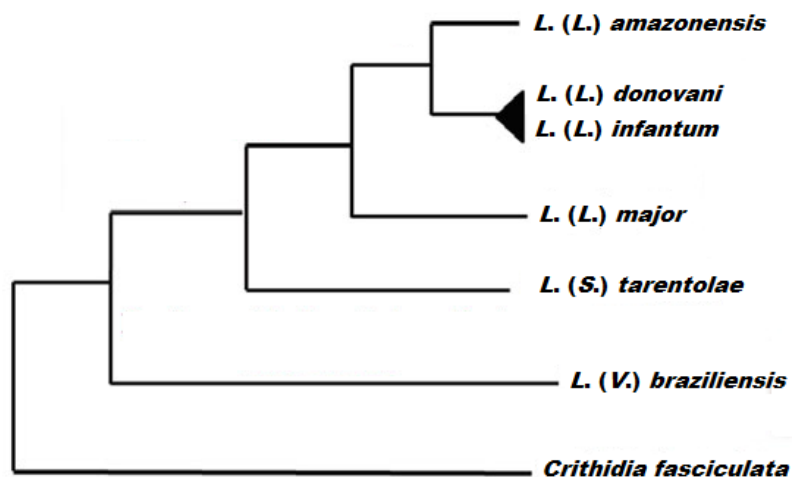
Nos lagartos, os parasitos são encontrados predominantemente como promastigotas na circulação sanguínea e no lúmen cloacal e intestinal (revisado por SIMPSON e HOLZ, 1988). Amastigotas livres ou no interior de monócitos são raramente observadas (ELWASILA, 1988; SIMPSON; HOLZJR, 1988). Não há nenhuma evidência de efeitos patológicos nos répteis infectados (TELFORD JR, 1984; ELWASILA, 1988).

A *L. tarentolae* possui a habilidade de infectar fagócitos de humanos e murinos e é capaz de se diferenciar em amastigotas no interior destas células (TAYLOR *et al.*, 2010). No entanto, é incapaz de causar doença mesmo em camundongos severamente imunocomprometidos, em decorrência dos parasitos desta espécie não conseguem persistir em células fagocitárias de mamíferos por longos períodos (BRETON *et al.*, 2005).

Um estudo recente apresentou evidências de assinaturas moleculares de *L. tarentolae* em diferentes tecidos de uma múmia brasileira do século XVIII-XIX. Embora estas observações devam ser consideradas e interpretadas com cautela, os autores sugerem a possibilidade de terem existido em um passado recente no Brasil, cepas patogênicas de *L. tarentolae* com capacidade de visceralização (NOVO *et al.*, 2015).

A inclusão das espécies de *Sauroleishmania* ao gênero *Leishmania* ainda permanece controversa, tendo em vista que poucos estudos com o intuito de solucionar esta questão tem sido realizados, pois estes parasitos ainda são considerados por muitos pesquisadores como organismos de baixa relevância clínica (MOMEN; CUPOLILLO, 2000; AKHOUNDI *et al.*, 2016). Estudos de filogenia baseado na comparação de sequências de

DNA de *L. tarentolae* e de espécies patogênicas indicam que os parasitos pertencentes à *Sauroleishmania* compartilham ancestral comum com as espécies do subgênero *Leishmania*, como demonstrado na figura 2 (CROAN; MORRISON; ELLIS, 1997; ORLANDO *et al.*, 2002). O período no qual as espécies que infectam répteis divergiram das que causam patologias em mamíferos ainda não está claro e estudos adicionais são necessários para auxiliar nesta elucidação (AKHOUNDI *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Árvore filogenética representativa das relações de parentesco de *Leishmania* spp. construída a partir da sequência codificadora da dihidrofolato redutase/timidilatosintase (DHFR-TS). As sequências de DHFR-TS de seis espécies representativas de *Leishmania* foram alinhadas. Para obtenção de uma árvore por parcimônia máxima, a sequência codificadora de *Crithidia fasciculata*, uma espécie de tripanossomatídeo monogenético, foi empregada como grupo externo. Adaptado de FERNANDES *et al.*, 2014.

Apesar de milhões de anos de divergência no gênero *Leishmania*, o genoma destes parasitos apresenta altos níveis de sintonia e de conservação do conteúdo gênico. Aproximadamente 90% dos genes da *L. tarentolae* são compartilhados com outras espécies de *Leishmania*. Sabe-se que 250 genes presentes nas espécies patogênicas estão ausentes em *L. tarentolae*, muitos dos quais são expressos especificamente por amastigotas intracelulares. A falta da expressão desses genes e/ou a presença em números variáveis de cópias pode estar associada à ausência de patogenicidade da *L. tarentolae* e com a capacidade reduzida de sobreviver no meio intracelular (RAYMOND *et al.*, 2012).

Apenas 14% dos genes exclusivos de *L. tarentolae* apresentam função putativa, incluindo uma proteína dedo de zinco C3HC4, uma malato desidrogenase, uma proteína da família OmpA (proteína da membrana externa A), uma poli(A) polimerase distinta, uma proteína contendo um motivo LA, uma fosfoinositideo quinase, entre outras (RAYMOND *et al.*, 2012)

A ausência de patogenicidade de *L. tarentolae* pode estar também associada a outros fatores, que incluem as diferenças na termofisiologia entre esta espécie e as que causam doenças em mamíferos, mudanças na sequência de aminoácidos dos fatores de

virulência presentes nestes parasitos e/ou a falta de elementos ainda não identificados (AZIZI *et al.*, 2009). Alguns fatores de virulência bem caracterizados de espécies patogênicas de *Leishmania* estão presentes em *L. tarentolae*, dentre eles, a cisteíno-protease tipo b (CPB), as proteases de superfície GP63 e amastinas. No entanto, A2 que desempenha um importante papel no tropismo e capacidade de visceralização de *L. donovani* e *L. infantum*, encontra-se ausente nesta espécie (AZIZI *et al.*, 2009). Ressalta-se que o lipofosfoglicano, um importante fator de virulência para as espécies de *Leishmania*, ainda não foi caracterizado em *L. tarentolae*.

Diversas táticas para produção de vacinas contra as leishmanioses já foram testadas, incluindo a utilização de parasitos viáveis e atenuados por métodos químicos, físicos e genéticos. Contudo, estes métodos apresentam problemas relacionados à segurança, havendo risco de ocorrência da doença nos indivíduos vacinados, a possibilidade de atenuação incompleta e de reversão dos organismos para o fenótipo de virulência, além da falta de reprodutibilidade de muitas dessas vacinas (BRETON *et al.*, 2005; MIZBANI *et al.*, 2009; SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014). A utilização de organismos não-patogênicos viáveis, como *L. tarentolae*, para produção de vacinas se apresenta como uma alternativa segura, com baixo risco de conversão para virulência (MIZBANI *et al.*, 2010). Outra vantagem do uso de *L. tarentolae* é a sua capacidade de mimetizar o curso natural da infecção, conseqüentemente, levando à produção de uma resposta imune similar à natural (BRETON *et al.*, 2005; MIZBANI *et al.*, 2009; SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014). Estes protozoários ativam células apresentadoras de antígeno, promovem a maturação de células dendríticas e a produção de IFN- $\gamma$  a partir de linfócitos T, de modo que induzem uma resposta protetora do tipo Th1 (BRETON *et al.*, 2005). Tendo em vista que estes parasitos são vetores seguros, muitos esforços tem sido feitos para sua manipulação genética, para que expressem antígenos imunodominantes de *Leishmania*, como a proteína A2 (MIZBANI *et al.*, 2009; SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014).

Apesar de *L. tarentolae* representar um importante organismo modelo para estudos da biologia de todo o gênero *Leishmania* e das suas diversas aplicações biotecnológicas, pouco se sabe a respeito da biologia destes organismos, incluindo se formas metacíclicas são produzidas, bem como informações acerca da composição e da variabilidade do proteoma e metaboloma destes parasitos em relação às espécies patogênicas ainda não foram descritas.

## **1.7 A importância das ômicas como ferramentas para o estudo da diversidade molecular de *Leishmania* spp.**

A nomenclatura "ciências ômicas" tem sido frequentemente utilizada para rotular as áreas da ciência que utilizam tecnologias experimentais de alto rendimento para produzir um grande volume de dados, como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. Os avanços dessas técnicas nos últimos anos, juntamente a uma considerável redução dos custos tem permitido a elucidação de diversas características biológicas dos parasitos, como SNPs, modificações de proteínas, alterações na expressão gênica, assinaturas metabólicas, entre outros (SOUSA; NETO; BRITO, 2013; CANTACESSI *et al.*, 2015). A integração de dados genômicos, transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos podem auxiliar na identificação de fatores moleculares interespecíficos associados aos diferentes tropismos e patologias.

### **1.7.1 Genômica comparativa entre as espécies do gênero *Leishmania***

O genoma de *Leishmania* é caracterizado por elevadas sintonia e conservação do conteúdo gênico, os genes estão organizados em unidades de transcrição policistrônicas e íntrons raramente são encontrados (ROGERS *et al.*, 2011). Do total de aproximadamente 8.300 genes, apenas poucos deles são específicos a determinada espécie de *Leishmania*, conforme demonstrado na tabela 2 (PEACOCK *et al.*, 2007; ROGERS *et al.*, 2011). A formação de pseudogenes é um importante fator envolvido nas diferenças genéticas entre as espécies, em decorrência da maior parte dos genes espécie-específicos ser resultado da deterioração da sequência codificadora nas demais espécies, levando à perda de função da proteína (PEACOCK *et al.*, 2007; SMITH; PEACOCK; CRUZ, 2007).

Os genes-espécie específicos são conservados nas cepas da mesma espécie presentes em diferentes regiões geográficas (ROGERS *et al.*, 2011). A maior parte destas sequências codifica proteínas de função desconhecidas (PEACOCK *et al.*, 2007; ROGERS *et al.*, 2011). A expressão heteróloga de genes espécies-específicos de *L. donovani* e *L. infantum* em *L. major* demonstrou que apenas alguns destes genes contribuem para a capacidade de visceralização destas espécies, como *LinJ.28.0340* e *A2* (ZHANG *et al.*, 2003; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2010). No entanto, nenhum destes genes de forma individual é capaz de promover um aumento na virulência de *L. major* de modo similar às espécies *L. donovani* e *L. infantum*, sugerindo que embora os genes exclusivos contribuam para o tropismo dos parasitos e na determinação do tipo de doença, outros fatores como número de cópias gênicas, polimorfismos e diferenças na expressão gênica também contribuem para a diversidade fenotípica (PEACOCK *et al.*, 2007; ROGERS *et al.*, 2011; VALDIVIA *et al.*, 2015; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2010).

A análise comparativa do genoma de uma cepa atípica de *L. donovani* (MON-37) do Sri Lanka, que é dividida em duas sub-cepas caracterizadas por causarem patologias distintas, leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral, revelou a presença de SNPs em regiões codificadoras e intergênicas que variam entre os isolados (ZHANG *et al.*, 2014). O gene que codifica a proteína RagC, uma pequena GTPase, é um exemplo de sequência que contém SNP que difere as sub-cepas, de forma que o isolado que causa LC apresenta uma substituição de aminoácido em homozigose (ZHANG *et al.*, 2014). A introdução do gene RagC do isolado que causa LV na outra subcepa que causa LC resulta em um significativo aumento nos níveis de infecção no baço, evidenciando o impacto de SNPs na função gênica e na determinação do fenótipo (ZHANG *et al.*, 2014; CANTACESSI *et al.*, 2015).

As análises de variações no número de cópias de genes, duplicações de arranjos em tandem e número de cópias de cromossomos revelam extensivas diferenças entre as espécies de *Leishmania*, mesmo em espécies estreitamente relacionadas, como a *L. peruviana* e a *L. braziliensis* (ROGERS *et al.*, 2011; VALDIVIA *et al.*, 2015). A aneuploidia é comum, o conteúdo cromossomal tende a variar de célula a célula, um fenômeno denominado aneuploidia em mosaico, que decorre de erros na replicação cromossomal (ROGERS *et al.*, 2011; STERKERS *et al.*, 2012). Os parasitos possivelmente utilizam este mecanismo para se adaptarem a alterações nas condições ambientais e, este processo está associado com alto grau de diversidade genômica intra-específica (STERKERS *et al.*, 2012).

**Tabela 3 - Constituição do genoma de *Leishmania* spp.**

	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. tarentolae</i>
<b>Tamanho</b>	32.855.089	32.101.728	31.997.773	32.108.741	30.440.719
<b>Número de Cromossomos</b>	36	36	35	34	36
<b>Conteúdo GC (%)</b>	59,7	59,6	57,8	59,7	57,2
<b>Genes codificadores de proteínas</b>	8412	8241	8357	8250	8201
<b>Genes espécie-específicos</b>	14	19	67	2	73

Fonte: RAYMOND *et al.*, 2011; ROGERS *et al.*, 2011 (adaptado).

Estes mecanismos permitem o aumento dos níveis transcrição, compensando a ausência de mecanismos de controle transcricional e contribuindo para a diversidade fenotípica nestes parasitos (LAFFITTE *et al.*, 2016; ROGERS *et al.*, 2011).

De modo geral, a plasticidade genômica, polimorfismos e as diferenças na dosagem gênica são fatores potenciais na variabilidade fenotípica em termos de virulência e tipo de



patologia (STERKERS *et al.*, 2012; REAL *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; CANTACESSI *et al.*, 2015).

### 1.7.2 O controle da expressão gênica e a interação parasito-hospedeiro

A regulação da expressão em *Leishmania* ocorre principalmente nos níveis pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais, devido à quase completa ausência de promotores específicos de RNA polimerase II e de fatores de transcrição (MCNICOLL *et al.*, 2006). A transcrição do genoma nestes organismos ocorre de forma policistrônica, os RNAs mensageiros (mRNA) individuais são gerados por processamento pós-transcricional, que envolve o *trans-splicing* e a poliadenilação do pré-mRNA (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; DILLON *et al.*, 2015). Durante o *trans-splicing*, uma sequência de RNA de 39 nucleotídeos, denominada *Spliced Leader RNA* (SL-RNA ou miniexon), é adicionada à porção 5' do mRNA (CLAYTON e SHAPIRA, 2007). O sítio acceptor de *splicing* canônico é o dinucleotídeo AG antecedido por um trato de polipirimidina (CLAYTON e SHAPIRA, 2007; DILLON *et al.*, 2015). A poliadenilação ocorre concomitantemente ao *trans-splicing* na região 3' do mRNA (CLAYTON e SHAPIRA, 2007).

Estudos de expressão baseados em microarranjos sugerem que a maioria dos genes são expressos constitutivamente durante todas as fases do ciclo de vida dos parasitos, apresentando apenas um número limitado de genes diferencialmente expressos (~10%) entre os estágios de promastigota e amastigota (LEIFSO *et al.*, 2007; ROCHETTE *et al.*, 2008; DEPLEDGE *et al.*, 2009). Outro estudo sobre metaciclogênese usando RNA-seq revelou alterações substanciais na expressão entre os estágios de promastigotas procíclicas e metaclíclicas, com aproximadamente 3200 genes diferencialmente expressos (DILLON *et al.*, 2015). As discrepâncias no número de genes regulados no ciclo de vida de *Leishmania* observados em cada estudo podem ser decorrentes de diferenças nas técnicas empregadas. Estudos transcriptômicos baseados na utilização microarranjos apresentam algumas desvantagens que podem ter contribuído para identificação incompleta dos genes regulados, incluindo a ocorrência de artefatos de hibridização, a necessidade da utilização de grandes quantidades de RNA e restrição do número de genes incluídos nos arranjos (DILLON *et al.*, 2015).

Diferenças substanciais foram observadas no perfil de expressão de diferentes espécies de *Leishmania* por meio de análises comparativas por microarranjos. O conjunto de genes diferencialmente expressos varia de acordo com a espécie, poucos são compartilhados entre os parasitos de diferentes espécies (ROCHETTE *et al.*, 2008; DEPLEDGE *et al.*, 2009). De modo semelhante, comparações do padrão de expressão gênica dos genes que codificam A2, proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK),

antígeno de superfície dos parasitos (PSA-2), A1, proteína de membrana mitocondrial (P27) e a enzima ativadora de ubiquitina tipo E1 (Uba5) dos parasitos em tecidos de pacientes apresentando LV, LC e LDPC por PCR em tempo real demonstrou diferenças significativas em cada uma das doenças (SHARMA *et al.*, 2010). Em *L. donovani*, espécie responsável por duas das formas clínicas analisadas, LC e LDPC, foram observadas variações no perfil de expressão nos diferentes tecidos. Na LV, esta espécie apresenta altos níveis de Uba5 e A2, enquanto que em LDPC estes transcritos são observados apenas raramente; dado o papel de A2 na visceralização, a perda da sua expressão pode ser um fator facilitador da ocorrência de LDPC. Apesar da ocorrência de LC e LDPC no mesmo tecido, os níveis de PSA-2 são mais altos em *L. donovani*, ao mesmo tempo em que A1 é mais expresso em *L. tropica* (SHARMA *et al.*, 2010).

A análise da expressão gênica de macrófagos de camundongos de C57BL/6 e CBA infectados *in vitro* com *L. amazonensis* revelou diferenças substanciais nos genes que estão modulados em cada fagócito na presença do parasito, e as diferenças identificadas possivelmente estão associadas com os diferentes perfis de susceptibilidade à infecção (PROBST *et al.*, 2012). Por outro lado, uma análise comparativa do perfil transcriptômico de macrófagos infectados com *Leishmania major* e *L. amazonensis* demonstrou que apenas quatro genes são diferencialmente expressos nos fagócitos infectados com cada espécie após 4 horas de infecção (FERNANDES *et al.*, 2016). Este achado indica que apesar de haver diferenças nas apresentações clínicas e nas respostas imunes, os parasitos de diferentes espécies induzem alterações similares na expressão gênica das células infectadas (FERNANDES *et al.*, 2016).

As diferenças de expressão entre os diferentes estágios do ciclo biológico de *Leishmania* são mediadas por número de cópias de genes e por processamento pós-traducional, incluindo a taxa de degradação de mRNA (CLAYTON e SHAPIRA, 2007). A região 3' UTR parece estar envolvida na estabilidade do mRNA e na regulação da tradução (SHAPIRA *et al.*, 2001; CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

Os esforços para correlacionar os dados de expressão de mRNA e os níveis de proteínas em *Leishmania* resultaram em taxas de concordância modestas (~53%) e estas diferenças estão associadas à ausência de controle transcricional e considerável regulação nos níveis pós-transcricional, traducional e pós-traducional (MCNICOLL *et al.*, 2006; COHEN-FREUE *et al.*, 2007). Portanto, a utilização da transcriptômica isoladamente pode não ser suficiente para auxiliar na descoberta dos fatores moleculares dos parasitos envolvidos na determinação do tipo de patologia.

### 1.7.3 Proteômica

Os estudos proteômicos tem sido particularmente úteis na detecção de proteínas diferencialmente expressas durante as fases do ciclo de vida de *Leishmania*, em decorrência do modo característico de regulação da expressão dos protozoários deste gênero (MCNICOLL *et al.*, 2006; LEIFSO *et al.*, 2007; SCHELTEMA *et al.*, 2010). Contudo, apenas 36% dos cerca de 8.300 genes codificadores de proteínas possuem uma função putativa, o que dificulta a utilização da proteômica na caracterização da diversidade molecular destes organismos, sendo necessários estudos para identificação da função da maioria das ORFs para ampliar a utilização desta metodologia no estudo de *Leishmania spp* (BROBEY *et al.*, 2006; IVENS *et al.*, 2006; SCHELTEMA *et al.*, 2010).

