

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

JÉSSICA GARDONE VITÓRIO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE UMA  
LINHAGEM MUTANTE DE *Leishmania braziliensis* RESISTENTE À  
TUNICAMICINA

Belo Horizonte - MG  
2018

Jéssica Gardone Vitório

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE UMA LINHAGEM  
MUTANTE DE *Leishmania braziliensis* RESISTENTE À TUNICAMICINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Professora Dra. Adriana Oliveira

Coorientador: Dr. Juliano Simões de Toledo, UFMG e Professora Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, UFMG.

Belo Horizonte - MG

2018

V845c Vitório, Jéssica Gardone.  
Caracterização morfológica e bioquímica de uma linhagem mutante de *Leishmania braziliensis* resistente à tunicamicina / Jéssica Gardone  
Vitório – 2018.  
67 f. : il.

Orientadora: Adriana Oliveira.  
Coorientador: Juliano Simões de Toledo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Leishmaniose – Tratamento – Teses. 2. *Leishmania braziliensis* – Teses. 3. Tunicamicina – Teses. 4. Hemoglobina glicosilada – Teses. 5. Metabolômica – Teses. I. Oliveira, Adriana. II. Toledo, Juliano Simões de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.9364



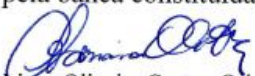
## FOLHA DE APROVAÇÃO

### CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE UMA LINHAGEM MUTANTE DE *Leishmania braziliensis* RESISTENTE À TUNICAMICINA

#### JÉSSICA GARDONE VITÓRIO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 21 de março de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Adriana Oliveira Costa - Orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof. Juliano de Simões Toledo  
UFMG

  
Prof. Rafael Ramiro de Assis  
Centro de Pesquisa Rene Rachou

  
Prof. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo  
UFMG

  
Prof. Ana Paula Salles Moura Fernandes  
Faculdade de Farmácia - UFMG

Belo Horizonte, 21 de março de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha mãe e avó que me apoiaram incondicionalmente durante toda minha caminhada e por todas as vezes que me encorajaram a seguir. E dedico esse trabalho a memória de meu avô, maior incentivador e exemplo de vida.

À minha família e amigos pelo apoio, amor e atenção durante todos esses anos. Ao meu namorado por toda paciência nos momentos de ansiedade e por todo encorajamento.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Oliveira, por ter aceitado me orientar neste projeto.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Fernandes, pela confiança em mim depositada desde o início da minha carreira científica, por todos esses anos de convivência e pela oportunidade que ainda é de enorme importância para minha formação.

Ao meu co-orientador, Dr. Juliano Simões de Toledo, pela paciência em todos os momentos, pela enorme ajuda nos procedimentos, por sua contribuição neste trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo, Dr. Rafael Ramiro de Assis e a Dra. Ana Paula Almeida Martins Moraes por aceitarem o nosso convite para participar da banca.

Agradeço aos amigos que o mestrado e toda caminhada na UFMG me deram, Filipe, Isabela, Carol e Cecília. Em especial ao Filipe e Isabela pela enorme contribuição ao trabalho.

À Dra. Camila Indiani Oliveira do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz, Bahia por gentilmente ceder à cepa utilizada neste estudo.

À Dra. Fernanda Freire pelo auxílio nos experimentos de citometria. Ao laboratório de Toxicológica da faculdade de Farmácia UFMG pelo auxílio e disponibilidade da utilização do GC-MS. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - Biofísica, UFRJ pelo auxílio nos experimentos de microscopia.

Aos colegas do laboratório Biomol que já passaram e que ainda continuam conosco. Aos técnicos do laboratório de Parasitologia. A Profª. Lirlandia Pires de Sousa e Prof. Bruno Mota e também aos seus alunos.

Ao programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas e a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, seu corpo docente e direção.

À agência de fomento CAPES pela bolsa de estudo concedida.

## RESUMO

As leishmanioses compõem um grupo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e possuem grande importância em saúde pública. O controle dessas doenças ainda é um desafio, devido a crescente resistência às drogas utilizadas no tratamento. Nesse contexto, o estudo de modelos resistentes a drogas é essencial para se explorar o potencial metabólico dos parasitos e melhor compreender os mecanismos envolvidos na aquisição de resistência a fármacos. Neste estudo, foi gerada uma linhagem mutante de *Leishmania braziliensis* resistente ao antibiótico tunicamicina, fármaco que atua na inibição da glicosilação proteica. Para a geração dos mutantes foi utilizado o método de aumento gradual de concentração de droga (*stepwise*). Com o intuito de avaliar as adaptações metabólicas induzidas durante o processo de aquisição de resistência à tunicamicina, foram realizadas análises genômicas, ensaios de microscopia, infectividade, citometria e análise do metaboloma da linhagem resistente. As promastigotas de *Leishmania braziliensis* resistentes à tunicamicina (até 80 vezes o valor da  $DL_{50}$ ), apresentaram amplificação gênica e um concomitante aumento de virulência. Modificações morfológicas foram observadas na linhagem resistente como, desorganização das cisternas do complexo de Golgi indicando possíveis alterações no processo de glicosilação proteica. Alterações no metabolismo de várias fontes de carbono, relacionados à produção de substrato para a síntese de dolicol, molécula que desempenha papel importante na glicosilação de proteínas, foram detectadas como resposta ao bloqueio do processo induzido pela tunicamicina. Os dados gerados permitiram a concepção de um modelo de estudo dos mecanismos de resistência a drogas, bem como a influencia da glicosilação proteica nas relações parasito-hospedeiro em *Leishmania*.

**Palavras chaves:** *L. braziliensis*, Tunicamicina, Glicosilação, Metabolômica, Leishmaniose

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases caused by parasites of the *Leishmania* type and is of great importance in public health. Disease control is still a challenge due to its resistance to the drugs used in treatment. In this context, the study of potential resistance is essential for the exploration of the potential metabolism of parasitism and improve the structures of the drugs of the stress of drugs. In this study, a mutant strain of *Leishmania braziliensis* resistant to the antibiotic tunicamycin, a drug that inhibits the glycosylation of protein, was generated by the gradual increase in drug concentration (stepwise). In order to evaluate the metabolic adaptations caused during the process of developing resistance to tunicamycin. In order to evaluate the metabolic changes during the acquisition of resistance to tunicamycin, genomic analyzes, microscopy, infectivity, cytometry and resistance metabolism analysis were performed. Promastigotes of *Leishmania braziliensis* resistant to tunicamycin (up to 80 times the value of LD50), gene amplification and a concomitant increase in virulence. Morphological changes were observed in the lineage such, disorganization of cisterns of the Golgi complex, changes in the process of protein glycosylation. Changes in the metabolism of various carbon sources, related to the production of substrate for a synthesis of fatty acid, molecules that play an important role in the glycosylation of proteins, were detected as responses to the induction blocking process of tunicamycin. The results suggests that main mechanisms of drug resistance, as well as the influence of protein glycosylation on host parasitic infections in *Leishmania*.

**Keywords:** *L. braziliensis*, Tunicamycin, Glycosylation, Metabolomics, Leishmaniasis.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo biológico do gênero <i>Leishmania</i> .....   | 20 |
| Figura 2. Estrutura do núcleo N-glicano ligado a asparagina.....  | 23 |
| Figura 3. Estrutura química da tunicamicina.....  | 24 |
| Figura 4. DL <sub>50</sub> de tunicamicina para <i>Leishmania braziliensis</i> . ....   | 36 |
| Figura 5. Perfil de crescimento da cepa WT e linhagem TM40 de <i>L. braziliensis in vitro</i> . ....  | 37 |
| Figura 6. Comparação da proliferação da cepa WT e linhagem TM40 sob pressão da tunicamicina. ....   | 37 |
| Figura 7. Perfil de crescimento das linhagens TM40 e TM40rev de <i>L. braziliensis in vitro</i> . ....  | 38 |
| Figura 8. Representação da infecção em hamsters da cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> WT e a linhagem resistente a tucamicina TM40 .....  | 39 |
| Figura 9. Curso da infecção, medido por meio do edema desencadeado pela infecção em orelha de hamsters com <i>Leishmania braziliensis</i> cepa WT e linhagem resistente a tunicamicina TM40. .... | 40 |
| Figura 10. Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos da cepa WT e linhagem TM40.....   | 40 |
| Figura 11. Análise por citometria de fluxo da cepa WT e linhagem TM40 em cultivo axênico. ....  | 41 |
| Figura 12. Avaliação das alterações morfológicas durante cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. braziliensis</i> cepa WT e linhagem TM40 por microscopia de varredura.....                              | 42 |
| Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão da cepa de <i>L. braziliensis</i> WT e linhagem resistente TM40.....   | 43 |
| Figura 14. Eletroforese em campo pulsátil em gel de agarose <i>low-melting</i> 2% da cepa WT e linhagem TM40.....   | 44 |
| Figura 15. Eletroforese em gel de alternância de campo ortogonal das linhagens WT e TM40.....   | 44 |
| Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos amplicons circulares. ....  | 45 |
| Figura 17. Análises de PCA e PLS-DA dos metabólitos obtidos por GC-MS de <i>Leishmania braziliensis</i> cepa WT e linhagem resistente a tunicamicina TM40. ....                                   | 46 |
| Figura 18. Classificação bioquímica dos compostos identificados por GC-MS em <i>Leishmania braziliensis</i> cepa WT e linhagem resistente a tunicamicina TM40. ....                               | 47 |
| Figura 19. Esquema simplificado de vias relacionadas com os metabólitos encontrados pelo GC-MS em cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> WT e linhagem resistente TM40.. ....                     | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Enriquecimento de vias metabólicas pelo MBRole.....                                       | 47 |
| Tabela 2. Metabólitos detectados na cepa WT e linhagem TM40 de <i>L.braziliensis</i> por GC-MS..... | 49 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| °C      | Graus Celsius   |
| µg      | Micrograma  |
| µL      | Microlitro  |
| B       | Bolsa flagelar  |
| bf      | Bolsa flagelar  |
| BOD     | Demanda bioquímica de oxigênio                              |
| BSTFA   | N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida                    |
| ci      | Cinetoplasto  |
| DHFR-TS | Diidroflato redutase timidilato sintase                     |
| DL50    | Dose letal  |
| DMSO    | Dimetilsulfóxido  |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                                   |
| EC      | Eletroforese capilar  |
| ERAD    | <i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i> |
| FcγR    | Receptores para Fcγ   |
| fm      | Figura de mielina   |
| FnR     | Receptor de fibronectina                                    |
| GC      | Cromatografia gasosa  |
| GC-MS   | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas    |
| gp63    | Metaloprotease de superfície presente em <i>Leishmania</i>  |
| HEPES   | Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfônico          |
| HIV     | Vírus da Imunodeficiência Humana                            |
| HMDB    | <i>Human metabolome database</i>                            |
| KEGG    | <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>              |
| LC      | Cromatografia líquida                                       |
| LC      | Leishmaniose cutânea  |
| LCD     | Leishmaniose cutânea difusa                                 |
| LM      | Leishmaniose mucosa   |
| LPG     | Lipofosfoglicano  |
| LT      | Leishmaniose tegumentar                                     |
| LV      | Leishmaniose visceral                                       |
| M       | Molar   |
| M199    | Meio 199  |
| MBRole  | <i>Metabolites Biological Role</i>                          |

|         |  |
|---------|--|
| mg      | Miligramas   |
| mL      | Mililitro  |
| mm      | Milimetro  |
| mM      | Milimolar  |
| MR      | Receptor de manose   |
| MTT     | Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio    |
| nu      | Núcleo   |
| OPLS DA | Análise Discriminante de Projeção Ortogonal de Estrutura Latente |
| PBS     | Solução salina tamponada com fosfato                             |
| PCA     | Método de mínimos quadrados parciais                             |
| PCR     | Reação em cadeia da polimerase                                   |
| PFGE    | <i>Pulsed-Field</i>  |
| pH      | Potencial hidrogeniônico   |
| PLS-DA  | Mínimos quadrados parciais com análise discriminante             |
| ppm     | Partes por milhão  |
| PSG     | Gel secretor de promastigotas                                    |
| QC      | <i>Quality control</i>   |
| RE      | Retículo endoplasmático  |
| RMN     | Ressonância magnética nuclear                                    |
| ROS     | Espécies reativas de oxigênio                                    |
| rpm     | Rotações por minuto  |
| RPMI    | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                           |
| SFB     | Soro fetal bovino  |
| TA      | Temperatura Ambiente   |
| TM40    | Resistente a tunicamicina 40µg/mL                                |
| TM40rev | Revertente da linhagem resistente TM40                           |
| WT      | Wild-type (selvagem)   |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 12 |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 14 |
| 2.1 As leishmanioses e as manifestações clínicas.....  | 14 |
| 2.1.1 <i>Leishmaniose visceral</i> .....   | 14 |
| 2.1.2 <i>Leishmaniose cutânea</i> .....  | 15 |
| 2.1.3 <i>Leishmaniose mucosa</i> .....   | 15 |
| 2.1.4 <i>Leishmaniose cutânea difusa</i> .....   | 16 |
| 2.2 Epidemiologia das leishmanioses .....  | 16 |
| 2.3 O parasito.....  | 17 |
| 2.4 Ciclo de vida.....   | 17 |
| 2.5 Os processos envolvidos na resistência a drogas em <i>Leishmania</i> .....                     | 20 |
| 2.6 Implicações da via secretória e a N-glicosilação sobre a virulência em <i>Leishmania</i> ..... | 22 |
| 2.7 As abordagens metabolômicas para os estudos de metabolismo de <i>Leishmania</i> .....          | 25 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 27 |
| 3.1 Objetivo geral .....   | 27 |
| 3.2 Objetivos específicos .....  | 27 |
| <b>4. METODOLOGIA</b> .....  | 28 |
| 4.1 Cultivo de <i>Leishmania</i> e produção da variante resistente TM40.....                       | 28 |
| 4.2 Curva de crescimento .....   | 28 |
| 4.3 Reversão do fenótipo de resistência da linhagem TM40.....                                      | 29 |
| 4.4 Avaliação da virulência.....   | 29 |
| 4.4.1 <i>Infecção em hamsters</i> .....  | 29 |
| 4.4.2 <i>Infecção in vitro</i> .....   | 30 |
| 4.4.3 <i>Citometria de fluxo</i> .....   | 30 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.5 Microscopia eletrônica.....   | 30        |
| 4.6 Amplificação gênica na linhagem TM40.....   | 31        |
| 4.6.1 Pulsed-Field (PFGE).....  | 31        |
| 4.6.2 Eletroforese em gel de alternância de campo ortogonal.....  | 32        |
| 4.6.3 Lise alcalina do material amplificado.....  | 32        |
| 4.7 Análise metabolômica comparativa entre as linhagens WT e TM40 .....   | 33        |
| 4.7.1 Extração e derivatização dos metabólitos.....   | 33        |
| 4.7.2 Parâmetros da injeção no GC-MS .....  | 34        |
| 4.7.3 Processamento dos dados.....  | 34        |
| 4.8 Análises de bioinformática .....  | 35        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>  | <b>36</b> |
| 5.1 Geração dos mutantes resistentes e DL <sub>50</sub> para tunicamicina em <i>Leishmania braziliensis</i> ..... | 36        |
| 5.2 Curva de crescimento .....  | 36        |
| 5.3 Reversão do fenótipo de resistência da TM40 .....   | 38        |
| 5.4 Avaliação da virulência da linhagem TM40 .....  | 38        |
| 5.5 Análise dos efeitos da tunicamicina sobre a morfologia dos parasitos.....                                     | 42        |
| 5.6 Amplificação gênica na linhagem TM40.....   | 43        |
| 5.7 Comparação do metaboloma da cepa WT e linhagem TM40 de <i>L. braziliensis</i> por GC-MS .....                 | 45        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>PERSPECTIVAS .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>59</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecto-parasitárias que ocorrem predominantemente em países subdesenvolvidos. São causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitidas através da picada de fêmeas de flebotomíneos (gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*). Desencadeiam diferentes manifestações clínicas que dependem principalmente da espécie do parasito e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado durante a infecção.