Análises proteômicas comparativas por eletroforese bidimensional demonstram que a maioria dos *spots* apresentam similaridade na distribuição e intensidade, sendo a minoria deles expressos diferencialmente em determinada espécie (BROBEY *et al.*, 2006; HAJJARAN *et al.*, 2015). As proteínas espécies-específicas identificadas por estes estudos estão envolvidas em diversos processos biológicos, porém estudos funcionais são necessários para definir o papel dessas moléculas na patogênese, bem como a confirmação das diferenças observadas por outras metodologias, como *western blotting* (HAJJARAN *et al.*, 2015). Modificações pós-traducionais também podem ser um fator importante na determinação da virulência (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). Diferenças significativas são observadas no perfil de fosforilação de proteínas de cepas virulentas e não-virulentas de *L. donovani* em resposta ao estresse térmico, o que sugere a participação dessas alterações no estabelecimento da infecção (SALOTRA; RALHAN; SREENIVAS, 2000).

### 1.7.4 Metabolômica

A metabolômica é uma área em genômica funcional que estuda compreensivamente e qualitativamente o conjunto de metabólitos de um organismo, tecido, órgão ou célula em um determinado momento (SCHELTEMA *et al.*, 2010; PAGET *et al.*, 2013). O metaboloma é a representação mais próxima do fenótipo, visto que é no nível dos metabólitos que as respostas às modificações genéticas e às influências ambientais são observadas (FIEHN, 2002; SCHELTEMA *et al.*, 2010).

Diante da ampla diversidade de metabólitos com propriedades químicas e físicas distintas, não é possível analisar todo o metaboloma de uma amostra em um único experimento utilizando apenas um método (SCHELTEMA *et al.*, 2010). Por consequência, uma combinação de métodos de extração e de plataformas analíticas são frequentemente utilizadas, dependendo do objetivo do estudo. Dentre as plataformas analíticas mais

empregadas em estudos metabolômicos estão incluídas a ressonância nuclear magnética (NMR), a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) (PAGET *et al.*, 2013).

O GC-MS é considerado método padrão ouro na identificação de diversos compostos como lipídeos e outras biomoléculas. Esta tecnologia associa o baixo custo e facilidade operacional com uma alta sensibilidade e reprodutibilidade, além de permitir a utilização de bases de dados públicas e comerciais para identificação dos compostos (GARCIA, ANTONIA; BARBAS, 2011; PAGET *et al.*, 2013; SCHELTEMA *et al.*, 2010). Contudo, apresenta a desvantagem de que apenas compostos voláteis e termoestáveis, ou que possam ser volatilizáveis por um processo de derivatização podem ser analisados por esta técnica (CREEK *et al.*, 2012).

O potencial de estudos metabolômicos na parasitologia é particularmente relevante na elucidação de diversos aspectos da biologia dos parasitos e da sua interação com o hospedeiro, na identificação de processos metabólicos passíveis de serem alvos de medicamentos, na caracterização de adaptações no metabolismo de organismos resistentes a drogas (SCHELTEMA *et al.*, 2010; PAGET *et al.*, 2013). Desse modo, a metabolômica pode fornecer informações úteis para complementar dados de transcriptômica e proteômica, auxiliando no entendimento da complexidade molecular destes organismos.

A crescente resistência às drogas leishmanicidas disponíveis e a ocorrência de sérios efeitos colaterais representam alguns dos principais desafios no controle das leishmanioses (BRETON *et al.*, 2005; DOLSTÁLOVÁ e VOLF, 2012). Por consequência, a maioria dos estudos metabolômicos tem focado principalmente em esclarecer o mecanismo de ação das novas drogas e das já em uso e, em descobrir os mecanismos associados à resistência (T'KINDT *et al.*, 2010; BERG *et al.*, 2013).

Os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) constituíram a primeira linha de tratamento para a forma visceral de leishmaniose por aproximadamente 70 anos (CHAPPUIS *et al.*, 2007; DAWIT, 2013). Contudo, o alto custo, a ocorrência de sérios efeitos colaterais e altas taxas de resistência observadas em diversas regiões da Índia tem limitado a sua utilização na prática clínica (DESJEUX, 2001; 2004; DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2003). A utilização de uma abordagem metabolômica multiplataforma com o objetivo de identificar alterações moleculares associadas à ação dos antimoniais demonstrou que estas drogas interferem com o controle redox dos parasitos sensíveis, aumentando a susceptibilidade ao estresse oxidativo, e diminuição nos níveis de metabólitos utilizados como substratos em processos bioenergéticos também foi observada (ROJO *et al.*, 2015).

A miltefosina é uma droga oral, inicialmente desenvolvida para tratamento de tumores, que tem sido empregada como alternativa aos antimoniais. O mecanismo de ação e os associados a uma provável resistência não são completamente elucidados. Estudos metabolômicos evidenciaram um aumento gradual nos níveis de ROS intracelular nos parasitos sensíveis, possivelmente associado à disfunção mitocondrial (CANUTO *et al.*, 2014; VINCENT; BARRETT, 2015). O nível de internalização da droga é menor nos parasitos resistentes e estes organismos parecem tolerar o estresse oxidativo, em função do aumento da biossíntese de tripanotona, um importante metabólito envolvido na defesa antioxidante de *Leishmania* (CANUTO *et al.*, 2014). Durante o tratamento com miltefosina, aumentos nos níveis de açúcares e fragmentos de alcanos durante os picos de produção de ROS foram observados nos parasitos sensíveis, juntamente a sinais de danos ao DNA. Em seguida, os níveis da maioria dos metabólitos diminuí, possivelmente em decorrência do comprometimento da membrana celular e o extravasamento dos componentes intracelulares (VINCENT *et al.*, 2014).

Diante da importância da diferenciação dos parasitos em relação a alterações do perfil de susceptibilidade a drogas, alguns estudos procuram estabelecer relação entre as modificações que ocorrem durante o ciclo celular com os mecanismos de resistência (BERG *et al.*, 2013). A análise comparativa do perfil metabólico de cepas sensíveis com cepas resistentes a antimoniais pentavalentes durante o processo de diferenciação sob pressão de droga revelou diferenças significativas que estão associadas com o aumento da metaciclo gênese nos organismos resistentes (BERG *et al.*, 2013).

A metabolômica também tem sido empregada na identificação de assinaturas moleculares de alterações que ocorrem durante o ciclo celular de *Leishmania spp.* A análise metabolômica de *L. donovani* nos estágios de promastigotas procíclicas em comparação com promastigotas metacíclicas identificou uma assinatura metabólica de diferenciação com o aumento da expressão de 35 metabólitos e a diminuição de 48 metabólitos durante este processo (BERG *et al.*, 2013). Estas moléculas estão associadas à síntese de DNA, metabolismo energético e metabolismo de fosfolípidos (BERG *et al.*, 2013).

O uso da metabolômica na identificação de diferenças metabólicas intra- e interespecies de *Leishmania* que estão associadas aos diferentes tropismos e patologias ainda é bastante limitado. A utilização de uma abordagem metabolômica para auxiliar na identificação de fatores envolvidos com a capacidade de disseminação de isolados clínicos de *L. braziliensis* de sítios cutâneos para as mucosas demonstrou maior expressão de 14 metabólitos nos isolados cutâneos e 31 nos isolados de mucosa. Os metabólitos identificados estão envolvidos em diversos processos celulares, incluindo quimiotaxia e inflamação (ALVES-FERREIRA *et al.*, 2015).

A comparação do perfil metabólico de *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana* por LC-MS revelou diferenças significativas no metabolismo de aminoácidos, particularmente no consumo de triptofano e arginina (WESTROP *et al.*, 2015). Contudo, a inclusão de espécies causadoras de LMC e espécies não-patogênicas nas análises comparativas é uma lacuna que ainda necessita ser preenchida para permitir a caracterização da diversidade molecular de *Leishmania* spp.

## JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

*Leishmania tarentolae* é uma espécie não-patogênica de *Leishmania* que tem sido amplamente utilizada como organismo modelo para estudo da biologia de todo o gênero *Leishmania*, tendo em vista que compartilha ancestral comum com as espécies patogênicas. Além disso, estes parasitos apresentam importantes aplicações na biotecnologia, como plataforma para produção de proteínas recombinantes, em decorrência de sua habilidade de realizar modificações pós-traducionais semelhantes às produzidas por mamíferos, como vetores de vacinas recombinantes contra as leishmanioses e na busca por novos fármacos leishmanicidas. Apesar da sua importância biotecnológica e como organismo modelo, muitos aspectos inerentes à própria biologia de *L. tarentolae* são desconhecidos.

Para caracterização de *L. tarentolae*, utilizamos métodos moleculares e bioquímicos e análise metabolômica comparativa, uma técnica que abrange ambas as áreas de conhecimento e os dados são processados por uma abordagem de bioinformática. A escolha da metodologia se baseou na necessidade de elucidação de diversas características desta espécie, incluindo a presença de LPG, perfil proteolítico, sensibilidade ao sistema complemento, formação de promastigotas metacíclicas e determinação da composição e variabilidade do seu metaboloma em relação ao das espécies patogênicas.

Ao elucidar aspectos da biologia de *L. tarentolae* este trabalho pode auxiliar a melhorar a utilização destes parasitos como organismo modelo e como ferramenta biotecnológica. Adicionalmente, ao comparar esta espécie com as espécies causadoras de diferentes patologias, os fatores associados à interação parasito-hospedeiro e à virulência de *Leishmania spp* podem ser identificados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar aspectos inerentes à biologia de *L. tarentolae* por meio de metodologias moleculares e bioquímicas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliação da metaciclologênese *in vitro* de *L. tarentolae* por citometria de fluxo;
- Avaliação de alterações em carboidratos de membrana durante o cultivo *in vitro* de *L. tarentolae* por ensaio de aglutinação com lectinas;
- Avaliação da presença de LPG em *L. tarentolae* por *western blotting*;
- Análise da susceptibilidade de *L. tarentolae* à lise pelo sistema de complemento;
- Avaliação da atividade proteases intracelulares e secretadas por *L. tarentolae* por zimografia;
- Analisar a composição e a variabilidade do metaboloma de promastigotas em fase estacionária de *L. tarentolae* em relação à *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* por GC-MS, empregando ferramentas de bioinformática e estatística para identificação das diferenças significativas no perfil metabólico das espécies utilizadas.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Cultivo de *Leishmania*

As espécies *L. amazonensis* PH8, *L. braziliensis* M2904, *L. major* Friedlin e *L. braziliensis* H3227 utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Dra. Ângela K. Cruz do departamento de Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP, a *Leishmania infantum* PP75 foi gentilmente cedida pelo Dr. Daniel Menezes Souza do Coltec/UFMG e *L. tarentolae* LV-414 pela Dra. Norma de Melo do departamento de Parasitologia/ICB/UFMG. Os parasitos foram cultivados à 26°C em meio M199, pH 7,4, suplementado com 10% (V/V) de soro fetal bovino inativado (SFB), 2% de urina humana, 40 mM de hepes (pH 7,5), 0,1mM de Adenina, 5 mg/L de hemina, 1 mg/L de biotina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

#### 3.2 Genotipagem de *Leishmania spp* por PCR-RFLP do gene HSP70

Previamente à utilização destas cepas nos experimentos, os parasitos foram cuidadosamente genotipados por meio de PCR-RFLP do gene HSP70 pela Dra. Célia Gontijo utilizando protocolo otimizado em seu grupo de pesquisa, o Grupo de Estudo das Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). Brevemente, a PCR do HSP70 foi feita utilizando os iniciadores HSP70 *forward* (5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3') e *reverse* (5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3') para geração de um fragmento de 1300 pb (GARCIA *et al.*, 2004). A reação foi preparada para um volume final de 25 µL, contendo 5 µL do DNA de *Leishmania*, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 0,5 µL de dNTP mix 10 mM, 1,5 µL de DMSO 5,0%, 0,25 µL da enzima Taq DNA polimerase platinum (5U/µl) e 1 µL de cada iniciador a 10 pmol/ µL. As reações foram amplificadas em termociclador automático de DNA (Veriti – AppliedBiosystems), com desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos, cada um composto por uma etapa de desnaturação à 94°C por 30 seg, anelamento à 61°C por 1 min e extensão à 72°C por 3 min e posteriormente, um passo final de extensão à 72°C por 10 min. Previamente à digestão, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação da presença do *amplicon* e de ausência de contaminação da reação. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão pela enzima *HaeIII* para identificação de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15µL, sendo 12,5 µL do produto de PCR, 1,5 µL de tampão e 1 µL de *HaeIII* (10 U/µL). As reações foram incubadas por 2 horas à 37°C. Após o término da incubação, os produtos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 4% em comparação com o perfil obtido pela PCR-RFLP de cepas de referências mantidas neste laboratório, *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L.*

*braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *L. major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH).

### **3.3 Avaliação da metaciclologênese *in vitro*, composição da membrana celular e perfil proteolítico de *L. tarentolae***

#### **3.3.1 Citometria de Fluxo**

Parasitas com 3, 5, 7 e 8 dias de cultivo foram centrifugados à 200xg, 4°C, 10 minutos para remoção das células mortas. Posteriormente,  $10^7$  células foram coletadas por centrifugação (1540xg, 10 minutos, 4°C) e lavadas três vezes com PBS 1x. Em seguida, os parasitos foram fixados em 300µL de PBS 1X contendo 1% de formaldeído. As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo BD LSRFortessa™, no qual dez mil eventos foram adquiridos. Os parasitos foram avaliados com base no tamanho (FSC-A) e na granulosidade (SSC) utilizando o software FlowJo, para identificação das alterações morfológicas que ocorrem durante o cultivo *in vitro*.

#### **3.3.2 Lectinas**

As lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA), que tem afinidade por resíduos de D-manose e D-glicose, e *Triticum vulgare* (WGA), que indica a presença de resíduos de N-acetil-D-glicosamina, foram utilizadas neste estudo. As lectinas foram diluídas em PBS 1x na concentração de 1mg/mL, filtradas em membranas de 0,22µm e as alíquotas foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

#### **3.3.3 Ensaio de Aglutinação**

Os testes de aglutinação foram realizados conforme adaptação do protocolo descrito por Rodríguez-González e colaboradores (2006). Brevemente,  $1-2 \times 10^8$  parasitos em fase logarítmica ou estacionária foram lavados três vezes com PBS 1x, e foram coletados por centrifugação (1540xg, 10 minutos, 4°C). As células foram ressuspensas em PBS 1x contendo 1% de soro fetal bovino inativado. Os ensaios foram realizados placas de cultura celular de 96 poços, de modo que, 50µl da suspensão de parasitos foram em incubados com o mesmo volume de lectina (concentração final de 500 µg/mL). Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, o grau de aglutinação foi determinado microscopicamente através de contagens em câmara de Neubauer. As reações controle foram realizadas na ausência da lectina. O percentual de aglutinação foi determinado pela

fórmula:  $[1 - (\text{número de promastigotas livres da amostra} / \text{número de promastigotas livres do controle})] \times 100$  (SACKS; HIENY; SHER, 1985).

### **3.3.4 Western blot de LPG**

Para avaliar a presença de LPG em *L. tarentolae*, os anticorpos CA7AE e WIC 79.3, gentilmente cedido pelo Dr. Rodrigo Soares do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do CPqRR/Fiocruz, foram empregados em *western blot*. Brevemente,  $1 \times 10^7$  parasitos em fase logarítmica de cultivo foram coletados por centrifugação (1540xg, 10 minutos, 4°C) e lavados três vezes com PBS 1X. O sedimento foi ressuspensão em 150 mL de tampão de lise/extração RIPA (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) contendo 1x de coquetel de inibidor de proteases (Sigma), incubado por 30 minutos em gelo. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10.000xg por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e quantificado pela metodologia de Bradford e avaliado por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 10%), e posteriormente transferido para membrana de PVDF. Após a transferência, a membrana foi incubada por 1h em tampão de bloqueio (PBS 1X, 0.1% de Tween<sub>20</sub> e 5% de leite em pó desnatado) sob agitação, à temperatura ambiente. O tampão foi descartado e a membrana lavada 3 vezes com tampão de lavagem (0.1% de Tween<sub>20</sub> em PBS 1X), sendo cada lavagem de 5 minutos, sob agitação. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário CA7AE (1:1000) ou WIC 79.3 (1:1000) e a membrana foi incubada *overnight* à 4°C. Após este período, a membrana foi lavada três vezes com tampão de lavagem, sendo cada etapa com duração de 5 minutos. Depois, a membrana foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação, com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) conjugado à peroxidase. Os anticorpos secundários não-ligados foram removidos por três lavagens de 5 minutos com tampão de lavagem e duas lavagens com PBS 1X. A revelação foi realizada com os substratos ECL PLUS *Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Sciences) pelo método de quimiluminescência em filme radiográfico (KODAK).

### **3.3.5 Extração e Purificação de LPGs**

A extração de LPG de *L. tarentolae* foi feita a partir de aproximadamente  $10^{10}$  parasitos em fase logarítmica tardia. Os procedimentos de extração de LPG foram realizados conforme o protocolo descrito por Orlandi e Turco, 1987. Os parasitos foram lavados duas vezes com PBS 1X (4°C, 1540xg, 10 min). Em seguida, os parasitos foram submetidos à delipidação. Para isso, uma solução de 2,5 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (3:2) e 0,5 mL de 4 mM de MgCl<sub>2</sub> foi adicionada ao pellet. O material foi sonicado e centrifugado à 3.000

rpm por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido por mais uma vez. Para remoção das proteínas, 2,5 mL de uma solução de 4mM de  $MgCl_2$  foi adicionada à fase sólida da etapa anterior. O material foi sonicado e centrifugado a 3.000 rpm por 7 minutos e após o descarte do sobrenadante, o processo foi repetido novamente. Os GIPLs foram removidos por meio de adição de uma solução de 3 mL de  $CHCl_3/MeOH/H_2O$  (10:10:3) e 0,5 de  $CHCl_3/MeOH$  (1:1) ao material obtido na etapa anterior, seguido por sonicação e centrifugação por 3.000 por 7 minutos, o sobrenadante foi reservado. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes utilizando apenas  $CHCl_3/MeOH/H_2O$  (10:10:3). O LPG foi extraído pela adição de solvente E (água/etanol/etil-éter/piridina/ $NH_4OH$ / 15:15:5:1:0,017) ao material sólido da etapa anterior, seguido por sonicação e 7 minutos de centrifugação à 3.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e este procedimento foi repetido por mais três vezes. O extrato foi seco por evaporação com  $N_2$ .

Durante a purificação as amostras de LPG foram ressuspensas em 1 mL de solução de ácido acético (0,1N)/ NaCl (0,1M) e aplicadas em colunas de fenil-sefaroze equilibradas na mesma solução. Foram adicionados sequencialmente 1 mL das soluções de ácido acético (0,1N)/NaCl (0,1M), 1mL de ácido acético (0,1N) e 1 mL de água destilada. Os tubos foram substituídos e 4 mL de solvente E foram adicionados. As amostras foram secas em  $N_2$ , ressuspensas em solvente E e quantificadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

### **3.3.6 Ensaio de zimografia**

A avaliação da atividade de proteases intracelulares e extracelulares foi realizada conforme adaptação do protocolo descrito por Cuervo e colaboradores (2005).  $1 \times 10^9$  promastigotas em fase estacionária foram utilizadas para realização dos experimentos. Para análise de proteases intracelulares, os parasitos foram lisados em solução de 1% de Triton X-100 contendo 10 mM de Tris-HCl em pH 6,8, seguido por centrifugação à 10.000xg por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford. Para obtenção das proteases secretadas, as promastigotas foram lavadas três vezes em PBS 1X (1540xg, 4°C, 10 min), ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 contendo 25mM de HEPES e incubadas por 3 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas à 1540xg por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membranas de 0,22 $\mu$ M. O sobrenadante e o extrato protéico foram avaliados por SDS-PAGE 10% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 30 minutos em solução de renaturação contendo 2% de Triton X-100. A atividade das proteases foi detectada incubando os géis por 48 horas à 37°C em tampão de reação (50 mM de Tris-HCl, pH 5,5, contendo 10 mM de  $CaCl_2$ ). Após esse período, os géis foram corados em *Coomassie Blue* (30% de metanol, 10% de ácido acético e 0,05% *Coomassie Blue* G-250).