O tratamento das leishmanioses por fármacos, como os antimoniais pentavalentes e anfotericina B, constitui uma das formas de controle da doença, porém, o desenvolvimento de resistência a drogas apresenta-se como um grande desafio no uso de quimioterápicos. Mecanismos moleculares como a amplificação gênica são associados à geração de resistência nesses parasitos. O entendimento desses processos pode colaborar com o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos, vacinas e no diagnóstico.

A seleção *in vitro* de linhagens resistentes por aumento gradual de concentração de fármacos (*stepwise*) é uma metodologia utilizada para estudar os mecanismos de resistência às drogas em *Leishmania spp.* O antibiótico tunicamicina vem sendo utilizado como modelo para estudos de mecanismos de resistência a drogas e de virulência em *Leishmania*. A tunicamicina inibe a enzima N-acetilglicosamil-fosfotransferase causando bloqueio no passo inicial da via de N-glicosilação gerando alterações significativas nos passos subsequentes do processo de glicosilação das proteínas.

Glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais comum e afeta profundamente as propriedades das proteínas. Os mecanismos moleculares envolvidos na virulência dos parasitos ainda são em grande parte desconhecidos. As glicoproteínas de superfície molecular são frequentemente associadas à evasão do parasito do sistema imune do hospedeiro. Considerando o fato de que o processo de glicosilação de proteínas pode levar a alterações nas funções biológicas do parasito, a via bioquímica de glicosilação exerce um importante papel na virulência do parasito.

A capacidade tecnológica de examinar os produtos finais e intermediários do metabolismo é um campo de estudo crescente que permite a identificação de pequenas moléculas presentes em um determinado momento do perfil metabólico

de uma célula, tecido, órgãos ou organismo. A análise de um metaboloma gera a representação mais próxima do fenótipo, e permite o entendimento de processos biológicos.

Considerando as possibilidades oferecidas pela abordagem metabolômica e a importância epidemiológica e médica das leishmanioses, este estudo teve como objetivo gerar uma linhagem de *L. braziliensis* resistente à tunicamicina, caracterizá-la, em relação à cepa selvagem, aspectos como alterações moleculares, morfológicas e metabólicas induzidas concomitantemente à aquisição de resistência à droga, bem como avaliar a relação destas modificações nos padrões de virulência.

Neste estudo as análises fenotípicas e metabolômicas revelaram alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas relacionadas ao aumento da virulência e à aquisição de resistência, observados na linhagem resistente à tunicamicina, permitindo uma melhor compreensão das alterações associadas à glicosilação de proteínas em *Leishmania* e como estas alterações impactam na interação parasito-hospedeiro.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 As leishmanioses e as manifestações clínicas

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecto-parasitárias, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com a localização onde o parasito se desenvolve no trato digestivo dos vetores flebotomíneos. Os parasitos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada de insetos fêmeas infectados, do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (LAINSON e SHAW, 1987). Parasitos do sub-gênero *Leishmania* (*Leishmania*) se multiplicam no intestino anterior e médio dos vetores, enquanto promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) se desenvolvem no intestino posterior do vetor (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Nesses dois subgêneros estão distribuídas mais de 20 espécies causadoras de infecção em humanos (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

As leishmanioses são divididas em dois tipos principais: leishmaniose visceral (LV) e tegumentar (LT). A leishmaniose tegumentar pode ocorrer nas formas: cutânea (LC), mucosa (LM) e cutâneo-difusa (LCD) (HERWALDT, 1999; ASHFORD, 2000; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Alguns fatores, tais como a espécie de *Leishmania*, o estado imunológico e fatores genéticos do hospedeiro, determinam o tropismo, patogenia e virulência manifestadas após a infecção (LIPOLDOVÁ e DEMANT, 2006).

#### 2.1.1 Leishmaniose visceral

A LV é a manifestação clínica mais grave, sendo causada por parasitos do complexo *L. donovani* (*L. infantum chagasi* e *L. donovani*) no Leste da África e subcontinente Indiano e *L. infantum chagasi* na Europa, Norte da África e América Latina (CHAPPUIS *et al.*, 2007). No curso da infecção, os parasitos invadem o sistema sanguíneo e retículo-endotelial e sinais como esplenomegalia, com ou sem hepatomegalia, desgaste e palidez de membranas mucosas, são observados. O persistente estado inflamatório pode levar ao desenvolvimento de anemia devido à esplenomegalia e consequente destruição periférica de eritrócitos. Com o avanço da doença, a esplenomegalia pode aumentar, causando distensão abdominal e dor, que pode ser agravada pela ocorrência concomitante da hepatomegalia (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Outros sinais e sintomas são característicos da LV: febre prolongada, perda de peso, diminuição do apetite, esplenomegalia, hepatomegalia e sinais de

anemia (ASHFORD 2000; DESJEUX, 2004; DAWIT *et al.* 2013). A progressão para LV típica leva normalmente 2-8 meses ou ocasionalmente um período maior (PAVLI e MALTEZOU, 2010). Embora a maioria das infecções por espécies viscerotrópicas de *Leishmania* sejam assintomáticas, a leishmaniose visceral é fatal se não tratada. A maioria das mortes por LV passam despercebidas e mesmo com o tratamento, 10-20% dos casos podem evoluir para morte. Fatores como desnutrição, imunossupressão, principalmente associada à co-infecção por HIV, podem predispor à manifestação clínica da doença (BERN *et al.*, 2005). No contexto da co-infecção com o HIV, LV é geralmente o resultado de recaída após anos de latência ou representa uma infecção recém-adquirida (PAVLI e MALTEZOU, 2010).

### **2.1.2 Leishmaniose cutânea**

A LC caracteriza-se pelo aparecimento de uma ou mais lesões na pele, durante várias semanas, ou meses, após a picada do vetor. O primeiro sinal de uma infecção é um pequeno eritema. O eritema desenvolve-se em pápula e em seguida, em um nódulo que ulcera em um período de duas semanas a seis meses, caracterizando a lesão típica da leishmaniose cutânea (DAWIT *et al.*, 2013). As lesões com bordas elevadas podem regredir gradualmente em meses ou anos deixando uma cicatriz profunda de pigmentação alterada. A formação de nódulos satélites nas proximidades da lesão é comum. Fatores como tamanho da lesão, tempo de regressão e reincidência, variam conforme a espécie causadora e o estado imunológico do paciente, podendo inclusive ocorrer infecção assintomática. As principais espécies causadoras de LC no Velho Mundo são *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. Já no Novo Mundo é causada por várias espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, tais como: *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana*, além de alguns raros casos associados a *L. infantum chagasi* (MURRAY *et al.*, 2005; REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

### **2.1.3 Leishmaniose mucosa**

A LM é relacionada principalmente a infecções causadas por espécies do Novo Mundo, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, no entanto, há alguns relatos de LM no Velho Mundo, sendo causados por *L. donovani*, *L. major* (DESJEUX, 2004). A LM tende a ocorrer em 10% dos pacientes no período de 1 a 5 anos após a cura da forma cutânea (ALVES-FERREIRA *et al.*, 2015). Os sinais iniciais são eritema e ulcerações nas narinas, seguido por uma inflamação destrutiva que pode espalhar

para o septo nasal e em alguns casos para faringe e laringe. A inflamação pode perfurar o septo nasal causar grave desfiguração do rosto e bloquear a faringe e laringe. Intensa resposta celular e escassos parasitos no sítio da lesão são características da LM (CARVALHO *et al.*, 2012). A doença raramente apresenta cura espontânea, e o tratamento é complicado. A ocorrência comum de infecções bacterianas secundárias torna a LM potencialmente fatal (ASHFORD, 2000; REITHINGER e DUJARDIN, 2007; DAWIT *et al.*, 2013).

#### **2.1.4 Leishmaniose cutânea difusa**

A LCD é causada pelas espécies *L. mexicana* e *L. amazonensis*, no Novo Mundo e *L. aethiopica*, no Velho Mundo (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). As lesões são caracterizadas por numerosos nódulos não ulcerativos e multiparasitários especialmente nas superfícies dos membros e na face, assemelhando-se à hanseníase lepromatosa. A LCD tem como característica a anergia da resposta celular que resulta em multiplicação parasitária intensa. Nesse caso, não ocorre cura espontânea, além de ser observada frequentemente a ocorrência de recidivas (ASHFORD, 2000; HEPBURN, 2003; SINHA *et al.*, 2008). Por causa das consequências devastadoras para o paciente, a LCD é reconhecida como um especial problema de saúde pública (DESJEUX, 2004).

## **2.2 Epidemiologia das leishmanioses**

A ocorrência endêmica da leishmaniose ocorre em 98 países. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção. A contagem oficial totaliza mais de 58.000 casos de LV e 220.000 casos de LT por ano, no mundo. No entanto, como nem todos os casos são notificados estima-se que cerca de 200.000 a 400.000 casos de LV e 700.000 a 1.2 milhões de casos de LC ocorram anualmente. A sua ocorrência em apenas 6 países é responsável por mais de 90% dos casos de LV: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A LC, por outro lado, apresenta distribuição mais ampla, sendo que 10 países são responsáveis por 70% a 75% dos casos: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (ALVAR, 2012).

No Brasil, no período de 2003 a 2007 foram relatados em média 3.481 casos de LV por ano, com estimativa de ocorrência de até 6.300 casos anuais de LV. No mesmo período foram relatados 26.008 casos por ano de LC, com estimativa de ocorrência de até 119.600 casos anuais (ALVAR, 2012).

A incidência e a distribuição dessas doenças tem aumentado, mesmo com os esforços dedicados ao controle. Fatores ambientais e antrópicos, como o desflorestamento, a urbanização desordenada, a migração e o aumento da susceptibilidade a infecções associadas com imunossupressão e desnutrição são relacionados com esse aumento (DESJEUX, 2004). A ocorrência de epidemias em vários continentes aumenta a necessidade de um melhor entendimento das particularidades epidemiológicas desse grupo de doenças, tais como alterações no comportamento dos vetores face às mudanças climáticas (HERWALDT, 1999; STOCKDALE e NEWTON, 2013).

### 2.3 O parasito

Duas formas evolutivas principais são encontradas no ciclo biológico de *Leishmania*: as formas promastigotas e amastigota. As promastigotas são encontradas no intestino e aparelho bucal do hospedeiro invertebrado. São formas móveis e delgadas variando de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento, possuem flagelo livre e longo em sua porção anterior. O núcleo é arredondado ou oval e situa-se na região mediana ou ligeiramente anterior do parasito. Nessas formas, o cinetoplasto em forma de bastão localiza-se entre a região anterior ao núcleo do parasito. O cinetoplasto é uma rede de milhares de DNAs circulares, constituindo o kDNA (genoma mitocondrial mais complexo conhecido), composto por maxi-círculos e os mini-círculos que estão localizados na mitocôndria única e gigante dos Cinetoplastídeos (ASHFORD, 2000; LUKES *et al.*, 2002; GOSSAGE *et al.*, 2003; DE SOUZA *et al.*, 2009; JENSEN e ENGLUND, 2012; DAWIT *et al.*, 2013).

As amastigotas são encontradas no interior dos fagolisossomos dos macrófagos do hospedeiro vertebrado. São arredondadas ou ovais, menores do que os promastigotas, medindo cerca de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Possuem um núcleo grande e flagelo rudimentar armazenado em uma bolsa flagelar (ASHFORD, 2000; DAWIT *et al.*, 2013).

### 2.4 Ciclo de vida

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico heteroxênico, no qual as formas de desenvolvimento alternam-se entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores (KILLICK-KENDRICK, 1979). Os hospedeiros primários do parasito *Leishmania* são vertebrados pertencentes a diferentes Ordens, tais como roedores,

canídeos e primatas, incluindo o homem (HERWALDT, 1999; STOCKDALE e NEWTON, 2013).

Durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro vertebrado. A *Leishmania* produz um gel secretor de promastigotas (PSG) que atua bloqueando a região anterior do intestino médio do vetor, levando a um acúmulo das formas promastigotas metacíclicas. Tal fato dificulta a alimentação do vetor durante o repasto sanguíneo e ocasiona uma regurgitação que resulta na introdução dos parasitos no hospedeiro vertebrado (ROGERS *et al.*, 2010). A saliva dos flebotomíneos tem ação vasodilatadora e anticoagulante, favorecendo o fluxo de sangue durante o repasto sanguíneo, bem como possui também substâncias que induzem a rápida infiltração de neutrófilos e o recrutamento de macrófagos para o sítio de infecção (KILLICK-KENDRICK, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

As promastigotas possuem moléculas de superfície fundamentais para a sobrevivência do parasito como o complexo lipofosfoliglicano (LPG) e a metaloprotease gp63. Modificações do LPG impedem a ligação dos fatores C3 e C3b e a formação de C5, garantindo resistência das formas promastigotas metacíclicas contra a lise pelo complemento (HANDMAN e BULLEN, 2002). As moléculas de superfície gp63 e LPG possuem papel na ligação dos parasitos aos macrófagos, devido à clivagem do C3b em C3bi pela gp63 que auxilia a entrada nos macrófagos via receptores CR1 e CR3, respectivamente (RITTIG e BOGDAN, 2000; HANDMAN e BULLEN, 2002). Os parasitos também podem ser internalizados por interações com receptor de manose (MR), receptor de fibronectina (FnR) e receptores para Fcγ (FcγR), de acordo com seu estágio evolutivo (UENO e WILSON, 2012).

Estudos com *L. major* mostraram que os neutrófilos possuem um papel de célula hospedeira primária, para uma parte substancial dos parasitos inoculados e a fagocitose de neutrófilos infectados pelos macrófagos é um mecanismo que permite a entrada silenciosa de parasitos nos macrófagos. Outros tipos de células, tais como células de *Langerhans* e fibroblastos também podem ser infectadas (PETERS *et al.*, 2008).

Inicialmente ocorre a interação entre os parasitos e as células presentes no tecido do sítio de inoculação, como queratinócitos, células de *Langerhans* e macrófagos. Os queratinócitos atuam como uma barreira física para a infecção, além

do papel na secreção de mediadores imunomoduladores que auxiliam a resposta imune aos patógenos, como IL-12, IL-4 e IL-6 (EHRCHEN *et al.*, 2010; MOUGNEAU *et al.*, 2011). As células de *Langerhans* são um subtipo específico de células dendríticas da pele e podem atuar como células sentinelas na epiderme e a interação com *Leishmania* depende da espécie do parasito (MORENO, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008). Os macrófagos possuem uma importância que se destaca na infecção por *Leishmania*, atuando tanto como células hospedeiras necessárias para o sucesso da infecção, quanto como um braço efetor de uma resposta imune eficaz (HORTA *et al.*, 2012).

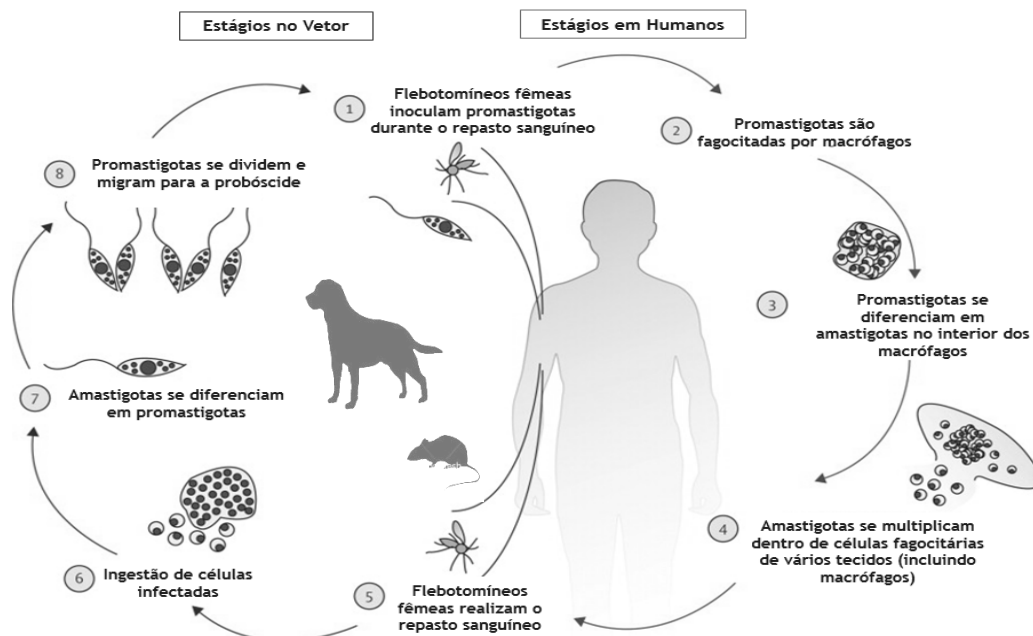
A formação do vacúolo parasitóforo inicia-se através da fagocitose e da formação de pseudópodes em torno do parasito, formando uma vesícula denominada de fagossomo. O fagossomo sofre uma série de eventos de fusão aos endossomos e lisossomos que geram alterações no vacúolo, tornando-o ácido (pH 4,5–5,0) e rico em enzimas hidrolíticas. (BURCHMORE e BARRETT, 2001; HANDMAN e BULLEN, 2002). A mudança de pH e de temperatura, e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) servem como gatilho para a diferenciação das promastigotas em amastigotas (GHOSH *et al.*, 2015).

O ciclo se reinicia quando fêmeas de flebotomíneos ingerem sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. Após o repasto, a mudança das condições entre os hospedeiros, como a diminuição da temperatura e aumento do pH, desencadeia a diferenciação dos parasitos em promastigotas procíclicas. A síntese e secreção de proteases são induzidas, além da síntese e formação da matriz peritrófica no lúmen do intestino do inseto. Essa matriz composta por quitina, proteínas e glicoproteínas protege o parasito da ação de enzimas digestivas. Posteriormente estes parasitos secretam proteases que degeneram a matriz peritrófica e liberam as formas promastigotas no tubo digestivo do inseto (DOSTALOVA e VOLF, 2012).

As promastigostas procíclicas aderem-se no intestino onde proliferam e, após 48-72 horas, começam a diferenciar-se em formas metacíclicas, que são as formas infectivas (DOSTALOVA e VOLF, 2012). No inseto vetor, LPGs, juntamente com outros fosfoglicanos, estão implicadas na adesão das promastigostas procíclicas ao epitélio intestinal e na proteção dos parasitos contra a ação de enzimas digestivas do vetor (SPATH *et al.*, 2003). Durante metaciclogênese, o LPG sofre modificações estruturais, tornando-se maior, o que acarreta perda da habilidade de ligação das

promastigotas ao intestino do vetor, permitindo sua migração para a glândula salivar (TURCO *et al.*, 2001). Também ocorre a produção e secreção de PSG e as promastigotas metacíclicas são regurgitadas durante um novo repasto sanguíneo (ROGERS *et al.*, 2010). O ciclo de vida do parasito encontra-se esquematizado na figura 1.

Ressalta-se, finalmente, que existem outros modos mais raros de transmissão das leishmanioses, como a transmissão congênita e parental (transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas e acidentes laboratoriais) (HERWALDT, 1999).