Os géis foram descorados em solução composta por 30% de metanol e 10% ácido acético e digitalizados pelo Scanner ImageScanner III (GE HealthCare). A identificação da classe das proteases foi feita por meio da incubação de uma alíquota da amostra de sobrenadante ou extrato protéico com 50 mM de EDTA ou 500 µg de PMSF por 30 minutos à temperatura ambiente previamente ao ensaio de zimografia

### **3.3.7 Avaliação da lise pelo sistema complemento**

Os experimentos de lise pelo complemento foram realizados conforme adaptação do protocolo descrito por Späth e colaboradores (2003). O *pool* de soro humano foi obtido a partir de voluntários saudáveis. Para isso, as amostras de sangue foram coletadas em tubos com ativador de coagulação, homogeneizadas e, em seguida centrifugadas à 1500 rpm à temperatura ambiente. Os soros foram coletados, misturados e armazenados à 4°C até o momento do uso.  $1 \times 10^7$  promastigotas em fase logarítmica ou estacionária foram centrifugadas à 200xg por 10 minutos, para remoção de células mortas, previamente à realização dos experimentos. Posteriormente, os parasitos foram lavados três vezes em PBS 1X (1540xg, 4°C, 10 min), ressuspensos em 500 µL de DMEM sem SFB, contendo 40 µg de iodeto de propídeo (PI), com ou sem 1%, 2% ou 4% de *pool* de soro humano. A reação foi incubada à 26°C por 30 minutos protegida da luz. Em seguida, os parasitos foram lavados uma vez em PBS 1X (1540xg, 4°C, 10 min) e ressuspensos em 300 µL de PBS 1X contendo 1% de formaldeído, e a fluorescência foi lida por citômetro de fluxo BD LSRFortessa™. Os experimentos foram realizados na presença de controles não-marcados (ausência de PI), controle negativo (ausência de soro humano) e controle positivo (células aquecidas à 100°C por 30 min na presença de PI).

### **3.4 Análise metabólica comparativa de *Leishmania spp***

As diferentes espécies de *Leishmania* foram cultivadas de forma sincrônica e monitoradas diariamente através de observação microscópica e contagem em câmaras de Neubauer. Os parasitos foram coletados no segundo dia da fase estacionária para extração dos metabólitos.

#### **3.4.1 Extração e derivatização dos metabólitos**

Para a extração dos metabólitos, os parasitos foram submetidos ao *quenching* metabólico através da imersão das garrafas de cultivo em banho de etanol/gelo seco por aproximadamente 10 segundos. O metabolismo deve ser rapidamente paralisado para evitar que as alterações encontradas estejam associadas com o manuseio das amostras e/ou ao

método de extração (VINCENT; BARRETT, 2015). As garrafas foram alíquotadas em aproximadamente 10 tubos contendo  $4 \times 10^7$  parasitos/cada. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X gelado (0-4°C) 3 vezes por centrifugação à 4°C, 1540xg por 10 minutos e os *pellets* foram armazenados à -80°C até o momento do uso. 300µL de uma solução de clorofórmio/metanol/água (1:3:1) gelada foi adicionado ao *pellet* e as células foram submetidas a quatro ciclos repetidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água à 37°C (*freeze and thaw*). O lisado foi centrifugado por 10 minutos, 16.000xg à 4°C e 200µL do sobrenadante foram transferidos para um *vial* de vidro contendo um inserto. Os tubos de vidro foram secos completamente em SpeedVac à 35°C por cerca de duas horas.

A reação de metoximação foi realizada através da adição de 10µL de metoxiamina (15ppm, 15mg/mL) em piridina. Os tubos foram hermeticamente encapsulados e submetidos a três ciclos de vortexação por cinco minutos. Em seguida, os *vials* foram incubados *overnight* à temperatura ambiente em local protegido da luz. Para silição, 10µL de BSFTA+TMS (99:1) foram adicionados aos *vials* descapsulados. Em sequência, tubos foram recapsulados, vortexados por 5 minutos e incubados por 1 hora à 70°C. As amostras foram descapsuladas e 100µL de heptano contendo 10 ppm de padrão C18 foram adicionados. 20µL de cada amostra foram coletados e homogeneizados para preparar os controles de qualidade ou *quality control* (QC), de modo que foram produzidos 1 QC para cada 5 amostras. Adicionalmente, foram produzidas duas amostras de branco. Em seguida, as amostras foram armazenadas à -80°C até a sua injeção no GC-MS.

### **3.4.2 Parâmetros da injeção no GC-MS**

As condições de injeção no GC-MS para metabolômica foram otimizadas em publicação prévia de Garcia e Barbas (2011). 2 µL da amostra derivatizada foram injetados por um auto-amostrador Agilent 7693 em modo *Split* no cromatógrafo gasoso (Agilent 7890A) acoplado a espectrômetro de massas com detector de eixo triplo (Agilent 5975C). A separação foi realizada utilizando uma pré-coluna J&W de 10m (Agilent Technologies®) integrada a uma coluna ultraierte DB-5MS, com 30m de comprimento, 0.25mm de diâmetro interno e um filme de 25µm composto por 95% de dimetilpolisiloxano e 5% de difenil (Agilent Technologies®). A entrada do injetor foi mantida a 250°C, e o hélio foi utilizado como fase móvel a um fluxo de 1.0 mL/minuto. A taxa de *Split* utilizada foi de 1:10. A temperatura inicial da coluna foi mantida à 60°C durante um minuto após a injeção, em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a uma taxa de 10°C/min até atingir a temperatura final de 325°C, e resfriada por 10 min após a análise. As temperaturas do injetor, linha de transferência, fonte do filamento e quadropólo foram mantidas a 250°C, 280°C, 230°C e

150°C, respectivamente. O quadrupolo (5975 inert MSD, Agilent) foi controlado pelo software Chemstation. A fonte de ionização de elétrons foi operada a -70 eV. A detecção pelo espectrômetro foi executada no modo de varredura no intervalo de 50-600 m/z a uma taxa de 2.7 varreduras/segundo.

### 3.4.3 Processamento dos dados

Os dados produzidos no GC-MS foram convertidos para \*.CDF no programa Chemstation previamente ao seu processamento. O tratamento dos dados envolveu a correção de *baseline*, remoção de ruídos, detecção de picos, alinhamento, normalização e detecção de metabólitos.

O processamento dos dados foi feito software XCMS (versão 1.24.1) executado no programa R (versão 3.2.3). A extração de dados foi feita pelo método de “*matched filter*”. Os seguintes parâmetros foram utilizados para detecção dos picos: largura de pico (fwhm) = 4, relação sinal/ruído (snthresh) = 1.5, número máximo de picos por cromatograma de íon extraído (max) = 30. Os picos foram agrupados por meio da correção da largura de banda (bw) = 2 e largura das faixas sobrepostas de m/z's (mzwid) = 0.25. Para identificação de compostos co-eluídos com base no índice de retenção, o software AMDIS (versão 2.71) foi empregado. A ferramenta ‘*fillPeaks*’ foi utilizada para remoção de *missing values*. A correção dos tempos de retenção foi feita no XCMS, para isso o método *default* de “*retcor*” foi aplicado, com alinhamento não linear e grau de suavização de ajuste da regressão polinomial (span) = 0.5.

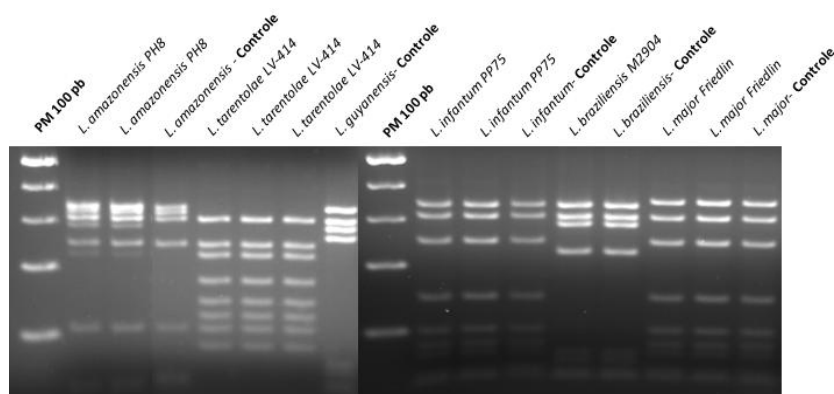
### 3.4.4 Análises estatísticas

Os dados foram escanolados pelo método de UV previamente às análises multivariadas. Esta metodologia apresenta a vantagem de dar a mesma importância para todos os metabólitos, apesar de amplificar os erros de medição (WORLEY; POWERS, 2013). O PCA e o PLS-DA foram construídos no SIMCA 14.1. O *heatmap* foi construído no software R versão 3.4.1 utilizando o pacote *gplots*. Para identificação de diferenças entre as espécies, análises univariadas foram conduzidas no Matlab, utilizando um *script* desenvolvido no Centro de Análises Metabolômicas e Bioanálises (CEMBIO), de modo que os dados são avaliados quanto a sua normalidade e as variáveis que apresentaram distribuição normal foram submetidas a testes paramétricos e ao teste T de Student utilizando um valor  $p < 0,05$ . Os dados também foram avaliados por estatística multivariada usando Análise Discriminante de Projeção Ortogonal de Estrutura Latente (OPLS-DA) aplicando *Jack knife*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Genotipagem de *Leishmania spp.* por meio de PCR-RFLP do gene HSP70

As espécies de *Leishmania* utilizadas neste estudo foram genotipadas por PCR-RFLP, no Grupo de Estudo das Leishmanioses do Centro de pesquisa René Rachou pela Dra. Célia Gontijo. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 4% em comparação com cepas-controle disponíveis no estoque do laboratório. Os resultados indicam ausência de contaminação das espécies utilizadas (figura 3) e confirmam que os genótipos estão corretos.



**Figura 3. Eletroforese dos produtos PCR-RFLP do gene HSP70 após eletroforese em gel de agarose 4%.** O perfil de restrição com *HaeIII* das diferentes cepas analisadas foi comparado aos seguintes controles: *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *L. major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH). PM: padrão de peso molecular; pb: pares de base

Diante da ausência de cepa de referência de *L. tarentolae* no laboratório, o resultado do experimento foi comparado com uma digestão *in silico* de uma sequência de HSP70 desta espécie depositada no *Genbank*. O resultado confirma que a espécie utilizada no trabalho, de fato, corresponde à *L. tarentolae* (figura 4).



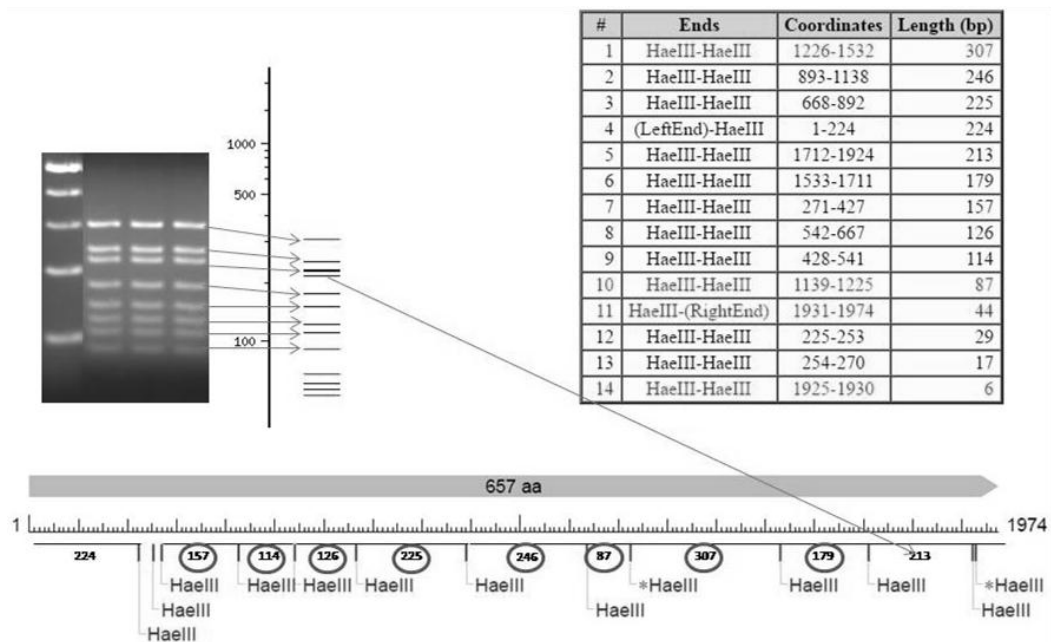
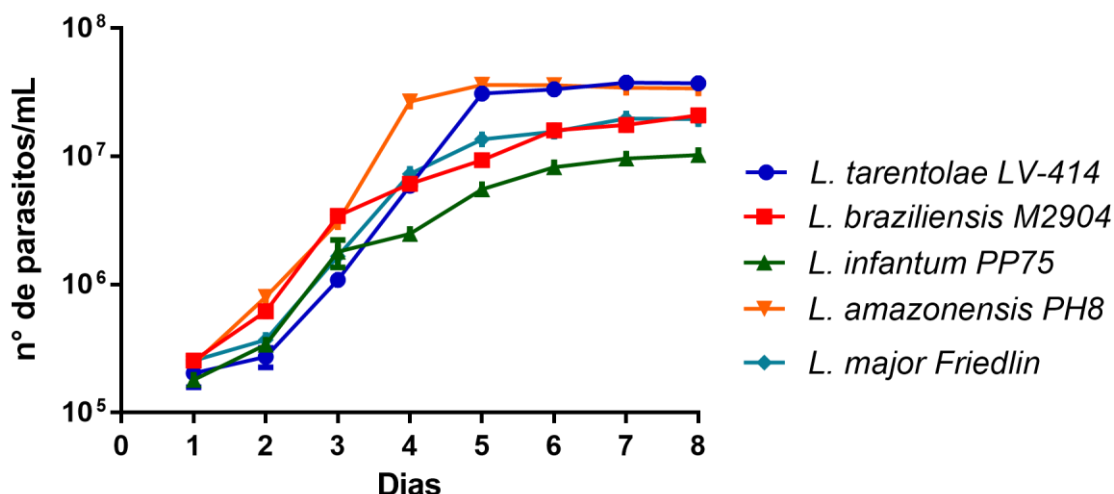


Figura 4. Resultado da análise comparativa *in silico* da PCR-RFLP de *L. tarentolae*

#### 4.2 Avaliação do perfil de crescimento *in vitro* das cepas de *Leishmania* spp. empregadas neste estudo

Como pode ser observado na figura 5, as espécies patogênicas de *Leishmania* utilizadas neste estudo (*L. braziliensis* M2904, *L. infantum* PP75, *L. major* Friedlin e *L. amazonensis* PH8) apresentaram fases logarítmicas e estacionárias de crescimento bem definidas. Uma diferença marcante no perfil de crescimento inclui o fato de que *L. amazonensis* é a primeira espécie a entrar em fase estacionária e atinge densidades de aproximadamente  $5 \times 10^7$  parasitos/mL, enquanto que *L. infantum* apresenta uma densidade de cerca de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL.

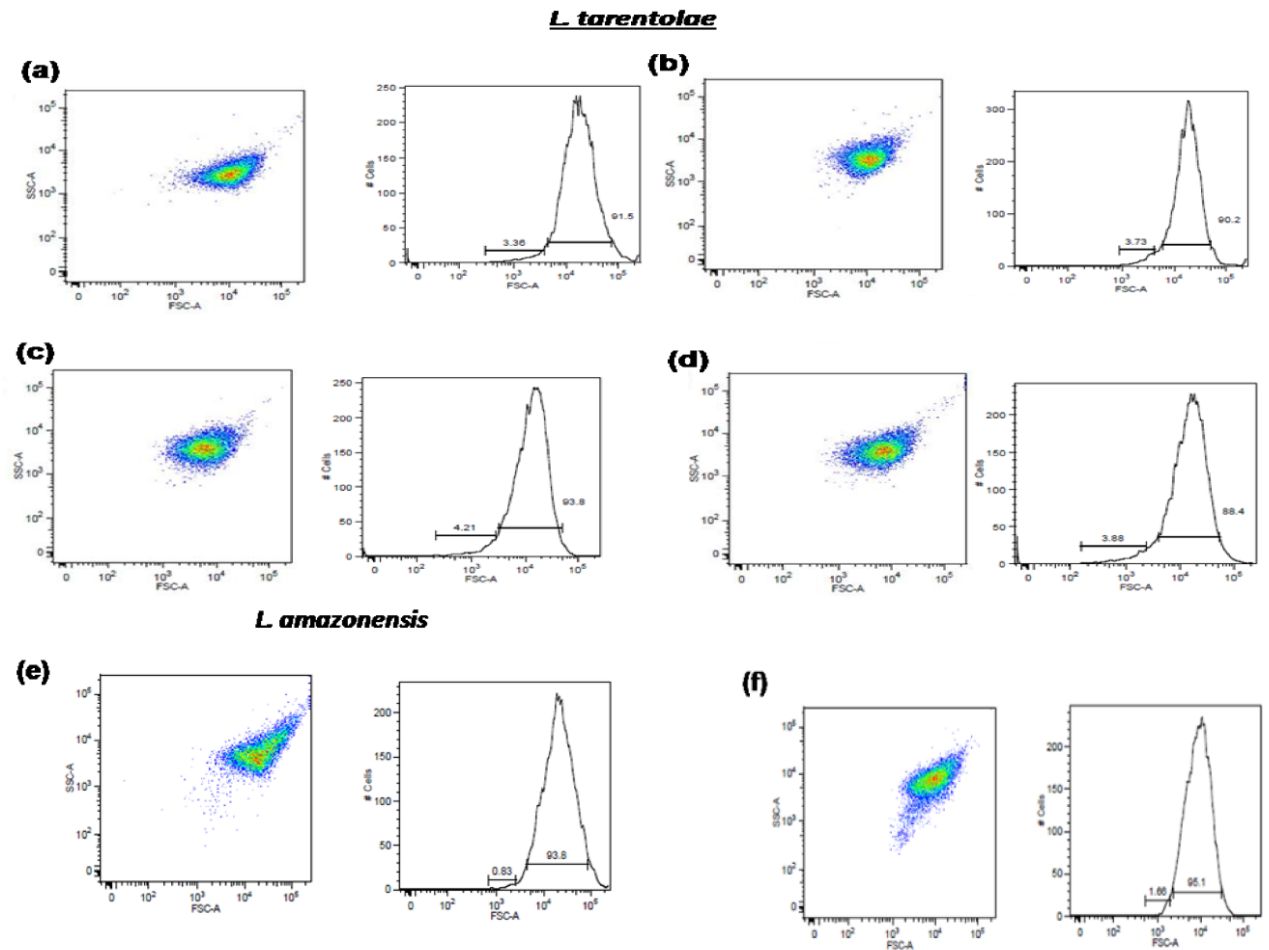
A determinação do perfil de crescimento para cada linhagem possibilitou determinar o tempo de cultivo necessário para a coleta de formas promastigotas para as análises subsequentes, e em especial para que cada espécie atingisse o segundo dia da fase estacionária, quando os parasitos foram coletados para a extração dos metabólitos para os experimentos de metabolômica.



**Figura 5.** Perfil de crescimento *in vitro* das cepas de *Leishmania* spp. empregadas neste estudo. Os parasitos foram cultivados em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de urina. O crescimento foi monitorado através de contagens diárias em câmaras de Neubauer.

#### 4.3 Análise das alterações morfológicas no cultivo *in vitro* de *L. tarentolae* por citometria de fluxo

Diversos estudos demonstraram que quando promastigotas de espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos atingem a fase estacionária no cultivo *in vitro*, uma proporção variável das células se diferencia em promastigotas metacíclicas (SACKS; PERKINS, 1984; MALLINSON; COOMBS, 1989; SACKS, 1989; DA SILVA, et al., 2015). A presença de diferenças morfológicas entre promastigotas procíclicas e metacíclicas pode ser avaliada pela aplicação da citometria de fluxo com parâmetros não-fluorimétricos, baseada em tamanho celular (FSC-A) e granulosidade, para identificação e acompanhamento da metaciclogênese *in vitro* de *Leishmania* (SARAIVA et al., 2005). Diante disso, culturas de *L. tarentolae* com 3, 5, 7 e 8 dias foram analisadas por citometria de fluxo, como representado na figura 6. Nossos resultados sugerem que o perfil da cultura se mantém uniforme ao longo do tempo de cultivo. Apenas uma quantidade irrisória de células pequenas pôde ser identificada e se manteve constante nos diferentes dias analisados. Em contraste, a proporção de células pequenas na cultura de *L. amazonensis* variou de aproximadamente 0,83% para 1,66%, aos 3 e 7 dias de cultivo, respectivamente, sugerindo que para essa espécie, nas condições empregadas, ocorre em pequena fração a diferenciação em promastigotas metacíclicas.



**Figura 6. Avaliação das alterações morfológicas durante cultivo *in vitro* de *L. tarentolae* e *L. infantum* por citometria de fluxo.** Os parasitos foram crescidos em garrafas de cultivo em meio M199 à 26°C, e foram coletados após 3, 5, 7 e 8 dias de cultivo e analisados por citometria de fluxo. O painel de cima representa o perfil de crescimento de *L. tarentolae* com 3 (a), 5 (b), 7 (c) e 8 (d) de cultivo. O quadro de baixo mostra a quantidade de células pequenas de *L. amazonensis* com 3 (e) e 7 dias (f). Os *dot-plots* são representativos de dois experimentos diferentes realizados em triplicata.

#### 4.4 Aglutinação com lectinas como ferramenta para identificação de modificações na composição dos carboidratos de membrana

Com o intuito de avaliar outros aspectos associados à metaciclologênese, o ensaio de aglutinação com lectinas foi realizado para analisar as alterações na composição dos carboidratos de membrana, que frequentemente ocorrem durante este processo de diferenciação. Com essa finalidade, WGA e ConA foram utilizadas para análise da aglutinação de promastigotas de *L. tarentolae* em fase logarítmica e estacionária de cultivo. O grau de aglutinação foi avaliado após 1 hora de incubação à temperatura ambiente e a porcentagem foi determinada através de contagens em câmara de Neubauer.

**Tabela 4 - Porcentagem de aglutinação de promastigotas de *L. tarentolae* em fase logarítmica e estacionária induzida pelas lectinas de *Triticum vulgare* e *Canavalia ensiformis***

Lectina	Fase logarítmica	Fase estacionária
<i>Triticum vulgare</i>	36,24±11,14%	27,52±14,74%
<i>Canavalia ensiformis</i>	82,4±0,21%	80,80±2,55%

Os resultados são representativos da média e o desvio-padrão de experimentos realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes e, os dados foram analisados por One-way Anova. Valor de  $p > 0.05$

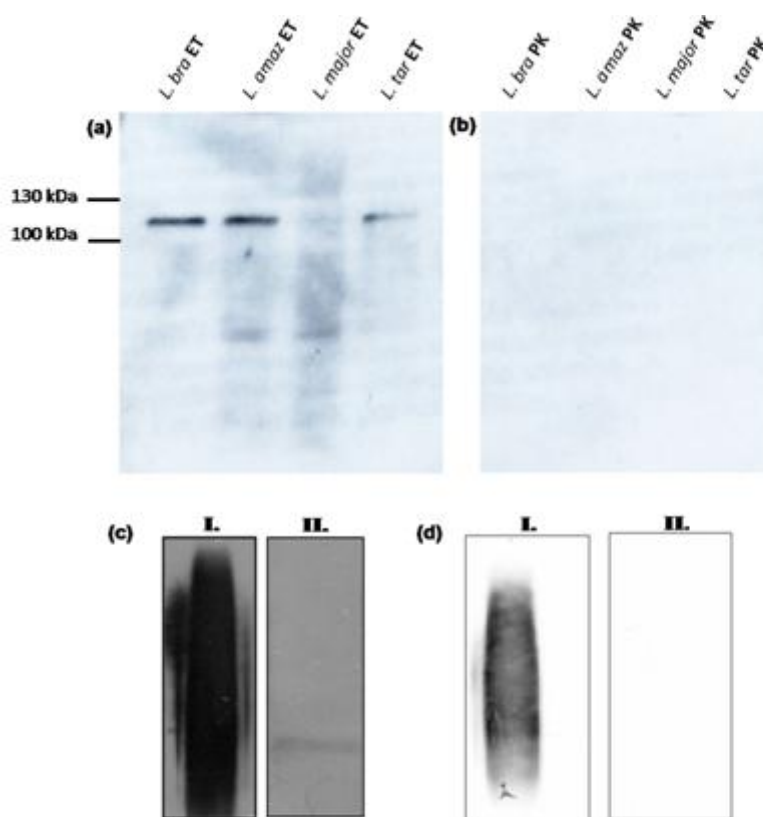
Os resultados da tabela 3 mostram que não houve diferença significativa ( $p > 0.05$ ) na intensidade de aglutinação, pelas lectinas utilizadas neste estudo, à promastigotas em fase logarítmica ou em fase estacionária. Em contraste a estudos prévios, nos quais espécies patogênicas como *L. braziliensis* demonstraram diferenças significativas no perfil de aglutinação de promastigotas logarítmicas e estacionárias, sendo que neste último estágio os parasitos aglutinam menos e maiores quantidades de lectina são necessárias para que níveis equiparáveis de aglutinação ao de promastigotas logarítmicas possam ser detectados (MUSKUS *et al.*, 1997).

#### 4.5 Avaliação da presença de LPG em *L. tarentolae*

A presença de LPG em *L. tarentolae* foi avaliada por *western blotting* por meio da utilização do anticorpo monoclonal CA7AE, que reconhece as unidades repetitivas Gal( $\beta$ 1,4)Man( $\alpha$ 1)-PO<sub>4</sub> presentes neste glicoconjugado (VOLF *et al.*, 2014). Inicialmente, a avaliação do LPG foi realizada a partir do extrato protéico total obtido com tampão de lise/extração RIPA, uma vez que outros fosfoglicanos como proteofosfoglicanos podem estar presentes e serem reconhecidos por esse anticorpo. O resultado do *western blotting* é apresentado na figura 7a. Observa-se a reatividade do anticorpo CA7AE com componentes presentes nos extratos de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. tarentolae* e

em baixa intensidade no de *L. major*, de modo que foi visualizada uma banda entre 110 e 130 kDa.

Como a metodologia utilizada não era específica para obtenção de LPG (figura 7a) e o resultado obtido não se mostrou compatível com o perfil normalmente encontrado em imunoblotting deste glicoconjugado, nos quais não se observam bandas definidas, mas sim uma arraste (ILG, THOMAS et al., 1991), foi avaliado se a reatividade encontrada poderia corresponder a algum proteofosfoglicano (PPG) ou proteína fosfoglicosilada. Para tal as amostras extraídas foram submetidas à digestão com proteinase K. O desaparecimento das bandas, após o tratamento com esta serino-protease, confirma a interação de proteínas glicosiladas com o anticorpo CA7AE, como pode ser visto na figura 7b.



**Figura 7. Western blot de LPG purificado e de extrato protéico. (a)** Western blot de LPG de extrato protéico total (70µg por poço) obtidos através da extração com o tampão de lise/extração RIPA de promastigotas em fase logarítmica de *L. braziliensis* H3227, *L. amazonensis* PH8, *L. tarentolae* e *L. major* Friedlin FV1 utilizando anticorpo CA7AE (1:1000). **(b)** Extrato protéico total digerido com proteinase K (concentração final de 20µg/µl, 15 min, 56°C). **(c)** Análise por western blot de LPG purificado de **I.** *L. major* em fase logarítmica tardia e **II.** *L. tarentolae* em fase estacionária utilizando anticorpo WIC 79.3 (1:1000) e **(d)** Análise por western blot de LPG purificado de **I.** *L. major* em fase logarítmica tardia e **II.** *L. tarentolae* em fase estacionária utilizando o anticorpo CA7AE (1:1000)

Com o intuito de confirmar a presença de LPG em *L. tarentolae*, realizamos a purificação deste glicoconjugado. O LPG foi extraído de aproximadamente 10<sup>10</sup>

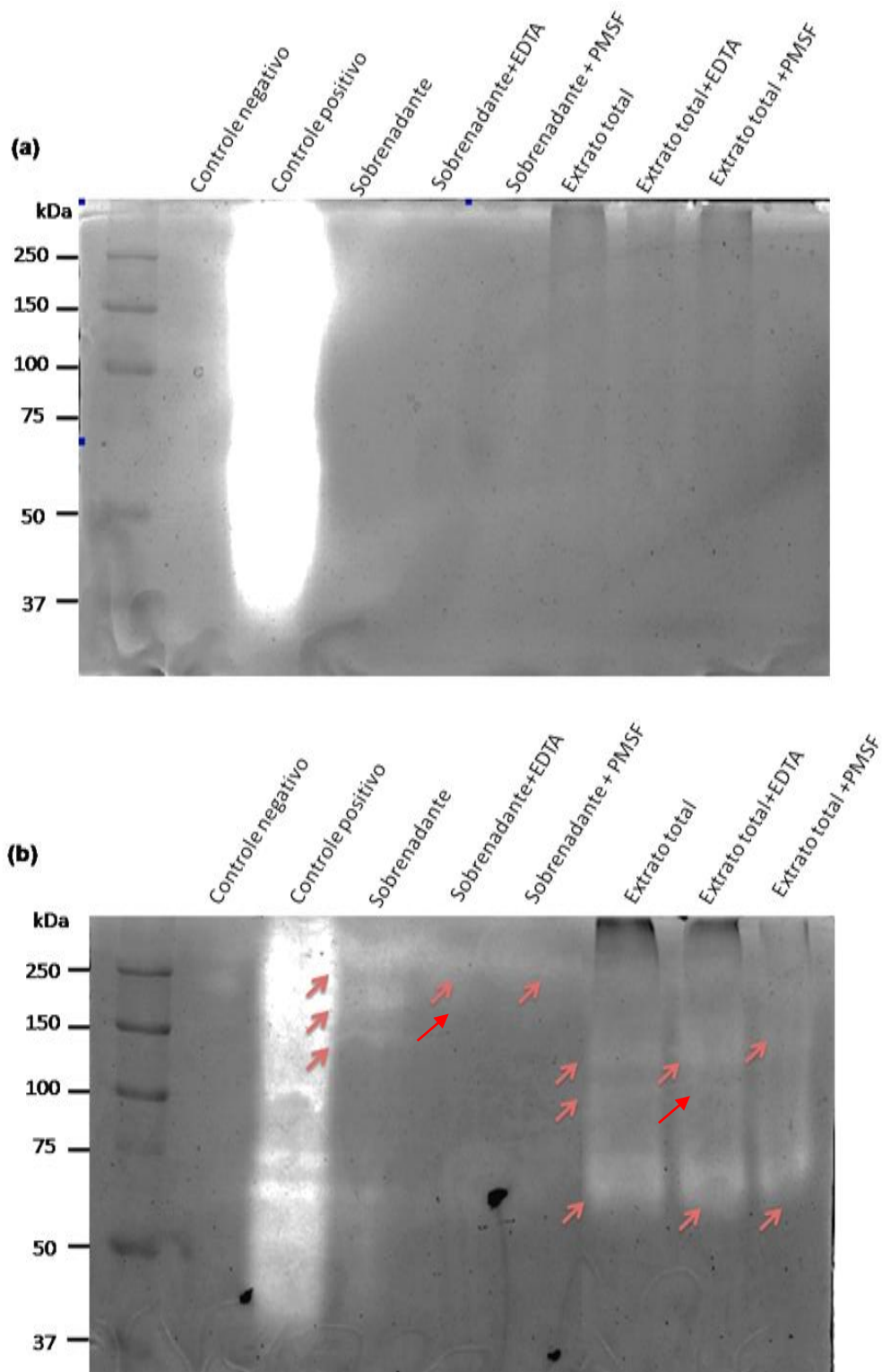
promastigotas em fase estacionária, foi em seguida avaliado por *western blot*, utilizando os anticorpos CA7AE e WIC 79.3, sendo este último específico para as unidades Gal( $\beta$ 1,3) encontradas em cadeias laterais do LPG de *L. major* e *L. turanica* (VOLF *et al.*, 2014). Como indicado nas figuras 7C e D, apenas o LPG purificado de *L. major* foi reconhecido adequadamente por este anticorpo, confirmando a ausência de reatividade com estruturas características de LPG em *L. tarentolae*.

#### 4.6 Avaliação do perfil de proteases de *L. tarentolae*

*Leishmania tarentolae* possui GP63, porém a alta variabilidade presente na sequência codificadora sugere a ausência da atividade proteolítica desta proteína (CAMPBELL; KURATH; FLEISCHMANN, 1992; RAYMOND *et al.*, 2012). Diante disso, foi avaliada a produção de outras proteases ativas em *L. tarentolae*, incluindo proteases intracelulares e secretadas pelo ensaio de zimografia.

A atividade proteolítica foi avaliada no extrato protéico de promastigotas estacionária e no sobrenadante do cultivo, utilizando SDS-PAGE copolimerizado com gelatina. Na análise do sobrenadante, nenhuma protease capaz de degradar a gelatina foi detectada nas amostras de *L. tarentolae*. Ausência de proteases foi observada também no extrato protéico de promastigotas de *L. tarentolae*, como pode ser visto na figura 8a. Este achado indica, nas condições experimentais empregadas, a ausência de atividade proteolítica nessa espécie, incluindo aquela correspondente à GP63, corroborando os achados de estudos anteriores, nos quais a atividade desta metaloprotease não foi detectada (RAYMOND *et al.*, 2012). Em contraposição, o controle *L. amazonensis* PH8 apresentou proteases na faixa de 100-250 kDa, no sobrenadante (Figura 8b), assim como proteases entre 50-150 kDa no extrato de promastigotas.

Com o objetivo de caracterizar as classes de proteases produzidas pela cepa *L. amazonensis* PH8, dois inibidores de protease foram utilizados, PMSF que inibe serino-proteases e algumas cisteíno-proteases e EDTA, que inibe metalo-proteases. Apesar do baixo nível de atividade detectado, em comparação à intensa atividade proteolítica da *Acanthamoeba*, usada como controle positivo, o perfil apresentado em PH8 é condizente com a presença de uma provável serino-protease secretada e uma intracelular, além de outras proteases que não puderam ser identificadas apenas pelo emprego destes dois inibidores.

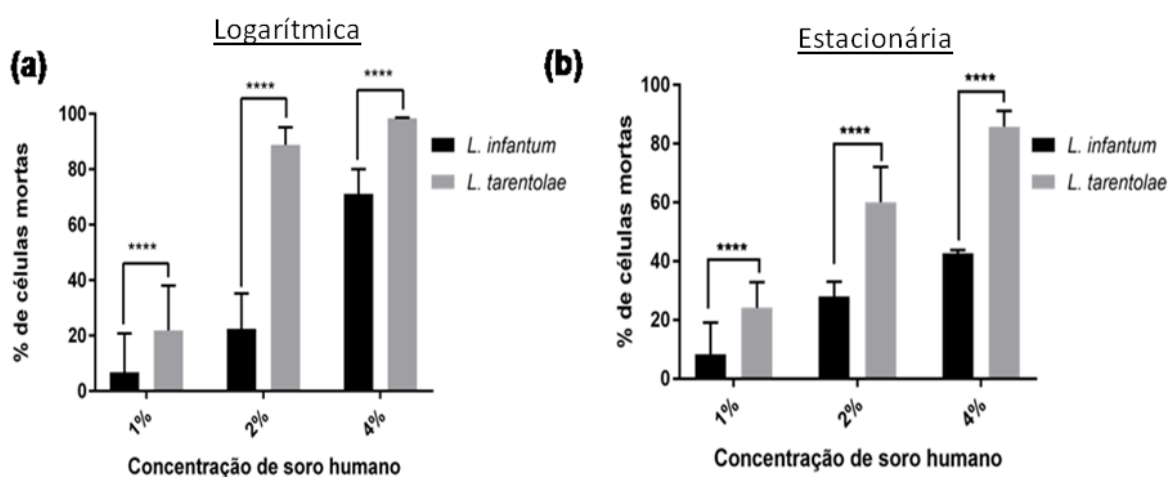


**Figura 8. Avaliação do perfil e da atividade de proteases secretadas e intracelulares de *L. tarentolae* e *L. amazonensis*.** As atividades das proteases secretadas intracelulares de (a) *L. tarentolae* e (b) *L. amazonensis* foram avaliadas após 48 horas de incubação dos géis em tampão de reação à 37°C, na presença ou ausência de 50 mM de EDTA ou 500 µg de PMSF. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado extrato de *Acanthamoeba castelanni* do genótipo T4. Água deionizada foi utilizada como controle negativo.

#### 4.7 Avaliação da susceptibilidade *L. tarentolae* ao sistema complemento

Os resultados anteriores apontam que *L. tarentolae* não produz o lipofosfoglicano e que não apresenta atividade proteolítica nas condições testadas, o que pode resultar em parasitos mais susceptíveis à lise pelo complemento. Com o intuito de verificar esta hipótese, promastigotas logarítmicas e estacionárias de *L. tarentolae* foram comparadas quanto à resistência à lise pelo complemento. A porcentagem de parasitos sensíveis foi determinada utilizando iodeto de propídeo, um agente intercalante de DNA fluorescente, incapaz de penetrar membranas de células viáveis.

Como pode ser observado na figura 9, as promastigotas de *L. tarentolae* são significativamente mais susceptíveis a lise pelo complemento, tanto na fase estacionária, quanto na logarítmica, em comparação à *L. infantum*. A partir de 4% de soro humano, a população de promastigotas da espécie que *L. tarentolae* encontra-se quase toda inviável, enquanto apenas 40-70% de parasitos de *L. infantum* são mortos pela mesma concentração de soro.



**Figura 9.** Avaliação da susceptibilidade de *L. tarentolae* e *L. infantum* ao sistema complemento. Os gráficos foram construídos a partir da porcentagem de células mortas marcadas com PI e comparam a susceptibilidade de *L. tarentolae* e *L. infantum* ao sistema complemento na fase logarítmica (a), estacionária (b). Os dados representam a média e o desvio-padrão de pelo menos dois experimentos diferentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por Two-way Anova com post-test Bonferroni. \*\*\*\*: Valor-p < 0.01.

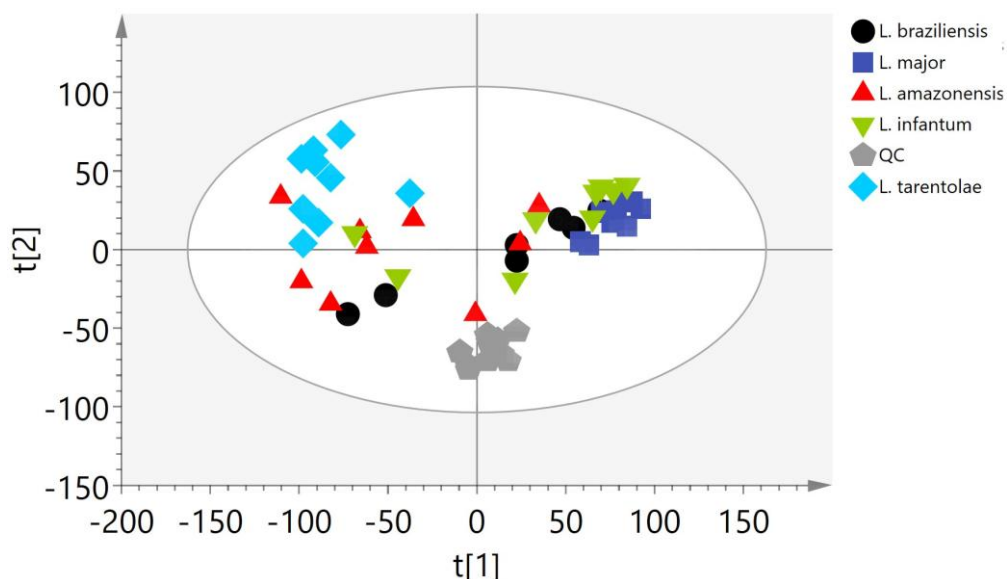
#### 4.8 Comparação do metaboloma de *L. braziliensis*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. tarentolae* por GC-MS

Tendo em vista a marcada diferença de *L. tarentolae* em relação aos processos biológicos comuns e muito importantes para outras espécies de *Leishmania* patogênicas, e os escassos dados da literatura sobre comparação do metabolismo de *L. tarentolae* com



outras espécies do gênero, aplicamos uma análise global para identificação diferencial de metabólitos em cinco espécies de *Leishmania*, incluindo *L. tarentolae*, empregando GC-MS. Essas espécies foram selecionadas com base nas diferenças de tropismos e patologias causadas por cada um delas, sendo *L. braziliensis* frequentemente associada à leishmaniose mucosa e cutânea, *L. amazonensis* e *L. major* responsáveis por infecções cutâneas, *L. infantum* à forma visceral da leishmaniose e finalmente, *L. tarentolae* que é incapaz de causar patologias, mesmo em indivíduos severamente imunocomprometidos.