**Figura 1. Ciclo biológico do gênero *Leishmania***

Fêmeas de flebotomíneos infectadas com *Leishmania spp.*, introduzem as formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Após terem sido introduzidas na pele dos hospedeiros, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, onde se transformam e se replicam em amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo nos macrófagos. As amastigotas provocam a lise da célula e a consequente liberação dos parasitos. Os parasitos liberados podem infectar novas células. Durante a alimentação de uma nova fêmea de flebotomíneo, o inseto pica o animal ou indivíduo parasitado e retira a linfa e sangue contendo células do sistema mononuclear fagocítico infectadas com amastigotas. Fonte: Reithinger *et al.*, 2007 (adaptado).

## 2.5 Os processos envolvidos na resistência a drogas em *Leishmania*

Dentre as estratégias de controle da leishmaniose, o tratamento é uma medida importante (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Os antimoniais pentavalentes são

considerados os fármacos de primeira linha contra leishmaniose cutânea ou visceral. Os quimioterápicos estibugluconato de sódio e antimoniato de meglumina são exemplos de antimoniais pentavalentes. Drogas como a anfotericina B e isotionato de pentamidina são os medicamentos de segunda linha utilizados (OLLIARO e BRYCESON, 1993; CRUZ *et al.*, 2009). Outras drogas como, paromomicina e miltefosina foram introduzidas como fármacos alternativos para o tratamento de leishmaniose (MURRAY *et al.*, 2005). No entanto, a emergente resistência a drogas em protozoários como *Leishmania*, vem se tornando um grave problema de saúde pública (OUELLETTE, LÉGARÉ e PAPADOPOULOU, 2001).

A resposta à pressão de drogas pode gerar amplificações em regiões específicas do genoma de algumas espécies de *Leishmania*. Os mecanismos moleculares responsáveis por gerar resistência a drogas em *Leishmania* possuem alta relevância biológica e médica. Um dos mecanismos de resistência a drogas bem conhecido em muitos organismos é amplificação gênica (STARK e WAHL, 1984). As regiões H e R do genoma de *L. major* são as amplificações relacionadas à resistência a drogas mais conhecidas. O gene que confere a resistência ao metotrexato, dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) está localizado na região R (BEVERLY *et al.*, 1984; BEVERLEY, ELLENBERGER e CORDINGLEY, 1986). A amplificação da região H é associada resistência a medicamentos como terbinafina, metotrexato e antimoniais (ELLENBERGER e BEVERLEY, 1989). Outro mecanismo importante encontrado em *Leishmania* é a amplificação de genes da superfamília dos transportadores ABC, responsáveis pelo transporte transmembranar de várias moléculas, incluindo fármacos como os antimoniais (HIGGINS, 1992), envolvidos na resistência a drogas (CALLAHAN e BEVERLEY, 1991). As crescentes buscas pela compreensão dos mecanismos relacionados à resistência podem colaborar com o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos (OUELLETTE, LÉGARÉ e PAPADOPOULOU, 2001).

Uma metodologia que auxilia nos estudos de resistência a drogas é geração de linhagens de *Leishmania* resistentes a diferentes drogas *in vitro*. A seleção *in vitro* de linhagens resistentes por aumento gradual de concentração de drogas é uma estratégia que tem sido utilizado para estudar os mecanismos de resistência a drogas em *Leishmania* spp. A técnica de *stepwise selection* consiste na exposição de células selvagens a gradativas concentrações crescentes de droga até o surgimento de mutantes resistentes ao fármaco (BEVERLEY, 1991).



A maioria das amplificações genicas estudadas em *Leishmania spp.* surgiram em resposta à seleção de parasitos resistentes gerados por *stepwise*. Moléculas de DNA amplificadas, denominados *amplicons*, frequentemente existem como múltiplas cópias circulares ou lineares extracromossômicas (LAFFITTE *et al.*, 2014) e, geralmente, um único gene é responsável pela resistência a drogas em *Leishmania* (XUAN e CHANG, 1992).

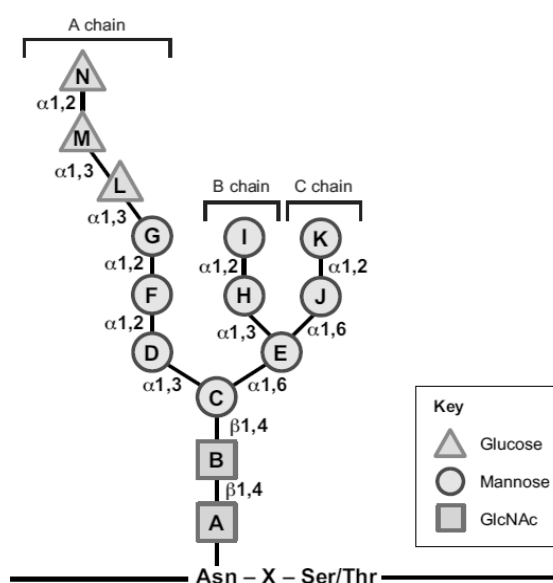
## **2.6 Implicações da via secretória e a N-glicosilação sobre a virulência em *Leishmania***

Dentro das modificações pós-traducionais, a glicosilação é uma das mais comuns. Os principais tipos de glicosilação são a O e N-glicosilação, C-glicosilação também ocorrem, porém em menor taxa (CORFIELD, 2017). Essa modificação forma proteínas que podem desempenhar papéis fundamentais em uma variedade de processos biológicos como, sinalização celular, diferenciação celular, resposta imunológica, interação parasito-hospedeiro, além de influenciar na estabilidade e solubilidade das proteínas e também com o dobramento correto dessas moléculas (LEAVITT *et al.*, 1977; SHENTAL-BECHOR e LEVY, 2008; YANG *et al.*, 2017)

Os N-glicanos são ligados a proteínas por meio de ligação covalente com o nitrogênio da cadeia lateral dos resíduos de asparagina presentes no *sequon*. *Sequon* é a sequencia composta por Asparagina (Asn)-X-Serina/Treonina, onde “x” pode ser qualquer aminoácido exceto a prolina. Os glicanos são oligossacarídeos constituídos por cadeias ramificadas de resíduos de açúcares unidos por ligações glicosídicas, podem ser compostos de N-acetilgalactosamina, galactose, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina, fucose, manose e outros monossacarídeos. O processo de N-glicosilação é iniciado em uma molécula lipídica presente na membrana do retículo endoplasmático (RE), o dolicol fosfato. O dolicol fosfato pertence a um grupo de moléculas de isoprenóides de cadeia longa, ligadas à membrana do retículo endoplasmático (BREITLING e AEBI, 2013; BIEBERICH, 2014). Em eucariotos, a montagem deste oligossacarídeo precursor é catalisada por um conjunto variado de oligossacariltransferases residentes no RE, como N-acetilglucosamina transferases, manosiltransferases e glicosiltransferases (BIEBERICH, 2014).