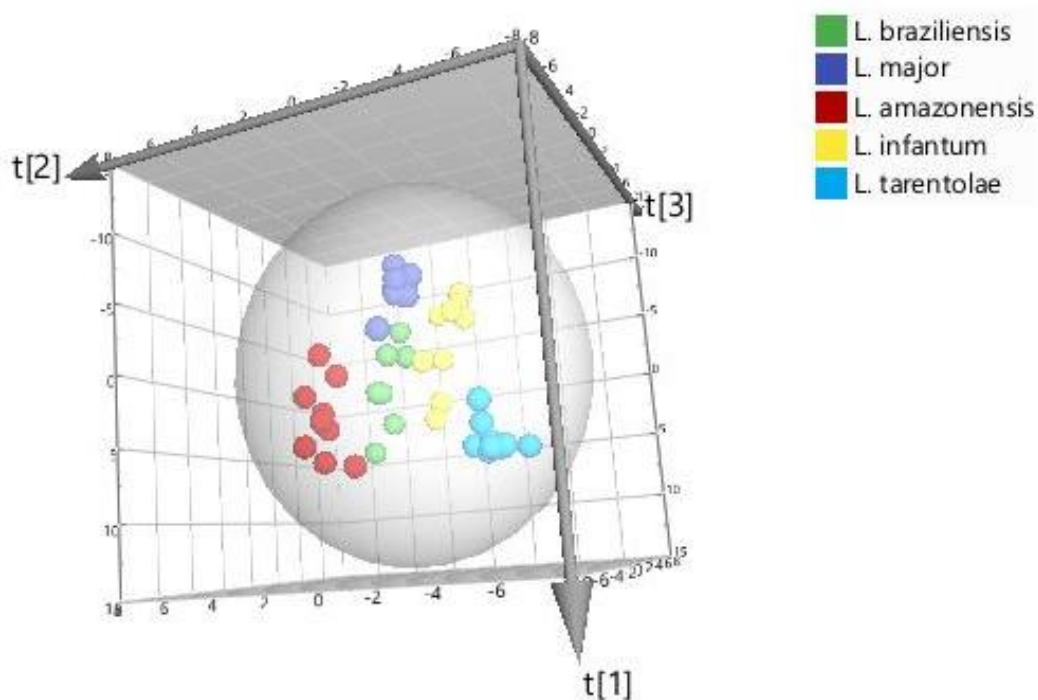
A qualidade dos procedimentos analíticos foi avaliada pela utilização de PCA, um método não-supervisionado de estatística multivariada, amplamente utilizado em quimiometria, que reduz a dimensionalidade dos dados (ARJMAND *et al.*, 2016). O agrupamento de amostras ocorre apenas quando a diferença entre os grupos é maior que a variação dentro de cada grupo (WORLEY; POWERS, 2013). Na análise do gráfico apresentado na figura 10, nota-se o agrupamento dos controles de qualidade (QCs) em uma determinada área do gráfico, demonstrando a estabilidade e reprodutibilidade da técnica empregada para as análises metabolômicas.



**Figura 10. Análise de componentes principais construído com os *features* obtidos pelo GC-MS na presença dos QCs.** Nove replicatas de cada espécie foram analisadas, com exceção de *L. braziliensis* M2904 que apresentou duas amostras que se apresentaram como *outliers* e foram excluídas das análises estatísticas posteriores.  $R^2$ : 0,73 e  $Q^2$ :0,613.

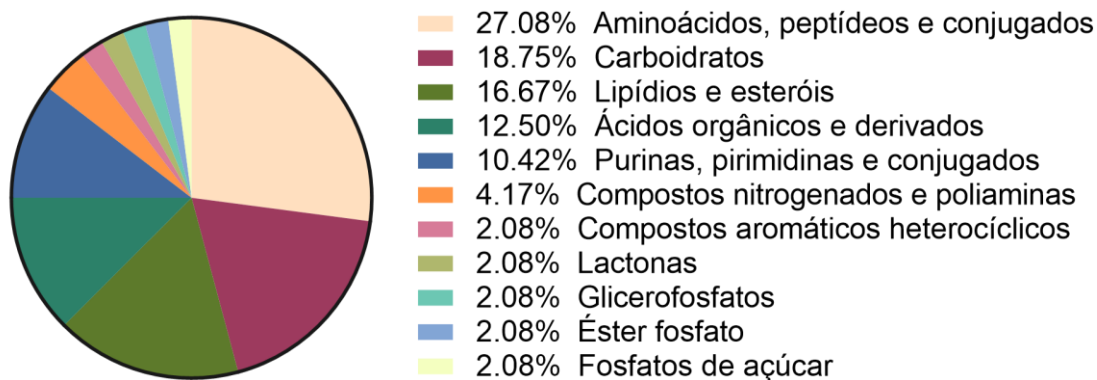
Após a verificação da reprodutibilidade do método analítico, prosseguimos com a análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A natureza supervisionada deste método permite plotar com maior definição as separações entre os grupos, como pode ser visualizado na figura 11. As amostras de *L. tarentolae* se distinguem claramente das amostras das demais espécies patogênicas. Os parâmetros de qualidade da

análise,  $R^2$  e  $Q^2$ , cujos valores foram superiores à 0,9, demonstraram a alta reprodutibilidade e capacidade predição estatística do modelo, respectivamente.



**Figura 11. Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais classificando as replicatas em espécies.** Este gráfico foi construído com base nos metabólitos identificados pelo GC-MS.  $R^2=0,918$  e  $Q^2=0,945$ .

A metodologia empregada permitiu a identificação de 48 metabólitos, entre todas as espécies analisadas. A tabela 4, lista os compostos identificados e suas respectivas características, como categoria bioquímica, fórmula molecular e massa isotópica. A categoria classificada como aminoácidos, peptídeos ou conjugados representou 27,08% do total dos metabólitos (figura 12). A segunda categoria bioquímica mais comum foi a dos carboidratos, seguida por lipídios e esteróis, ácidos orgânicos e derivados, purinas, pirimidinas e conjugados, compostos nitrogenados e poliaminas, éster fosfato, fosfatos de açúcar, glicerofosfatos, compostos aromáticos heterocíclicos e lactona.



**Figura 12. Classificação bioquímica dos compostos identificados por GC-MS.** As categorias bioquímicas foram definidas com base em informações disponíveis sobre cada metabólito no KEGG, HMDB, Pubchem, YMDB e ChEBI.

Um *heatmap* foi construído para identificar diferenças na abundância dos compostos no perfil metabólico dos parasitos (Figura 13). A análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) revelou níveis distintos de expressão de diversos metabólitos intracelulares entre os organismos das diferentes espécies. A análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) com base na intensidade dos metabólitos (dendograma vertical) revelou alguns grupos de metabólitos que diferem na abundância entre as espécies. A árvore demonstrada horizontalmente indica que o perfil metabólico de *L. tarentolae* difere claramente do perfil das espécies patogênicas, sendo observada uma menor abundância de diversos metabólitos, em comparação às demais espécies. Estes achados corroboram com os resultados do PLS-DA. Na análise hierárquica representada no *heatmap* observa-se ainda que os perfis de abundância dos metabólitos de *L. major* e *L. infantum* são mais próximos, enquanto que o perfil de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são menos similares ao perfil das primeiras, assim como entre si. Desta forma, padrões bem distintos foram detectados pela análise metabolômica por GC-MS entre as espécies estudadas.

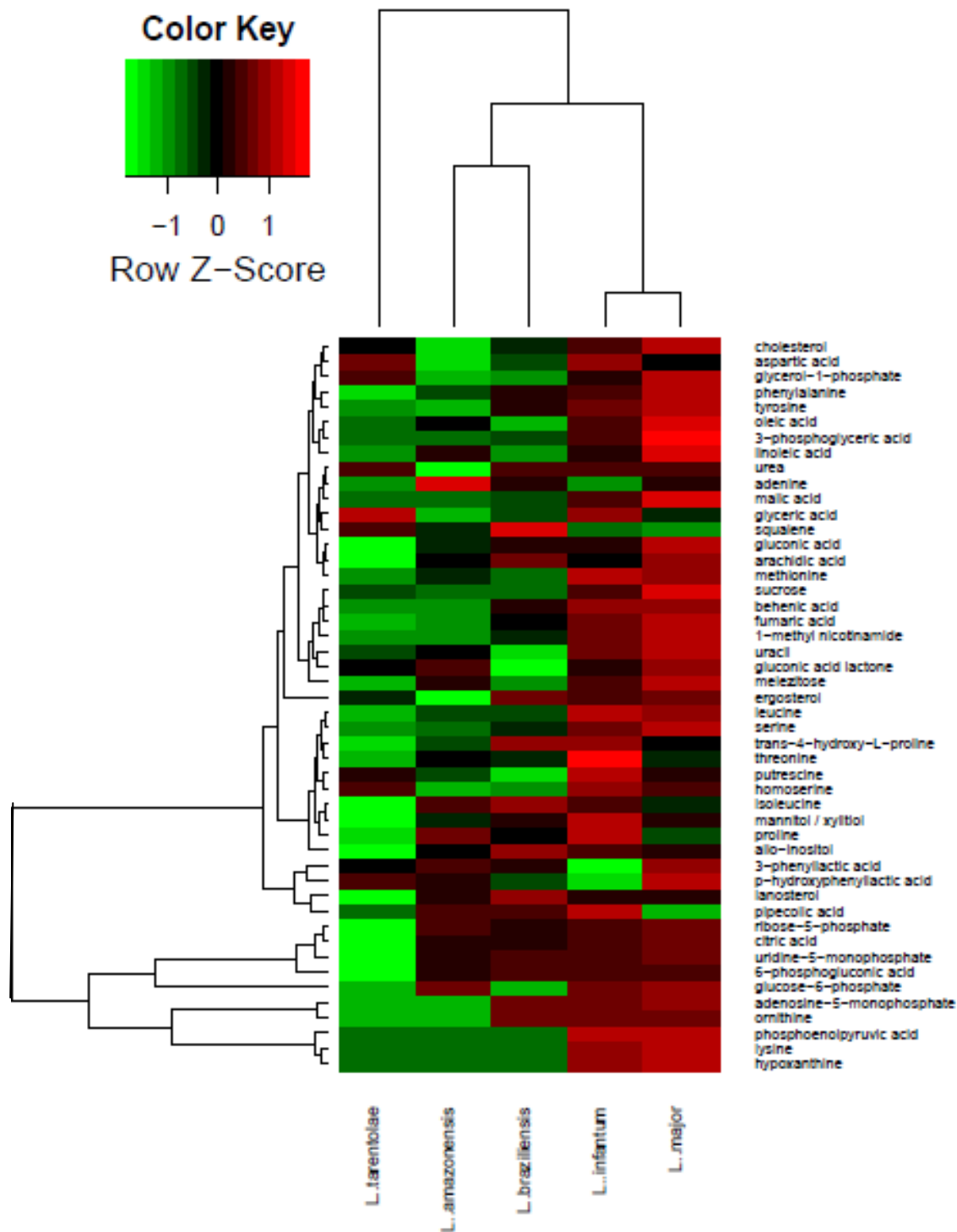
Com o intuito de identificar as vias metabólicas significativamente alteradas entre as espécies, análises estatísticas multivariadas foram conduzidas comparando as espécies em pares, tendo como referência *L. tarentolae*. Modelos de OPLS-DA, uma extensão do método de PLS que emprega um filtro de correção de sinal ortogonal (SUGIMOTO *et al.*, 2012), foram gerados e avaliados por *Jack Knife*. Em seguida, os metabólitos significativos por análise multivariada e univariada, foram utilizados para a identificação das vias metabólicas enriquecidas no MBRole 2.0. Como pode ser observado na tabela 5, as vias dos transportadores ABC, biossíntese de valina, leucina e isoleucina e de biossíntese de aminoacil-t-RNA diferem entre *L. tarentolae* e as espécies patogênicas. Por outro lado, a via de biossíntese dos esteróis de *L. tarentolae* apresentou diferenças com *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Já os metabolismos de purina, glioxilato e dicarboxilato foram

divergentes entre *L. major* e *L. tarentolae*. Além disso, outros contrastes foram observados no metabolismo desta última espécie no que diz respeito às vias catabólicas da arginina e prolina com relação à de *L. infantum*, assim como, com as vias de biossíntese de ácidos graxos insaturados de *L. infantum* e *L. major* e com o catabolismo de glicina, serina e treonina de *L. major* e *L. amazonensis*.

Para identificação de diferenças marcantes no perfil metabólico das espécies de *Leishmania*, um ponto de corte arbitrário de 50% de variação nos valores de *fold change* foi determinado, de forma que os compostos que apresentaram valores acima de 1,5 foram considerados como altamente abundantes em determinada espécie, ao mesmo tempo em que os metabólitos que apresentaram valores abaixo de 0,5 foram tidos como menos abundantes e em baixos níveis. O *fold change* variou de 0,083 a 9,128, sendo que maioria dos metabólitos apresentou níveis similares de expressão entre as espécies (anexo I). Apenas 14 compostos se enquadraram nos critérios estabelecidos (Tabela 6). Quando comparada às espécies patogênicas, baixos níveis de 6-fosfogliconato e ribose-5-fosfato, dois metabólitos destacam-se em *L. tarentolae*, os quais pertencem à via das pentoses-fosfato. O perfil oposto foi observado nos outros parasitos, em especial em *L. major* e *L. infantum*, que apresentaram considerável abundância de ambos os metabólitos.

Diferenças substanciais foram também observadas na abundância de metabólitos que compõem as vias das purinas e pirimidinas entre a espécie que infecta répteis e as demais espécies. Em *L. tarentolae*, hipoxantina se mostrou ausente durante a fase metabólica analisada, enquanto que baixos níveis de adenosina-5-monofosfato e de uridina-5-monofosfato foram detectados. Por outro lado, *L. major* apresentou a maior abundância destes compostos. Outra diferença nítida de *L. tarentolae* na fase estacionária é a ausência de lisina, um aminoácido que participa de diversos processos, como as vias como de biossíntese de aminoacil-tRNA e a dos transportadores ABC.

Interessantemente, *L. amazonensis* exibiu a menor intensidade de ergosterol em comparação às demais espécies. Além disso, essa espécie juntamente com *L. tarentolae* e *L. braziliensis* demonstraram quantidades reduzidas de *L-ornitina* e ácido fosfoenolpirúvico. Deve-se ressaltar que todas as espécies foram cultivadas nas mesmas condições e os metabólitos foram extraídos de parasitos que se encontravam no mesmo estágio de cultivo, o que reforça que as diferenças identificadas no metabolismo possivelmente decorrem de perfis metabólicos distintos.



**Figura 13. Avaliação do perfil metabólico das diferentes espécies de *Leishmania* por *Heatmap*.** A abundância de cada metabólito é representada pela escala de cor, variando de -1 (verde) a 1 (vermelho). Para permitir a comparação dos dados, a abundância iônica média foi normalizada por Log<sub>2</sub> n. No eixo x estão apresentadas as 5 espécies de *Leishmania* e no eixo y estão indicados os metabólitos identificados.

**Tabela 5 - Metabólitos identificados por GC-MS e sua abundância iônica média em cada espécie de *Leishmania***

Metabólito	Fórmula	Massa (Da)	<i>L. bra</i>	<i>L. maj</i>	<i>L. ama</i>	<i>L. inf</i>	<i>L. tar</i>
Ácido fumárico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	116,011	11,547	13,224	10,185	12,207	9,822
Ácido málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	134,022	12,556	13,723	12,215	13,266	12,421
Ácido p-hidróxifenilático	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	182,173	6,768	11,384	8,158	5,071	8,492
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192,027	6,518	13,460	6,107	9,847	2,824
Ácido 3-fenilático	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166,063	10,983	13,647	11,774	6,591	10,194
Ácido pipercolico	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	129,079	8,691	5,751	8,846	10,464	6,569
Adenina	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	135,054	13,253	13,099	13,451	12,999	12,828
Adenosina-5-monofosfato	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	347,063	7,539	14,819	3,890	8,743	0,869
Hipoxantina	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	136,039	1,241	10,286	1,127	7,342	0,000
Uracila	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	112,027	8,467	14,969	11,615	13,423	10,545
Uridina-5-monofosfato	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> P	324,036	9,022	13,356	6,491	7,873	3,203
Ácido aspártico	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133,038	13,411	14,056	12,237	15,481	14,966
Homoserina	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119,058	14,095	17,008	13,677	17,685	16,796
Isoleucina	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,095	17,378	16,340	17,053	16,956	15,189
Leucina	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,095	14,520	16,804	14,469	17,679	13,305
Lisina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146,106	2,967	12,077	1,332	8,796	0,000
Metionina	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149,051	11,182	13,207	11,776	13,361	10,983
Ornitina	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	132,090	6,392	11,561	2,170	9,734	1,630
Fenilalanina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,079	14,946	17,202	13,132	15,530	11,585
Prolina	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115,063	15,878	14,857	17,923	19,746	12,731
Serina	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105,043	14,401	17,160	13,819	16,151	13,485
Treonina	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119,058	14,437	14,212	14,920	17,380	12,839
Trans-4-hidróxi-L-prolina	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	131,058	16,646	14,992	14,255	17,174	12,887
Tirosina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181,074	13,801	17,024	10,727	15,578	10,886
Melezitose	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	504,169	7,980	16,502	12,049	12,715	7,486
Sucrose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342,116	10,980	12,240	10,897	11,619	11,187
Ácido-3-fosfoglicérico	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> P	185,993	13,569	16,844	12,952	14,788	13,137
Alo-inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,063	21,425	19,522	19,113	20,373	16,013

Metabólito	Fórmula	Massa (Da)	<i>L. bra</i>	<i>L. maj</i>	<i>L. ama</i>	<i>L. inf</i>	<i>L. tar</i>
Ácido glucônico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	196,058	12,928	13,712	12,322	12,818	11,083
Glicose-6-fosfato	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P	260,030	4,171	13,785	8,030	8,482	2,601
Ácido glicérico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	106,027	11,732	12,063	11,122	13,078	13,354
Manitol / xilitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	182,079	16,183	16,159	15,780	17,051	14,768
Ribose-5-fosfato	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P	230,019	6,333	13,365	7,206	9,735	2,769
1-metil nicotinamida	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O	137,071	10,299	12,571	9,431	11,760	8,617
Putrescina	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	88,100	14,553	16,866	15,862	18,633	17,119
Uréia	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	60,032	13,378	13,439	13,267	13,457	13,570
Ácido fosfoenolpirúvico	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	167,982	2,496	8,058	2,067	8,004	3,750
Ácido 6-fosfogluconico	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>10</sub> P	276,025	13,243	18,560	10,471	15,659	3,899
Glicerol-1-fosfato	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> P	172,014	12,016	16,665	11,476	13,984	13,647
Glucolactona	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	178,048	7,394	12,144	11,306	10,808	10,205
Ácido linoléico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,240	11,585	18,969	15,144	14,894	12,080
Ácido araquidônico	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	312,303	12,494	12,881	11,930	11,976	11,087
Ácido beénico	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	340,334	10,887	11,613	10,344	11,507	10,390
Colesterol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	386,355	14,246	15,512	13,269	14,780	14,454
Ergosterol	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	396,339	17,654	17,388	4,009	16,432	10,765
Lanosterol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426,386	11,232	9,578	9,674	9,613	4,891
Ácido Oléico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282,256	12,652	16,986	14,333	15,066	13,215
Esqualeno	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410,391	13,464	11,171	12,120	11,585	12,444

A tabela lista os metabólitos identificados pelo GC-MS e as suas respectivas fórmulas moleculares, massa monoisotópica e categorias químicas e, a abundância iônica média destes compostos em cada espécie de *Leishmania*. Legendas: Ácidos orgânicos e derivados  ; Ácidos nucleicos (purinas, pirimidinas e conjugados)  ; Aminoácidos, peptídeos e conjugados  ; Carboidratos  ; Compostos aromáticos heterocíclicos  ; Compostos nitrogenados e poliaminas  ; Éster fosfato  ; Fosfatos de Açúcar  ; Glicerofosfatos  ; Lactonas  ; Lipídios e esteróis  ; *L. maj*: *L. major* Friedlin; *L. tar*: *L. tarentolae* LV-414; *L. bra*: *L. braziliensis* M2904; *L. inf*: *L. infantum* PP75; *L. ama*: *L. amazonensis* PH8.

Tabela 6 - Vias enriquecidas no MBRole com significância estatística em cada par de comparação

Vias metabólicas	<i>L. tar</i> x <i>L. inf</i>	<i>L. tar</i> x <i>L. maj</i>	<i>L. tar</i> x <i>L. ama</i>	<i>L. tar</i> x <i>L. bra</i>
Transportadores ABC				
Biossíntese de ácidos graxos insaturados				
Biossíntese de valina, leucina e isoleucina				
Pentoses fosfato				
Metabolismo de arginina e prolina				
Biossíntese de aminoacil-t-RNA				
Biossíntese de esteróis				
Metabolismo de glicina, serina e treonina				
Metabolismo de purina				
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato				

Legendas: : valor-p < 0,01; : valor-p entre 0,01 e 0,05; *L. maj*: *L. major* Friedlin; *L. tar*: *L. tarentolae* LV-414; *L. bra*: *L. braziliensis* M2904; *L. inf*: *L. infantum* PP75; *L. ama*: *L. amazonensis* PH8.



Tabela 7 - Metabólitos identificados por GC/MS cuja expressão variou em pelo menos 50% de intensidade entre duas espécies.

Metabólito	<i>L. maj</i> x <i>L. ama</i>	<i>L. maj</i> x <i>L. inf</i>	<i>L. maj</i> x <i>L. bra</i>	<i>L. inf</i> x <i>L. ama</i>	<i>L. bra</i> x <i>L. ama</i>	<i>L. bra</i> x <i>L. inf</i>	<i>L. tar</i> x <i>L. ama</i>	<i>L. tar</i> x <i>L. maj</i>	<i>L. tar</i> x <i>L. inf</i>	<i>L. tar</i> x <i>L. bra</i>
Ácido 3-fenilático										
Ácido 6-fosfogluconico										
Adenosina-5-monofosfato										
Ácido cítrico										
Ergosterol										
Glicose-6-fosfato										
Hipoxantina										
Lisina										
Melezitose										
Ornitina										
Ácido fosfoenolpirúvico										
Ácido p-hidroxifenilático										
Ribose-5-fosfato										
Uridina-5-monofosfato										

A variação entre as espécies foi determinada com base no *fold change*, sendo que valores acima de 1,5 (verde) foram categorizados como expressão aumentada e abaixo de 0,5, como expressão diminuída (vermelho). Legendas: *L. maj*: *L. major* Friedlin; *L. tar*: *L. tarentolae* LV-414; *L. bra*: *L. braziliensis* M2904; *L. inf*: *L. infantum* PP75; *L. ama*: *L. amazonensis* PH8.

## 5 DISCUSSÃO

*Leishmania tarentolae* é uma espécie de *Leishmania* que representa um importante modelo para estudo da biologia de *Leishmania*, uma vez que compartilha ancestral comum com espécies do sub-gênero *Leishmania*, e portanto está filogeneticamente muito relacionada às espécies patogênicas desse sub-gênero, assim como do sub-gênero *Viannia*. No entanto, infecta hospedeiros distintos em seu ciclo de vida e não é patogênica para mamíferos. Além disso, os organismos desta espécie possuem um alto potencial biotecnológico e tem sido amplamente utilizados na produção de proteínas recombinantes, vacinas e na busca por fármacos para o tratamento das leishmanioses (TAYLOR *et al.*, 2010; MIZBANI *et al.*, 2011; PINEDA *et al.*, 2016). Contudo, diversos aspectos inerentes à biologia da própria *L. tarentolae* são desconhecidos, como a composição da membrana celular, perfil metabólico e se formas metacíclicas são formadas (BATES, 2007). A elucidação de diversos aspectos biológicos destes parasitos pode contribuir para melhorar o entendimento das leishmanioses, especialmente no que concerne à virulência e interação parasito-hospedeiro.

Poucos estudos descrevem o desenvolvimento de *L. tarentolae* no inseto vetor, por consequência, não existem relatos demonstrando quais estágios além de promastigotas procíclicas ocorrem nestes hospedeiros (BATES, 2007). Em analogia às espécies patogênicas, estes parasitos possivelmente produzem uma forma infectiva para répteis (BATES, 2007). Com o intuito de avaliar a formação de promastigotas metacíclicas por *L. tarentolae*, o perfil de crescimento *in vitro* desta espécie foi analisado, pois caso um estágio infectivo ocorra, é provável que seja durante a fase estacionária, tendo em vista que neste estágio, os protozoários se encontram em um ambiente escasso de nutrientes e conseguem sobreviver por um período considerável de tempo, sem que alterações significativas no número de células sejam observadas. Essas características são compatíveis com promastigotas metacíclicas, uma vez que estas formas não se multiplicam e são adaptadas à condições adversas, como privação nutricional (PERKINS, 1984; MALLINSON; COOMBS, 1989; SACKS; KAMHAWI, 2001; SACKS). O padrão de crescimento *in vitro* de *L. tarentolae* se mostrou semelhante ao das outras espécies, apresentando fases logarítmica e estacionárias bem definidas.

Os parasitos também foram avaliados quanto à ocorrência de alterações na morfologia ao longo do cultivo *in vitro*, considerando-se que durante a metaciclogênese das espécies que infectam mamíferos, é observada a diminuição do tamanho e da espessura do corpo celular, enquanto que as dimensões do flagelo permanecem inalteradas (ALMEIDA *et al.*, 1993). Na análise por citometria de fluxo baseada no tamanho, uma pequena proporção das células identificadas como pequenas formas foi detectada e se manteve constante durante o cultivo. Contudo, ressalta-se que estas podem não corresponder a promastigotas

metacíclicas, podendo ser resultado de uma cultura não sincronizada, na qual os parasitos podem estar presentes em diferentes estágios de desenvolvimento (SARAIVA et al., 2005; SPÄTH; BEVERLEY, 2001). As espécies que infectam mamíferos apresentam outras formas de promastigotas além de procíclicas e metacíclicas, como as nectomonades e leptomonades. É possível que as pequenas células observadas no experimento com *L. tarentolae* correspondam a algum destes estágios.

Nas outras espécies a ocorrência de metacíclicas é percebida durante todos os estágios do cultivo, mas durante a fase estacionária há um aumento na proporção dessas formas (LOUASSINI et al., 1998). Como não houve alteração na proporção de células com diferentes tamanhos, sugerindo que a ausência de formação de metacíclicas na cultura de *L. tarentolae*. Além de mudanças na morfologia, a metaciclogênese é acompanhada por alterações na composição de carboidratos de membrana, na infectividade, expressão gênica e motilidade (SILVA; SACKS, 1997; SACKS; KAMHAWI, 2001; TURCO; SPÄTH; BEVERLEY, 2001). Com o intuito de determinar se algum destes parâmetros modifica durante o cultivo *in vitro* de *L. tarentolae* indicando a possível formação de metacíclicas, avaliamos se variações ocorrem nos glicoconjugados de membrana por ensaios de aglutinação.

Carboidratos de superfície exercem diversas funções importantes em *Leishmania*, que incluem desde a adesão das promastigotas ao intestino do inseto vetor, à entrada e sobrevivência dos parasitos no interior dos macrófagos (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006). Lectinas são proteínas capazes de reconhecer resíduos específicos de carboidratos e tem sido amplamente empregadas na análise da composição de carboidratos de superfície e na distinção de estágios de desenvolvimento, uma vez que alterações em carboidratos que compõem o LPG ocorrem durante a metaciclogênese (ANDRADE; SARAIVA, 1999; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006; DA SILVA et al., 2015;). Neste estudo, o percentual de aglutinação de promastigotas logarítmicas foi comparado ao de promastigotas em fase estacionária na presença de WGA ou ConA, para avaliar a ocorrência de seleção negativa (ausência de aglutinação) das metacíclicas por alguma das lectinas. As promastigotas de *L. tarentolae* aglutinaram com ambas lectinas, sendo que a aglutinação por ConA demonstra a presença de resíduos de D-manose e/ou D-glicose na superfície destes parasitos, enquanto que a aglutinação com WGA indica a presença de resíduos de N-acetil-D-glicosamina (WILSON; PEARSON, 1984). Todavia, em contraste com estudos anteriores envolvendo espécies dos sub-gêneros *Viannia* e *Leishmania* (WILSON; PEARSON, 1984; MUSKUS et al., 1997), nenhuma diferença foi observada no perfil de aglutinação de *L. tarentolae*, nos diferentes estágios de cultivo, que pudessem sugerir a ocorrência de metaciclogênese em estágios mais avançado do cultivo celular. Ressalta-se, no entanto, que apesar de perfis similares de aglutinação terem sido

observados entre as fases de logarítmica e estacionária de *L. tarentolae*, a ocorrência de modificações na superfície destes parasitos não pode ser excluída, dado que o painel de lectinas utilizado neste trabalho é reduzido e as alterações podem ocorrer em outros alvos que não os reconhecidos por WGA ou ConA. Alternativamente, as diferenças nos resíduos reconhecidos por essas lectinas podem ocorrer entre outros estágios, como de promastigotas para amastigotas.

A ligação diferencial de promastigotas em diferentes estágios de desenvolvimento às lectinas nas espécies patogênicas tem sido associada ao aumento da expressão de gp63 e com alterações estruturais no LPG, que ocorrem durante a metaciclogênese, dificultando a ligação das lectinas aos seus respectivos alvos neste estágio de desenvolvimento (MUSKUS et al., 1997; DA SILVA et al., 2015; SPÄTH; BEVERLEY, 2001). O LPG é o glicoconjugado predominante ( $1-5 \times 10^6$  moléculas/célula) na membrana de promastigotas de espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos (PREVIATO et al., 1997; ILG, THOMAS, 2000). Em contrapartida, esta molécula parece estar ausente nas espécies que infectam répteis (PREVIATO et al., 1997), o que pode por sua vez contribuir para ausência de diferenças de aglutinação de promastigotas logarítmicas e estacionárias de *L. tarentolae* nos ensaios realizados neste trabalho.

Para avaliar esta hipótese, a purificação de LPG a partir de promastigotas em fase logarítmica tardia de *L. tarentolae* foi feita, e a análise da presença deste glicoconjugado a partir do extrato purificado por *western blotting* utilizando o anticorpo CA7AE, que reconhece a unidade repetitiva Gal( $\beta$ 1,4)Man( $\alpha$ 1)-PO<sub>4</sub> do LPG de diversas espécies de *Leishmania*, por exemplo, *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. panamensis* e, com o anticorpo WIC 79.3 que reconhece ramificações laterais do tipo Gal( $\beta$ 1,3), encontrada em espécies como *L. major* e *L. turanica* (MUSKUS et al., 1997; SACKS et al., 2000; VOLF et al., 2014), sugerem a ausência de LPG em *L. tarentolae*.

O reconhecimento das unidades repetitivas do LPG de *L. major* pelo anticorpo CA7AE é prejudicado pela presença das abundantes ramificações laterais (MUSKUS et al., 1997). Devido a isso, algumas cepas desta espécie, por exemplo a *L. major* Friedlin, tem sido extensivamente utilizadas como controle negativo de reatividade do CA7AE. Entretanto, relatos contraditórios podem ser vistos na literatura (MUSKUS et al., 1997). Curiosamente, nas nossas análises, o LPG de *L. major* se mostrou positivo no *western blotting* com este anticorpo e essa reatividade, pode ser decorrente de possíveis diferenças nas condições experimentais utilizadas, ou mesmo à variabilidade entre isolados.

O sequenciamento do genoma *L. tarentolae* não revelou diferenças com o genoma das espécies patogênicas, em relação aos genes que sintetizam o LPG, que pudesse justificar a ausência de LPG nestes parasitos. Contudo, dois genes envolvidos na modificação e adição de cadeia lateral,  $\beta$  1,3 galactosiltransferase e  $\beta$  1,2

arabinosiltransferase, estão presentes em número reduzido de cópias e ausente, em *L. tarentolae*, respectivamente (RAYMOND et al., 2012). Adicionalmente, o gene que codifica LPG3, uma chaperona envolvida na adição de  $\beta$ -galactose ao resíduo de manose na unidade repetitiva do lipofosfoglicano, está presente nesta espécie, mas os níveis de expressão em amastigotas e promastigotas em fase estacionária destes parasitos diferem das espécies patogênicas (AZIZI et al., 2009; PIRDEL, 2016).

O solvente E utilizado no protocolo de extração de LPG foi inicialmente desenvolvido para a obtenção de glicolípídios complexos (ORLANDI; TURCO, 1987) e, alguns estudos prévios reportam o uso desta solução para se obter outros gliconjugados (NEDELEC et al., 1992). Diante da aparente ausência de LPG em *Leishmania tarentolae*, é possível que algum outro glicoconjugado tenha sido obtido durante o processo de extração. Adicionalmente, um proteofosfoglicano ou proteína glicosilada de 100-130 kDa foi reconhecida em western blotting com o extrato protéico usando anticorpo CA7AE. Alguns estudos demonstram que este anticorpo pode reconhecer outros gliconjugados, incluindo a fosfatase ácida secretada (sAP) presente em algumas espécies de *Leishmania* (ILG, T. et al., 1993). Análises posteriores poderão esclarecer se ambas as metodologias possibilitaram a visualização do mesmo composto, bem como a determinação da estrutura e categoria bioquímica.

Em *L. major*, o LPG desempenha papéis importantes na virulência dos parasitos, como resistência à lise pelo sistema de complemento e inibição da fusão dos fagossomos aos lisossomos, enquanto que mutantes de *L. mexicana* deficientes de LPG1 não apresentam comprometimento na sobrevivência e multiplicação no interior dos fagolisossomos das células hospedeiras (ILG, 2000; SPÄTH et al., 2003). Diante da importância do lipofosfoglicano para algumas espécies de *Leishmania*, a provável ausência de LPG em promastigotas de *L. tarentolae*, pode contribuir para a incapacidade de *L. tarentolae* em sobreviver no interior dos macrófagos e em uma maior sensibilidade ao sistema de complemento (RAYMOND et al., 2012).

A gp63 é a glicoproteína mais abundante na superfície de promastigotas, representando um importante fator de virulência em *Leishmania* (SCHNEIDER et al., 1992). Esta protease, juntamente com o LPG, está envolvida na proteção dos parasitos à lise mediada pelo complemento (D'AVILA-LEVY et al., 2014). Outras funções importantes exercidas por esta glicoproteína envolvem a adesão e internalização das promastigotas por fagócitos, a degradação da matriz extracelular e a sobrevivência das amastigotas nos fagolisossomos (BRITTINGHAM et al., 1999; CHEN et al., 2000; MCGWIRE; CHANG; ENGMAN, 2003). *L. tarentolae* possui gp63 e, curiosamente, a família gênica que codifica esta proteína encontra-se expandida nesta espécie, que contém 49 cópias das sequências codificadoras, em comparação à *L. braziliensis* que possui 29, *L. infantum* com 7 e *L. major*

com 5 (RAYMOND *et al.*, 2012).Entretanto, nesta espécie a glicoproteína não apresenta atividade proteolítica (CAMPBELL, KURATH e FLEISCHMANN, 1992; RAYMOND *et al.*, 2012). Diante da importância desta metaloprotease para virulência das espécies patogênicas, buscamos avaliar se alguma outra enzima poderia compensar a perda de atividade proteolítica de gp63.

A análise do perfil de proteases intracelulares e secretadas de *L. tarentolae* por zimografia em SDS-PAGE, copolimerizado com gelatina permitiu identificar a ausência de detecção de atividade proteolítica em nenhuma das duas porções. Contudo, apesar da alta sensibilidade da técnica, a possibilidade de que existam proteases expressas em baixas concentrações ou que apresentem baixa atividade não pode ser descartada. Outras hipóteses incluem a possibilidade de que o pH de 5.5 não é ideal para a atividade destas enzimas ou a especificidade destas proteínas a outros substratos. Neste sentido, experimentos realizados utilizando HPA e azocaseína como substratos demonstraram que o extrato celular de *L. tarentolae* apresenta menor atividade proteolítica que a observada em *Trypanosoma* spp (NORTH; COOMBS; BARRY, 1983). Ensaio de zimografia empregando extrato de *L. tarentolae* realizados em géis SDS-PAGE copolimerizados com hemoglobina bovina apresentaram bandas somente após (24-48h) de incubação em tampão de reação, confirmando a baixa atividade proteolítica de extratos protéicos destes parasitos (NORTH; COOMBS e BARRY, 1983).

Além da alta variabilidade na sequência codificadora de gp63 de *L. tarentolae*, que resulta na ausência da atividade proteolítica desta glicoproteína, estes parasitos não possuem um importante fator de virulência para as espécies patogênicas, a protease subtilisina (CAMPBELL; KURATH; FLEISCHMANN, 1992; RAYMOND *et al.*, 2012). Esta proteína está envolvida no processamento de peroxidases do sistema tripanotonia e, dessa forma, auxilia no balanço redox e na proteção ao estresse oxidativo (SWENERTON *et al.*, 2010). Com base nestas informações, é tentador especular que *L. tarentolae* possua outras proteases sem atividade proteolítica ou que proteases não preditas em espécies patogênicas ou *Trypanosoma* spp. estejam ausentes nessa espécie.

Extratos protéicos de *L. amazonensis* PH8 foram empregados como controles para a atividade proteolítica nos ensaios de zimografia e apresentaram alta atividade proteolítica na faixa de 50 a 150 kDa, o que nos permite validar a ausência da mesma em *L. tarentolae*. Curiosamente, dentre as proteases identificadas por este estudo, uma banda observada entre 50 a 75 kDa possivelmente representa a GP63, diante da abundância desta glicoproteína durante a fase estacionária. Ressalta-se que apesar de EDTA ser um inibidor de metaloproteases, a inibição de gp63 na literatura tem sido reportada apenas pela utilização de 1,10-fenantrolina (MCGWIRE; CHANG; ENGMAN, 2003; SEAY; HEARD; CHAUDHURI, 1996). Contudo, como durante ensaios de zimografia as proteínas não são

desnaturadas e reduzidas completamente, a massa molecular estimada pode não ser representativa da massa real (CUERVO *et al.*, 2006). Em relação à avaliação da presença de atividade proteolítica em sobrenadante de cultura de *L. amazonensis*, proteases de aproximadamente 100 a 250 kDa foram identificadas. No entanto, diante do painel limitado de inibidores empregados, apenas uma protease intracelular e uma secretada desta espécie puderam ser identificadas como prováveis serino-proteases.

Como esperado, diante da possível ausência de LPG e da atividade proteolítica de gp63, *L. tarentolae* se mostrou significativamente mais sensível à lise pelo sistema complemento do que *L. infantum*. A baixa tolerância destes parasitos a baixas concentrações de soro concorda com a capacidade limitada da *L. tarentolae* em sobreviver em mamíferos, tendo em vista que o sistema complemento é uma das primeiras barreiras a ser enfrentadas pelos parasitos durante a infecção (PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002; BRETON *et al.*, 2005).