Por atividade das oligossacariltransferases no processo de N glicosilação, o complexo de 2 N-acetilglucosaminas, 9 manoses e 3 glicoses, são transferidas da

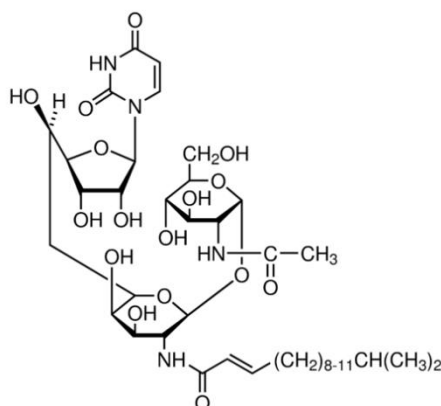
molécula de dolicol para resíduos de asparagina (BIEBERICH, 2014; XU e NG, 2015) (figura 2). No momento em que as proteínas emergem no lúmen do retículo endoplasmático (RE), aquelas que necessitam de glicosilação são rapidamente processadas (XU e NG, 2015). Após a iniciação da N-glicosilação no RE, as proteínas são encaminhadas para o complexo de Golgi para completar o processo de glicosilação e direcionar as proteínas para suas funcionalidades (STANLEY, 2011).



**Figura 2. Estrutura do núcleo N-glicano ligado a asparagina.** A estrutura oligossacarídica é inicialmente montada na molécula de dolicol presente na membrana do retículo endoplasmático. Posteriormente o N-glicano é transferido para as proteínas sendo ligado covalentemente às cadeias laterais Asn. A forma de 14 açúcares, contém duas N-acetilglucosaminas (GlcNAc, quadrados), nove manoses (círculos) e três resíduos de glicose (triângulos). Fonte: Ferris, Kodali e Kaufman, 2014. (Adaptado).

O processo de N-glicosilação de proteínas é crucial para protozoários como *Leishmania spp.* e desempenha papéis importantes na virulência destes parasitos. A metaloprotease gp63, expressa abundantemente na superfície de *Leishmania spp.* e de outros tripanossomatídeos, foi caracterizada na espécie *L. amazonensis* e apresenta 4 N-glicanos ligados a sua cadeia polipeptídica. Esta proteína é relacionada à proteção do parasito contra a ação de enzimas hidrolíticas do intestino médio do hospedeiro invertebrado e de fagocitossomos de macrófagos do hospedeiro vertebrado (OLAFSON *et al.*, 1990; MATLASHEWSKI, 2001; SILVA ALMEIDA *et al.*, 2012).

Um estudo realizado com parasitos da espécie *L. amazonensis* resistentes ao antibiótico tunicamicina, conhecido inibidor da via de N-glicosilação, apresentou aumento da virulência e atividade aumentada da glicosiltransferase, além de amplificação gênica (KINK e CHANG, 1987). Nesse estudo, relacionou-se a amplificação gênica à expressão do gene da glicosiltransferase e a sua implicação como base molecular de virulência em *Leishmania*. A tunicamicina é um antibiótico isolado de *Streptomyces lysosuperficus* e possui atividade antiviral e antimicrobiana (TAKATSUKI *et al.*, 1970). A TM é um antibiótico que atua na inibição da N-acetilglicosamina-1-fosfotransferase, enzima responsável pela catalização da transferência de N-acetilglicosamina-1-fosfato a partir de UDP-N-acetilglicosamina para o dolicol fosfato, nos primeiros passos do processo de glicosilação proteica (DUKSIN and MAHONY, 1982).



**Figura 3. Estrutura química da tunicamicina.** Adaptado de Sigma Aldrich.

Entender as vias afetadas pelo bloqueio da N-glicosilação proteica e aumento da virulência concomitante a aquisição de resistência a tunicamicina da *Leishmania* possui uma enorme importância para a compreensão dos mecanismos de interação parasito-hospedeiro. Estudos prévios demonstram alguns efeitos da presença de TM nas culturas de *L. braziliensis*, como a diminuição do crescimento dos parasitos, distensão do retículo endoplasmático rugoso, alterações no glicocálice e diminuição da síntese de proteínas (DAGGER *et al.*, 1984). Em *L. amazonensis*, foi demonstrado que as variantes resistentes à tunicamicina apresentaram aumento expressivo na virulência (KINK e CHANG, 1987). Já em *L. donovani*, o antibiótico reduziu a infectividade das formas promastigotas tratadas com TM (NOLAN e FARRELL, 1985).

## **2.7 As abordagens metabolômicas para os estudos de metabolismo de *Leishmania***

A capacidade tecnológica de examinar os produtos finais e intermediários do metabolismo, denominada metabolômica, é um campo de estudo crescente que permite a identificação de pequenas moléculas presentes em um determinado momento do perfil metabólico de uma célula, tecido, órgãos ou organismo (PAGET *et al.*, 2013). Considera-se que a metabolômica é um campo emergente em genômica funcional e é complementar a outras tecnologias da era pós-genômica. A complementariedade de dados de transcriptômica e proteômica com os dados de metabolômica é de considerável importância para auxiliar na compreensão dos complexos aspectos biológicos dos parasitos (SCHELTEMA *et al.*, 2010).

A análise de um metaboloma gera a representação mais próxima do fenótipo, e a visualização de mapas metabólicos permite o entendimento de alterações no metabolismo e o impacto biológico, como adaptações no metabolismo de organismos resistentes a drogas ou potenciais alvos para ação de medicamentos (SCHELTEMA *et al.*, 2010; PAGET *et al.*, 2013).

A associação de protocolos com diferentes métodos de extração e de plataformas analíticas é empregada visando uma análise mais ampla do metaboloma, visto a diversidade de propriedades químicas e físicas dos metabólitos (SCHELTEMA *et al.*, 2010). Dentre as metodologias analíticas mais utilizadas estão: a ressonância magnética nuclear (RMN), eletroforese capilar (CE), cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC), associados à espectrometria de massas (PAGET *et al.*, 2013).

A identificação de compostos como ácidos graxos, lipídeos de baixo peso molecular e outras moléculas voláteis tem como padrão-ouro a plataforma de GC-MS. A cromatografia gasosa é uma tecnologia apresenta baixo custo associado à facilidade operacional com uma alta sensibilidade e reprodutibilidade, além de permitir a utilização de bases de dados públicas e comerciais para identificação dos compostos (SCHELTEMA *et al.*, 2010; GARCIA e BARBAS, 2011; PAGET *et al.*, 2013).

A integração de abordagens proteômicas e metabolômicas foi empregada para identificar mudanças moleculares que possam explicar os fenótipos adquiridos após a geração de *Leishmania* mutantes, deficientes no transporte de glicose.

Mudanças nas vias de produção de glicoconjugados e homeostase do sistema redox foram detectadas (AKPUNARLIEVA *et al.*, 2017).