Até o momento, nossas análises demonstraram diferenças marcantes relacionadas a aspectos pontuais da biologia de espécies patogênicas e *L. tarentolae*. Em um caminho inverso, comparações ômicas podem revelar simultaneamente múltiplos aspectos significativos da biologia dessa espécie, que podem posteriormente serem validados individualmente. Ressalta-se que informações ainda desconhecidas sobre a biologia de *L. tarentolae* incluem aquelas acerca da composição e da variabilidade do metaboloma destes parasitos em comparação às espécies patogênicas. Estes dados podem contribuir para a caracterização da diversidade molecular de *Leishmania spp*, gerando conhecimentos sobre adaptações no metabolismo de cada parasito que possivelmente estão relacionadas às diferenças na capacidade de infectar seus hospedeiros e causar patologias distintas.

A análise genômica comparativa realizada com diferentes espécies de *Leishmania* revelou alta conservação do conteúdo de genes e sintonia, com relativamente poucos genes espécies-específicos. Contudo, a maioria deles possui função desconhecida (PEACOCK *et al.*, 2007). Estudos transcriptômicos demonstraram diferenças significativas no perfil de expressão dos parasitos, mas os esforços para correlacionar a expressão de mRNA e proteínas resultaram em baixa concordância, sendo que essas diferenças estão relacionadas à considerável regulação pós-transcricional, traducional e pós-traducional em *Leishmania* (MCNICOLL *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2010). Assim, a transcriptômica por si só não foi capaz de fornecer as informações necessárias para desvendar aspectos relacionados à diversidade molecular de *Leishmania*.

Os estudos proteômicos têm sido particularmente úteis na detecção de proteínas reguladas em *Leishmania*, devido ao mecanismo característico da regulação da expressão destes parasitos (LEIFSO *et al.*, 2006; MCNICOLL *et al.*, 2006; SCHELTEMA *et al.*, 2010). Como a maioria das proteínas ainda não possui anotação funcional, o uso da proteômica na

caracterização da diversidade molecular destes parasitos ainda é limitado (SCHELTEMA *et al.*, 2010). Diante disso, a metabolômica pode fornecer informações relevantes para complementar dados transcriptômicos e proteômicos e pode ajudar na compreensão da complexidade molecular de *Leishmania*, tendo em vista que o metaboloma é a representação mais próxima do fenótipo, já que a maioria das funções fisiológicas ocorre em nível dos metabólitos (SCHELTEMA *et al.*, 2010).

Neste estudo, o perfil metabólico de promastigotas em fase estacionária de *L. tarentolae* foi analisado comparativamente ao de *L. braziliensis*, *L. major*, *L. amazonensis* e *L. infantum* por GC-MS. As amastigotas são as formas parasitárias responsáveis pelas leishmanioses em humanos, porém, a dificuldade de cultivar axenicamente parasitos neste estágio de desenvolvimento contribui para que a maioria dos estudos seja feita com promastigotas (VINCENT; BARRETT, 2015; WESTROP *et al.*, 2015). Adicionalmente, as formas amastigotas de *L. tarentolae* ainda não foram bem caracterizadas (SIMPSON; HOLZJR, 1988) e esforços para cultivar amastigotas axênicas de *L. tarentolae* em nosso laboratório envolvendo incremento na temperatura de cultivo para 37°C, bem como a acidificação do meio de cultura foram frustrados.

A análise do metaboloma por GC-MS revelou diferenças nítidas entre formas promastigotas na fase estacionária de cultivo das diferentes espécies de *Leishmania* estudadas relacionadas à abundância de compostos envolvidos nas vias de biossíntese de purinas, pirimidinas e esteróis, via das pentoses-fosfato, glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

*Leishmania* e outros tripanossomatídeos não possuem a habilidade de sintetizar purinas pela via *de novo*, precisando obter estes nutrientes dos hospedeiros invertebrados e vertebrados por meio dos transportadores de nucleobases e nucleosídeos (BOITZ *et al.*, 2012; ORTIZ *et al.*, 2007). As purinas participam de diversos processos celulares, como produção de energia, sinalização celular e síntese de ácidos nucléicos (BOITZ *et al.*, 2012). A adição de CGS 15493, um antagonista de receptores de adenosina, às culturas de *L. amazonensis* parece estimular a metaciclo gênese *in vitro* destes parasitos (SERAFIM *et al.*, 2012), o que pode estar relacionado à virulência dos parasitos. O efeito dessa inibição pode ser revertido pela adição de determinados nucleosídeos ou nucleobases, incluindo a adenosina (SERAFIM *et al.*, 2012). Adicionalmente, a captação de hipoxantina pelos parasitos diminui significativamente durante a fase estacionária, estando correlacionada com a expressão reduzida de NT3, um transportador de alta afinidade de nucleobases (ORTIZ *et al.*, 2007). Os níveis de NT4, um transportador de baixa afinidade de adenina, também diminuem durante este estágio (ORTIZ *et al.*, 2007). Por outro lado, os níveis intracelulares de hipoxantina em *L. infantum* e *L. major* se mostraram elevados durante nossas análises. De modo similar, em experimentos realizados em LC-MS com *L. donovani*, uma espécie



próxima de *L. infantum*, foram evidenciadas quantidades altas desta nucleobase durante o 6º dia de cultivo (SILVA, ANA MARTA; CORDEIRO-DA-SILVA; COOMBS, 2011). Já em *L. tarentolae*, hipoxantina e adenosina-5-monofosfato não foram detectadas na análise de GC-MS.

A via das purinas é altamente redundante, dado que durante a biossíntese tanto nucleosídeos, quanto nucleobases podem ser utilizados (BOITZ *et al.*, 2012; NADERER; MCCONVILLE, 2008). Dessa forma, a baixa concentração intracelular de hipoxantina em *L. amazonensis* e *L. braziliensis* pode ser compensada por níveis maiores de adenosina-5-monofosfato. As diferenças nas concentrações destes metabólitos entre as espécies podem indicar expressão diferencial dos transportadores ou preferência pela utilização de determinado substrato. Em contraste à via das purinas, *Leishmania* é capaz de sintetizar pirimidinas *de novo* e de captar estes nutrientes dos hospedeiros (SOYSA *et al.*, 2013). Uracil fosforribosiltransferase (UPRT) é a enzima responsável pela incorporação de pirimidinas exógenas pré-formadas ao *pool* de nucleotídeos dos parasitos. Para isso, os precursores são convertidos à uracila e em seguida fosforribosilados para uridina monofosfato por esta enzima (SOYSA *et al.*, 2013). A presença de quantidades reduzidas de uridina monofosfato em *L. tarentolae* pode ser decorrente do menor número de cópias da sequência codificadora de UPRT no genoma desta espécie (RAYMOND *et al.*, 2012). Nos fagolisossomos dos macrófagos, os parasitos passam por escassez de diversos nutrientes e a presença de quantidades significativas de compostos como os precursores de purinas pode facilitar a diferenciação para amastigotas (SILVA; CORDEIRO-DA-SILVA; COOMBS, 2011). Assim, a menor abundância desses compostos nitrogenados em *L. tarentolae* pode estar associada à limitação na capacidade de diferenciação em formas amastigotas, assim como menor sobrevivência das mesmas em macrófagos.

Análise proteômica da metaciclo-gênese de *L. infantum* revelou que diversas enzimas que compõem a via das pentoses-fosfato, responsável pela produção de NADPH e pentoses, apresentam maior expressão em promastigotas metacíclicas (MOREIRA *et al.*, 2014). A superexpressão destas enzimas pode indicar a contribuição da via na produção de substratos para abastecer a glicólise, além disso, o incremento na produção de NADPH pode ajudar a prevenir o estresse oxidativo (MOREIRA *et al.*, 2014). A avaliação em nível metabólico demonstrou que o 6-fosfogliconato e a ribose-5-fosfato encontram-se presentes em menor abundância em *L. tarentolae*, o que pode colaborar para a maior sensibilidade destes parasitos às espécies reativas de oxigênio (RAYMOND *et al.*, 2012).

Os níveis de L-ornitina, um aminoácido sintetizado a partir da hidrólise enzimática de L-arginina pela arginase (WANASEN; SOONG, 2008), se mostraram menores em *L. tarentolae*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. A descarboxilação de L-ornitina pela ornitina descarboxilase gera a putrescina e, estes compostos juntamente com a espermidina

alimentam a maquinaria antioxidante dos parasitos (MANDAL *et al.*, 2016). Apesar das diferenças na abundância de ornitina, concentrações equiparáveis de putrescina foram observadas nas diferentes espécies, ressaltando a importância desta via na proteção ao estresse oxidativo. Esses achados podem indicar uma maior dependência de *L. tarentolae* desta via para o balanço redox.

Outras diferenças marcantes no metabolismo energético e de carboidratos foram observadas durante a fase estacionária de cultivo de *L. tarentolae*. Estudos anteriores demonstram que à medida que promastigotas das espécies patogênicas entram neste mesmo estágio de crescimento ocorre um aumento no consumo de glicose, o que foi constatado pelo maior nível de produção de enzimas participantes da glicólise e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (MOREIRA *et al.*, 2014; LOUASSINI *et al.*, 1998). Estas alterações podem ser reflexo da necessidade da geração de energia para a remodelagem intracelular e diferenciação dos parasitos para promastigotas metacíclicas (MOREIRA *et al.*, 2014). Em contraste, metabólitos como glicose-6-fosfato, fosfoenolpiruvato e citrato encontram-se pouco abundantes em *L. tarentolae*. Interessantemente, os genes para as enzimas do tipo glicocinase-1 e citrato sintase estão presentes nesta espécie em número maior de cópias (RAYMOND *et al.*, 2012), o que pode resultar em acentuado catabolismo de carboidratos ao longo do cultivo e, conseqüentemente, a diminuição da disponibilidade destes substratos na fase estacionária. Além disso, estes protozoários não passam por alterações morfológicas drásticas, como foi demonstrado pela análise por citometria de fluxo, sugerindo que quantidade elevada de ATP não seria necessária por estes parasitos durante este estágio. Por outro lado, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos de *L. tarentolae* pode ser abastecido por aporte de fumarato, gerado a partir do metabolismo de tirosina, devido aos maiores níveis de tirosina e fenilactato que são componentes desse processo catabólico, em comparação aos metabólitos que participam do ciclo.

O ergosterol representa um importante componente de membrana em *Leishmania*, sendo encontrado nas balsas lipídicas (YAO; WILSON, 2016). Durante a metaciclogênese, a concentração deste e de outros esteróis altera significativamente, de modo que a quantidade desses compostos é aproximadamente duas vezes menor em promastigotas metacíclicas purificadas, do que em culturas mistas de promastigotas em fase estacionária (YAO; WILSON, 2016). Os níveis de ergosterol são também menores em promastigotas metacíclicas do que em procíclicas (YAO; WILSON, 2016). Em relação às outras espécies, a abundância deste composto em *L. amazonensis* PH8 se mostrou consideravelmente menor, o que, segundo os autores, pode se correlacionar com a possível presença de quantidades maiores de formas infectivas nesta cepa, que pode apresentar até cerca de 70-80% de metacíclicas na fase estacionária de cultivo (DA SILVA, *et al.*, 2015).

As variações nos níveis de esteróis de *Leishmania* durante o desenvolvimento dos parasitos indicam que esses compostos potencialmente estão envolvidos na virulência (YAO; WILSON, 2016). Além disso, são observadas diferenças no conteúdo de esteróis de membrana do hospedeiro vertebrado e do protozoário, assim como, existem diferenças na biossíntese desses compostos entre estes organismos (MACCALL *et al.*, 2015). Diante da crescente resistência e da ocorrência de sérios efeitos colaterais no tratamento das leishmanioses (BRETON *et al.*, 2005; DOLSTÁLOVÁ e VOLF, 2012), estas vias tem se mostrado como alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. É importante ressaltar que diferenças em alguns precursores de ergosterol, como o esqualeno e lanosterol, foram observadas entre as espécies usadas por este estudo. Apesar de sutis, estas variações podem apontar para diferenças no metabolismo de esteróis, evidenciando o potencial destas vias para o desenvolvimento de novas drogas.

Os achados descritos neste estudo ressaltam o potencial da metabolômica na identificação de aspectos distintos no metabolismo de cada espécie que podem estar envolvidas com os diferentes comportamentos biológicos e na sua relação com o hospedeiro. Além disso, foram caracterizados vários aspectos da biologia de *L. tarentolae* que permitem a sua melhor utilização como modelo para estudos relacionados à genômica funcional, identificação de fatores de virulência, desenvolvimento de vacinas e de novos alvos terapêuticos.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem sugerir que *L. tarentolae* não sofre alterações morfológicas e na composição/estrutura de carboidratos de membrana, durante as fases de seu cultivo axênico e, portanto, indicando que promastigotas metacíclicas possivelmente não formadas por esta espécie. Promastigotas de *L. tarentolae* provavelmente não possuem LPG e sua gp63 não apresenta atividade proteolítica. Adicionalmente, nenhuma outra protease intracelular ou secretada foi observada nestes parasitos, o que em conjunto resulta em parasitos altamente susceptíveis ao sistema complemento.

O perfil metabólico da espécie não-patogênica diferiu claramente das demais espécies estudadas e patogênicas para humanos, exibindo menor abundância ou mesmo a ausência de diversos metabólitos, durante a fase estacionária de desenvolvimento. Compostos envolvidos na biossíntese de purinas, pirimidinas e esteróis, via das pentoses-fosfato, glicólise e ciclo dos ácidos tricarbóxicos se mostraram particularmente alterados entre os parasitos das diferentes espécies analisadas.

## REFERÊNCIAS

- ABU-DAYYEH, Issa *et al.* Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 6, p. 2438–2445, 2010.
- ADLER, S. The behavior of a lizard leishmania in hamsters and baby mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 4, n. 2, p. 61–64, 1962.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALEXANDER, J; COOMBS, G H; MOTTRAM, J C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *Journal of immunology*, v. 161, n. 12, p. 6794–6801, 1998.
- ALMEIDA, Marcos C. *et al.* Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in vitro: Evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 3, p. 325–329, 1993.
- ALVAR, Jorge *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES-FERREIRA, Eliza V.C. *et al.* Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. 1–19, 2015.
- ANDRADE, A. F B; SARAIVA, E. M B. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitology Research*, v. 85, n. 7, p. 576–581, 1999.
- ARJMAND, Mohammad *et al.* Metabolomics-based study of logarithmic and stationary phases of promastigotes in *Leishmania major* by 1H NMR Spectroscopy. *Iranian Biomedical Journal*, v. 20, n. 2, p. 77–83, 2016.
- AZIZI, H *et al.* Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. *Parasitology*, v. 136, n. 7, p. 723–35, 2009.
- BASILE, Giancarlo; PETICCA, Manuela. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology*, v. 43, n. 3, p. 273–278, 2009.

- BATES, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BELO, Viius Silva *et al.* Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 4, 2013.
- BERG, Maya *et al.* Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. *Molecular Microbiology*, v. 90, n. 2, p. 428–442, 2013.
- BOITZ, Jan M. *et al.* Purine salvage in *Leishmania*: Complex or simple by design? *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 8, p. 345–352, 2012.
- BRAVO-BARRIGA, Daniel *et al.* First molecular detection of *Leishmania tarentolae*-like DNA in *Sergentomyia minuta* in Spain. *Parasitology Research*, v. 115, n. 3, p. 1339–1344, 2016.
- BREITLING, Reinhard *et al.* Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expression and Purification*, v. 25, n. 2, p. 209–218, 2002.
- BRETON, Marie *et al.* Live Nonpathogenic Parasitic Vector as a Candidate Vaccine against Visceral. v. 73, n. 10, p. 6372–6382, 2005.
- BRITTINGHAM, Andrew *et al.* Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 9, p. 4477–4484, 1999.
- BROBEY, R K B *et al.* Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2006.
- CAMPBELL, David A.; KURATH, Ursula; FLEISCHMANN, Jacob. Identification of a gp63 surface glycoprotein in *Leishmania tarentolae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 96, n. 1, p. 89–92, 1992.
- CANTACESSI, Cinzia *et al.* The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*, v. 31, n. 3, p. 100–108, 2015.
- CANUTO, Gisele *et al.* Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in *Leishmania*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, n. 14, p. 3459–3476, 2014.
- CHAPPUIS, François *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis,

treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHEN, De Qiao *et al.* Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: Modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 1, p. 80–86, 2000.

CLAYTON, Christine; SHAPIRA, Michal. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 156, n. 2, p. 93–101, 2007.

COHEN-FREUE, Gabriela *et al.* Global gene expression in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1077–1086, 2007.

CREEK, Darren J. *et al.* Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 181, n. 2, p. 73–84, 2012.

CROAN, D G; MORRISON, D A; ELLIS, J T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol*, v. 89, n. 2, p. 149–159, 1997.

CRUZ, I *et al.* *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *The Lancet*, v. 359, p. 1124–1125, 2002.

CUERVO, P *et al.* A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Parasitology*, v. 132, n. Pt 2, p. 177–185, 2006.

D'AVILA-LEVY, Claudia M. *et al.* GP63 Function in the Interaction of Trypanosomatids with the Invertebrate Host: Facts and Prospects. *Sub-cellular biochemistry*. [S.l: s.n.], 2014. v. 74. p. 253–270.

DA SILVA, Ildelfonso Alves *et al.* In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *BioMed Research International*, v. 2015, n. Lcl, 2015.

DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 11, p. 2802–2806, 1987.

DAMATA, Jarina Pena *et al.* Distinct macrophage fates after in vitro infection with different species of *Leishmania*: Induction of apoptosis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, but

not by *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, 2015.

DAVID, Consuelo V; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

DAWIT, G. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, v. 4, p. 2–7, 2013.

DE ASSIS, Rafael Ramiro *et al.* Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012.

DE SOUZA LEAO, S *et al.* Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of cell science*, v. 108, p. 3219–3231, 1995.

DEPLEDGE, Daniel P. *et al.* Comparative expression profiling of *Leishmania*: Modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 7, 2009.

DESCOTEAUX, Albert; TURCO, Salvatore J. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 9, p. 975–981, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DILLON, Laura A L *et al.* Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania* major differentiation. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 14, p. 6799–6813, 2015.

DOLLAHON, N R; JANOVY, J. Experimental Infection of New World Lizards with Old World Lizard *Leishmania* Species '. *Experimental Parasitology*, v. 36, p. 253–260, 1974.

DOSTÁLOVÁ, Anna; VOLF, Petr. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, v. 5, p. 276, 2012.

ELWASILA, Mohamed. *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentola annularis* in the Sudan. *Parasitology Research*, v. 74, p. 591–592, 1988.



- FERNANDES, Ana Paula *et al.* A2 and Other Visceralizing Proteins of Leishmania: Role in Pathogenesis and Application for Vaccine Development. [S.l.]: Springer, Dordrecht, 2014. p. 77–101.
- FERNANDES, Maria Cecilia *et al.* Dual Transcriptome Profiling of. v. 7, n. 3, p. 1–16, 2016.
- FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 155–171, 2002.
- GARCIA, Antonia; BARBAS, Coral. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-Based Metabolomics. *Methods in molecular biology*. [S.l.: s.n.], 2011. v. 708. p. 191–204.
- GARCIA, Lineth *et al.* Culture-Independent Species Typing of Neotropical. *Society*, v. 42, n. 5, p. 2294–2297, 2004.
- GOTO, Hiro; LAULETTA LINDOSO, José Angelo. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.
- HAJJARAN, Homa *et al.* Comparison of the Proteome Profiling of Iranian isolates of *Leishmania tropica*, *L. major* and *L. infantum* by Two- Dimensional Electrophoresis (2-DE) and Mass-spectrometry. *Iran J Parasitolog*, v. 10, n. 4, p. 530–540, 2015.
- HARHAY, Michael O. *et al.* Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.
- HERWALDT, Barbara L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.
- ILG, T. *et al.* Monoclonal antibodies directed against *Leishmania* secreted acid phosphatase and lipophosphoglycan. Partial characterization of private and public epitopes. *European Journal of Biochemistry*, v. 217, n. 2, p. 603–615, 1993.
- ILG, Thomas. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *The EMBO journal*, v. 19, n. 9, p. 1953–1962, 2000.
- ILG, Thomas *et al.* Monoclonal antibodies to *Leishmania mexicana* promastigote antigens I . Secreted acid phosphatase and other proteins share epitopes with lipophosphoglycan. *J. of Cell Science*, v. 99, n. 1, p. 175–180, 1991.
- IVENS, Alasdair C *et al.* NIH Public Access. v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2006.
- LAFFITTE, Marie-Claude N. *et al.* Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Research*, v. 5, p. 2350, 2016.

- LASKAY, Tamás; VAN ZANDBERGEN, Ger; SOLBACH, Werner. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.
- LEIFSO, Kirk *et al.* Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 152, n. 1, p. 35–46, 2007.
- LIPOLDOVÁ, Marie; DEMANT, Peter. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature reviews. Genetics*, v. 7, n. 4, p. 294–305, 2006.
- LOUASSINI, Mostafa *et al.* Investigations on the in vitro metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, v. 70, n. 3, p. 355–368, 1998.
- MALLINSON, D J; COOMBS, G H. Biochemical characteristics of the metacyclic forms of *Leishmania major* and *L. mexicana mexicana*. *Parasitology*, v. 98 ( Pt 1), n. July 1988, p. 7–15, 1989.
- MANDAL, Abhishek *et al.* Deprivation of L-Arginine Induces Oxidative Stress Mediated Apoptosis in *Leishmania donovani* Promastigotes: Contribution of the Polyamine Pathway. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1–26, 2016.
- MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. *Medical microbiology and immunology*, p. 37–42, 2001.
- MCCALL, Laura Isobel; MATLASHEWSKI, Greg. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: Evidence that A2 is a stress response protein. *Molecular Microbiology*, v. 77, n. 2, p. 518–530, 2010.
- MCCALL, Laura Isobel; ZHANG, Wen Wei; MATLASHEWSKI, Greg. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 1, 2013.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *Qjm*, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.
- MCGWIRE, Bradford S.; CHANG, Kwang Poo; ENGMAN, David M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 2, p. 1008–1010, 2003.
- MCNICOLL, François *et al.* A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v. 6, n. 12, p. 3567–3581, 2006.

- MIZBANI, Amir *et al.* Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*. *Parasitology Research*, v. 109, n. 3, p. 793–799, 2011.
- MIZBANI, Amir *et al.* Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 28, n. 1, p. 53–62, 2009.
- MOMEN, Hooman; CUPOLILLO, Elisa. Speculations on the Origin and Evolution of the Genus *Leishmania*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 4, p. 583–588, 2000.
- MOREIRA, Wilfried *et al.* Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutant. *EuPA Open Proteomics*, v. 4, p. 171–183, 2014.
- MURRAY, Henry W. *et al.* Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- MUSKUS, C. *et al.* Carbohydrate and LPG Expression in *Leishmania viannia* Subgenus. *J. Parasitol.*, v. 83, n. 4, p. 671–678, 1997.
- NADERER, Thomas; MCCONVILLE, Malcolm J. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cellular Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.
- NEDELEC, J *et al.* Isolation and characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoconjugate expressed by developing neurons. *European journal of biochemistry*, v. 203, n. 3, p. 433–42, 1 fev. 1992.
- NIIMI, Tomoaki. Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite *Leishmania tarentolae*: A Review. [S.l: s.n.], 2012. p. 307–315.
- NÓBREGA DE SOUSA, Taís; DE MENEZES NETO, Armando; ALVES DE BRITO, Cristiana Ferreira. “Omics” in the study of the major parasitic diseases malaria and schistosomiasis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 19, p. 258–273, 2013.
- NORTH, Michael J; COOMBS, Graham H; BARRY, J David. A comparative study of the proteolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. vivax*, *Leishmania tarentolae* and *Crithidia fasciculata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 9, p. 161–180, 1983.
- NOVO, S *et al.* *Leishmania tarentolae* molecular signatures in a 300 hundred-years-old human Brazilian mummy. *Parasit Vectors*, v. 8, n. 1, p. 72, 2015.
- NOYES, Harry A. *et al.* *Leishmania* (*Sauroleishmania*): a comment on classification.

*Parasitology Today*, v. 14, n. 4, p. 167, 1998.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 2, p. 293–305, 1 abr. 2005.

OLIVIER, Martin *et al.* Leishmania virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.

ORLANDI, P. A.; TURCO, S. J. Structure of the lipid moiety of the Leishmania donovani lipophosphoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262, n. 21, p. 10384–10391, 1987.

ORLANDO, Tereza C. *et al.* Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting Leishmania: Molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting Leishmania in the subgenus Leishmania (Leishmania). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5, p. 695–701, 2002.

ORTIZ, Diana *et al.* Molecular genetic analysis of purine nucleobase transport in Leishmania major. *Molecular Microbiology*, v. 64, n. 5, p. 1228–1243, 2007.

PAGET, Timothy *et al.* Metabolomics and protozoan parasites. *Acta parasitologica / Witold Stefański Institute of Parasitology, Warszawa, Poland*, v. 58, n. 2, p. 127–31, 2013.

PAGLIANO, Pasquale *et al.* Visceral leishmaniasis in pregnancy: A case series and a systematic review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, n. 2, p. 229–233, 2005.

PEACOCK, Christopher S *et al.* Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PETERS, Nathan C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2009.

PINEDA, Tatiana *et al.* A non-commercial approach for the generation of transgenic Leishmania tarentolae and its application in antileishmanial drug discovery. *Parasitology*, v. 143, n. 9, p. 1133–42, 2016.

PINTO-DA-SILVA, Lucia H. *et al.* Leishmania (Viannia) braziliensis metacyclic promastigotes purified using Bauhinia purpurea lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 11, p. 1371–1377, 2002.

PIRDEL, Leila. Comparison of the Lipophosphoglycan 3 Gene of the Lizard and Mammalian Leishmania: A Homology Modeling. *Research in Molecular Medicine*, v. 4, n. 2, p. 15–23, 2016.

PREVIATO, J. O. *et al.* Leishmania adleri a lizard parasite, expresses structurally similar glycoinositolphospholipids to mammalian Leishmania. *Glycobiology*, v. 7, n. 5, p. 687–695, 1997.

PROBST, Christian M *et al.* A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to Leishmania amazonensis infection. *BMC microbiology*, v. 12, n. 1, p. 22, 2012.

RAYMOND, Frédéric *et al.* Genome sequencing of the lizard parasite Leishmania tarentolae reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2012.

REAL, Fernando *et al.* Cell-to-cell transfer of Leishmania amazonensis amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cellular Microbiology*, v. 16, n. 10, p. 1549–1564, 2014.

REAL, Fernando *et al.* The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Research*, v. 20, n. 6, p. 567–581, 2013.

REITHINGER, Richard *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet*, v. 8, n. August, p. 8–9, 2007.

ROCHETTE, Annie *et al.* Genome-wide gene expression profiling analysis of Leishmania major and Leishmania infantum developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC genomics*, v. 9, p. 255, 2008.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Isabel *et al.* Identification and biochemical characterization of Leishmania strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Experimental Parasitology*, v. 112, n. 1, p. 44–51, 2006.

ROGERS, Matthew B *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.*, v. 21, p. 2129–2142, 2011.

ROJO, David *et al.* A multiplatform metabolomic approach to the basis of antimonial action and resistance in Leishmania infantum. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, v. 55, p. 453–83, 2001.

SACKS, D L *et al.* The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 1, p. 406–411, 2000.

SACKS, D L; HIENY, S; SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of Leishmania major promastigotes. *Journal of immunology*, v. 135, n. 1, p. 564–9, jul. 1985.

SACKS, David L. Metacyclogenesis in Leishmania. *Experimental Parasitology*, v. 69, p. 100–103, 1989.

SACKS, David L.; PERKINS, P. V. Identification of an Infective Stage of Leishmania Promastigotes Abstract. *Science*, v. 223, n. 46t43, p. 1417–1419, 1984.

SALJOUGHIAN, Noushin; TAHERI, Tahareh; RAFATI, Sima. Live vaccination tactics: Possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. MAR, p. 1–11, 2014.

SALOTRA, Poonam; RALHAN, Ranju; SREENIVAS, G. Heat-stress induced modulation of protein phosphorylation in virulent promastigotes of Leishmania donovani. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 32, n. 3, p. 309–316, 2000.

SARAIVA, Elvira M. *et al.* Flow cytometric assessment of Leishmania spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology*, v. 110, n. 1, p. 39–47, 2005.

SHELTEMA, Richard *et al.* The potential of metabolomics for Leishmania research in the post-genomics era. *Parasitology*, v. 137, n. 9, p. 1291–1302, 2010.

SCHNEIDER, Pascal *et al.* Leishmania major: Differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Experimental Parasitology*, v. 75, n. 2, p. 196–206, 1992.

SEAY, Michael B.; HEARD, Pamela L.; CHAUDHURI, Gautam. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of Leishmania mexicana amazonensis promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 12, p. 5129–5137, 1996.

SERAFIM, Tiago Donatelli *et al.* Leishmania Metacyclogenesis Is Promoted in the Absence

of Purines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 9, 2012.

SHAPIRA, Michal *et al.* Post transcriptional control of gene expression in Leishmania. *Med Microbiol Immunol.*, v. 190, n. 1–2, p. 23–6, 2001.

SHARMA, Paresh *et al.* Comparative in vivo expression of amastigote up regulated Leishmania genes in three different forms of Leishmaniasis. *Parasitology International*, v. 59, n. 2, p. 262–264, 2010.

SILVA-ALMEIDA, Mariana *et al.* Proteinases as virulence factors in Leishmania spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors*, v. 5, n. 1, p. 160, 2012.

SILVA, Ana Marta; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; COOMBS, Graham H. Metabolic variation during development in culture of leishmania donovani promastigotes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 12, 2011.

SIMPSON, L; HOLZJR, G. The Status of Leishmania tarentolae / Trypanosoma platydictyli. v. 4, n. 4, p. 115–118, 1988.

SMITH, Deborah F.; PEACOCK, Christopher S.; CRUZ, Angela K. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniases. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 11, p. 1173–1186, 2007.

SOYSA, Radika *et al.* Substrate inhibition of uracil phosphoribosyltransferase by uracil can account for the uracil growth sensitivity of leishmania donovani pyrimidine auxotrophs. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 41, p. 29954–29964, 2013.

SPÄTH, Gerald F *et al.* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 16, p. 9536–9541, 2003.

SPÄTH, Gerald F.; BEVERLEY, Stephen M. A Lipophosphoglycan-Independent Method for Isolation of Infective Leishmania Metacyclic Promastigotes by Density Gradient Centrifugation. *Experimental Parasitology*, v. 99, n. 2, p. 97–103, 2001.

STERKERS, Yvon *et al.* Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: Mosaic aneuploidy in Leishmania. *Molecular Microbiology*, v. 86, n. 1, p. 15–23, 2012.

SUGIMOTO, Masahiro *et al.* Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. *Current Bioinformatics*, v. 7, n. 1, p. 96–108, 2012.

- SWENERTON, Ryan K. *et al.* Leishmania subtilisin is a maturase for the trypanothione reductase system and contributes to disease pathology. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 41, p. 31120–31129, 2010.
- T'KINDT, Ruben *et al.* Metabolomics to unveil and understand phenotypic diversity between pathogen populations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 11, 2010.
- TAYLOR, Viviana M. *et al.* Leishmania tarentolae: Utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. *Experimental Parasitology*, v. 126, n. 4, p. 471–475, 2010.
- TELFORD JR, S.R. Haemoparasites of reptiles. *Diseases of Amphibians and Reptiles*. [S.l.]: Springer US, 1984. p. 385–517.
- TURCO, S J; SPÄTH, G F; BEVERLEY, S M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species. *Trends in parasitology*, v. 17, n. 5, p. 223–6, maio 2001.
- VALDIVIA, Hugo O *et al.* Comparative genomic analysis of Leishmania (Viannia) peruviana and Leishmania (Viannia) braziliensis. *BMC genomics*, v. 16, n. 1, p. 715, 2015.
- VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.
- VINCENT, Isabel M.; BARRETT, Michael P. Metabolomic-Based Strategies for Anti-Parasite Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 20, n. 1, p. 44–55, jan. 2015a.
- VOLF, Petr *et al.* Structural comparison of lipophosphoglycan from Leishmania turanica and L. major, two species transmitted by Phlebotomus papatasi. *Parasitology International*, v. 63, n. 5, p. 683–686, 2014.
- WANASEN, Nanchaya; SOONG, Lynn. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. *Immunologic Research*, v. 41, n. 1, p. 15–25, 27 maio 2008.
- WESTROP, Gareth D. *et al.* Metabolomic analyses of Leishmania reveal multiple species differences and large differences in Amino Acid Metabolism. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, 2015.
- WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Stage-specific variations in lectin binding to Leishmania donovani. *Infection and Immunity*, v. 46, n. 1, p. 128–134, 1984.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE. Control of leishmaniasis - WHO Technical report series. v. 949, p. 1-186, 2010.



WORLEY, Bradley; POWERS, Robert. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2013.

YAO, Chaoqun; WILSON, Mary E. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. *Parasites & vectors*, v. 9, n. 1, p. 200, 2016.

ZHANG, Wen Wei *et al.* Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 37, p. 35508–35515, 2003.

ZHANG, Wen Wei *et al.* Genetic Analysis of *Leishmania donovani* Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 7, 2014.

ZHANG, Wen Wei; MATLASHEWSKI, Greg. Screening *Leishmania donovani*-specific genes required for visceral infection. *Molecular Microbiology*, v. 77, n. 2, p. 505–517, 2010.

## ANEXO I

**Fold change de metabólitos estatisticamente significativos diferencialmente expressos entre as espécies de *Leishmania*.**

Metabólito	L. maj x L. inf	L. maj x L. bra	L. maj x L. ama	L. bra x L. inf	L. bra x L. ama	L. tar x L. bra	L. tar x L. maj	L. tar x L. inf	L. tar x L. ama	L. inf x L. ama
Ácido fumárico	1.083	1.132	1.298	NSE	1.147	0.847	0.748	0.811	NSE	1.199
Ácido málico	1.034	1.067	1.123	NSE	1.053	0.962	0.902	0.933	NSE	1.086
Ácido p-hidróxifenilático	2.245	NSE	1.395	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE
Ácido cítrico	NSE	1.606	2.204	NSE	NSE	0.266	0.165	0.226	NSE	NSE
Ácido 3-fenilático	2.071	1.208	1.159	NSE	NSE	NSE	0.735	NSE	NSE	0.560
Adenina	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	0.949	0.966
Adenosina-5-monofosfato	1.695	NSE	3.809	NSE	NSE	0.00	0.000	0.000	NSE	NSE
Hipoxantina	NSE	6.446	9.128	NSE	NSE	NSE	0.000	NSE	NSE	6.516
Uracila	NSE	NSE	1.289	NSE	NSE	NSE	0.705	0.786	NSE	NSE
Uridina-5-monofosfato	1.696	1.482	2.058	NSE	NSE	0.326	0.220	0.373	NSE	NSE
Ácido aspártico	0.908	NSE	1.149	0.885	1.119	1.095	1.067	NSE	1.226	NSE
Homoserina	NSE	NSE	1.244	NSE	1.183	NSE	NSE	0.956	1.236	1.293
Isoleucina	NSE	0.930	0.958	NSE	NSE	0.865	0.929	0.896	0.891	NSE
Leucina	0.950	1.133	1.161	0.839	NSE	0.896	0.791	0.752	0.918	1.222
Lisina	NSE	3.166	9.069	NSE	NSE	NSE	0.000	NSE	NSE	6.605
Metionina	NSE	1.169	1.121	0.845	NSE	NSE	0.829	0.820	0.930	1.135
Ornitina	NSE	NSE	5.329	NSE	3.788	0.117	0.083	0.099	NSE	4.487
Fenilalanina	1.08	1.111	1.310	NSE	1.180	0.744	0.670	0.742	0.878	1.183
Prolina	0.752	0.913	0.829	0,824	0.908	0.783	0.857	0.645	0.711	1.102
Serina	1.062	1.185	1.242	0.897	1.048	0.931	0.786	0.835	NSE	1.169
Treonina	0.818	NSE	NSE	0.815	0.949	0.904	0.901	0.737	0.858	1.165
Trans-4-hidróxi-L-prolina	0.873	0,879	1.052	NSE	1.196	0.748	0.850	0.742	0.894	1.205
Tirosina	NSE	NSE	1.587	NSE	NSE	NSE	0.637	0.697	NSE	1.452
Melezitose	1.298	2.164	1.370	0.600	NSE	NSE	0.433	0.562	0.593	NSE.

Metabólito	L. maj x L. inf	L. maj x L. bra	L. maj x L. ama	L. bra x L. inf	L. bra x L. ama	L. tar x L. bra	L. tar x L. maj	L. tar x L. inf	L. tar x L. ama	L. inf x L. ama
Sucrose	NSE	NSE	1.123	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE.
Ácido-3-fosfoglicérico	1.139	1.229	1.3	NSE	NSE	NSE	0.768	NSE	NSE	NSE.
Alo-inositol	0.958	0.917	NSE	NSE	1.114	0.754	0.822	0.788	0.840	1.066.
Ácido glucônico	1.070	1.047	1.113	0.880	1.063	0.843	0.805	0.861	0.896	NSE
Glicose-6-fosfato	1.625	2.571	1.717	NSE	NSE	NSE	0.147	0.240	0.253	NSE
Ácido glicérico	0.922	NSE	1.085	0.895	1.053	1.143	1.110	NSE	1.203	1.176
Manitol / xilitol	0.948	NSE	NSE	NSE	1.047	0.889	0.909	0.861	0.931	1.081
Ribose-5-fosfato	NSE	1.641	1.855	NSE	NSE	0.264	0.161	0.221	NSE	NSE
1-metil nicotinamida	NSE	1.182	1.333	NSE	1.128	0.882	0.746	0,797	NSE	1.247
Putrescina	0.905	NSE	1.063	0.907	NSE	NSE	NSE	0.921	1.082	1.175
Uréia	NSE	NSE	1.013	NSE	NSE	1.013	1.010	NSE	1.023	1.014
Ácido fosfoenolpirúvico	NSE	NSE	3.898	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	3.872
Ácido 6-fosfoglicônico	1.185	1.185	1.773	NSE	NSE	0.211	0.178	0.211	0.315	1.496
Glicerol-1-fosfato	1.192	1.349	1.452	NSE	NSE	1.198	NSE	NSE	1.289	1.219
Glucolactona	1.124	1.277	1.074	NSE	0.841	1.078	0.844	NSE	0.907	NSE
Ácido linoléico	1.274	1.415	1.253	0.900	NSE	NSE	0.633	0.806	0.793	NSE
Ácido araquidônico	1.076	NSE	1.080	NSE	NSE	0.850	0.855	0.920	0.923	NSE
Ácido beénico	NSE	NSE	1.123	NSE	1.095	0.913	0.891	0.899	NSE	1.112
Colesterol	1.050	1.078	1.169	NSE	1.085	NSE	0.930	NSE	1.087	1.114
Ergosterol	1.058	NSE	4.337	1.081	4.429	0.591	0.604	0.639	2.620	4.099
Lanosterol	NSE	0.857	NSE	1.162	NSE	0.535	0.624	0.622	0.618	NSE
Ácido Oléico	1.127	1.259	1.185	0.895	NSE	NSE	0.777	0.876	NSE	NSE
Esqualeno	0.964	0.834	0.922	1.157	1.106	0.929	1.114	NSE	NSE	0.956

Os valores de *fold change* foram calculados para os metabólitos que foram considerados estatisticamente significativos por estatística univariada e multivariada em pelo menos uma comparação de duas espécies. Apenas o ácido piperídico não se mostrou significativo e não foi incluído nas análises posteriores. NSE: não estatisticamente significativo. Legendas: *L. maj*: *L. major* Friedlin; *L. tar*: *L. tarentolae* LV-414; *L. bra*: *L. braziliensis* M2904; *L. inf*: *L. infantum* PP75; *L. ama*: *L. amazonensis* PH8.