A crescente resistência as drogas leishmanicidas e a ocorrência de sérios efeitos colaterais representam alguns dos principais desafios no controle das leishmanioses (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 medicamentos antimoniais ainda são os de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose e sua eficácia é cada vez mais ameaçada pelo surgimento de linhagens resistentes (ALVAR *et al.*, 2006). A miltefosina, uma droga inicialmente desenvolvida para o tratamento de tumores, apresenta também atividade leishmanicida e tem sido empregada como alternativa aos antimoniais. O mecanismo de ação e os associados a uma provável resistência ainda não são completamente elucidados. A partir de estudos metabolômicos evidenciou-se um aumento gradual nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular nos parasitos sensíveis, possivelmente associados à disfunção mitocondrial (CANUTO *et al.*, 2014; VINCENT *et al.*, 2014). Os parasitos resistentes apresentam um nível de internalização da droga menor e 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). Associou-se ao tratamento com miltefosina nos parasitos sensíveis o aumento nos níveis de açúcares e alcanos e sinais de danos ao DNA durante os picos de produção de ROS. O comprometimento da membrana celular e o extravasamento dos componentes intracelulares possivelmente se relacionam à diminuição dos níveis da maioria dos metabólitos (VINCENT *et al.*, 2014).

Diante da importância dos processos envolvidos na glicosilação de proteínas para a virulência de *Leishmania*, entender os mecanismos pelos quais os parasitos regulam as etapas da glicosilação e sua influência nas relações parasito-hospedeiro faz-se necessário o uso de técnicas sensíveis e capazes de detectar diferenças mínimas no metabolismo de *Leishmania*. A ferramenta de metabolômica empregando a cromatografia gasosa é uma ótima candidata para auxiliar no estudo desses mecanismos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar as vias metabólicas envolvidas no processo de aquisição de resistência e de uma linhagem mutante de *Leishmania braziliensis* resistente à tunicamicina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Gerar linhagem de *L. braziliensis* resistente à tunicamicina;
- Avaliar as alterações morfológicas e moleculares induzidas pela seleção para resistência à tunicamicina;
- Avaliar infectividade da linhagem resistente à tunicamicina;
- Gerar linhagem sensível à tunicamicina, a partir da linhagem resistente e avaliar mudanças no genótipo;
- Analisar comparativamente o metaboloma da linhagem mutante TM40 em comparação com o da cepa selvagem por GC-MS;
- Identificar vias potencialmente alteradas entre a linhagem mutante à cepa selvagem.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Cultivo de *Leishmania* e produção da variante resistente TM40

A linhagem *wide type* (WT) de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227) foi gentilmente cedida pela Dra. Camila Indiani Oliveira, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz, Bahia e mantida em cultivo em meio M199 (KAPLER *et al.*, 1990), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e 2% de urina humana, [40 mM] de hepes (pH 7,5), [5 mg/L] de hemina, [1 mg/L] de biotina, [0,1 mM] de adenina, [100 U/mL] de penicilina e [100 µg/mL] de estreptomicina.

Para determinar o DL<sub>50</sub> da linhagem WT, foi realizado um ensaio de acordo com o método de Dutta e colaboradores (2005). A tunicamicina foi diluída em série de 6 a 0,01 µg/mL em M199 (suplementado com 10% de SFB e 2% urina humana) contendo  $2 \times 10^5$  parasitos/mL da linhagem WT de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227). Um total de  $4 \times 10^4$  parasitos por poço foram plaqueados em microplacas de 96 poços e incubados a 26°C até o final da fase logarítmica. Depois, 100 µg de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) foram dissolvidos em 10 µL de PBS e foi adicionado por poço, e as placas foram incubadas a 37°C por 4 horas. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 3000 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi dissolvido em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida em 492 nm, e os dados para dois ensaios independentes foram realizados em triplicata.

As promastigotas mutantes resistentes à tunicamicina foram produzidas pelo método “*stepwise*” por meio de passagens seriadas em concentrações gradativamente aumentadas de tunicamicina. As concentrações utilizadas a cada passagem foram 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. A cultura final da linhagem resistente à tunicamicina foi mantida em meio M199 com tunicamicina a 40 µg/mL para manutenção da pressão de droga, sendo denominada TM40. Ambas as culturas WT e TM40 foram mantidas em estufa BOD a 26°C em frascos de cultura de tecido, sendo acompanhadas por observação em microscópio invertido (NIKON Eclipse TS 100).

### 4.2 Curva de crescimento

A curva de crescimento foi realizada baseada na concentração de células por mL das linhagens WT e TM40 sob pressão de 40 µg/mL de tunicamicina, com a concentração inicial de  $2 \times 10^5$  parasitos por mL. As contagens foram realizadas

diariamente durante 9 dias, em triplicata biológica, por meio de câmara hemocitométrica de Neubauer (New Optik) espelhada, de 0,1 mm<sup>2</sup> de profundidade.

Para a comparação do crescimento da cepa WT e linhagem TM40 sob pressão de tunicamicina iniciou-se o ensaio com 2x10<sup>6</sup> parasitos por mL e após 24 horas do início da contagem adicionou-se às culturas da cepa WT e linhagem TM40 40 µg/mL de tunicamicina. A cepa WT sem a pressão de droga também foi utilizada no ensaio, como controle. As contagens foram feitas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

### **4.3 Reversão do fenótipo de resistência da linhagem TM40**

A linhagem TM40 foi submetida a 20 passagens em meio axênico sem a pressão de tunicamicina. Após as passagens a linhagem foi denominada de TM40rev. Avaliou-se o seu perfil de crescimento da TM40rev com e sem a pressão de droga em comparação à linhagem TM40 sob pressão de droga. A concentração inicial foi de 2x10<sup>5</sup> parasitos por mL e as contagens foram realizadas diariamente durante 9 dias, em triplicata biológica, através de câmara hemocitométrica de Neubauer (New Optik) espelhada, de 0,1 mm<sup>2</sup> de profundidade.

### **4.4 Avaliação da virulência**

#### **4.4.1 Infecção em hamsters**

Promastigotas foram coletadas de uma cultura em fase estacionária (3 dias após o término da fase exponencial) para infecção de hamsters. Os parasitos mortos foram removidos por centrifugação a 100 xg por 3 minutos a temperatura ambiente (TA). As promastigotas vivas foram sedimentadas por centrifugação 2.500 x g durante 10 minutos a 4°C, lavadas duas vezes com PBS 1X (1.540 x g, 10 minutos a 4°C) e contadas. O sedimento foi suspenso para 1x10<sup>7</sup> promastigotas por mL e armazenado em gelo até o momento da infecção. Utilizou-se 10 µL desta suspensão (1x10<sup>5</sup> promastigotas) para inocular na base da orelha direita do animal por via intradérmica, anteriormente anestesiados com 80 µL de cloridrato de cetamina (0,1 g/mL) por via intraperitoneal. Foram utilizados 8 animais por grupo para cada cepa no ensaio. O tamanho da lesão foi definido pelo diâmetro da lesão e foi monitorado semanalmente usando um paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP).



#### **4.4.2 Infecção *in vitro***

Camundongos BALB/c foram eutanaziados e as células peritoneais foram coletadas através de lavagem da cavidade com 5 mL de PBS (pH 7,4). Para a infecção *in vitro*, os macrófagos foram coletados e imediatamente armazenados em gelo, lavados em PBS 1X (1.540 x g, 10 minutos a 4°C), ressuspensos em meio RPMI (5×10<sup>5</sup> células) e distribuídos em lâminas de vidro redondas (13 mm), contidas em placas de 24 poços de fundo plano. Após 4 horas de incubação, as células não aderentes foram removidas e as células aderentes foram infectadas com promastigotas de fase estacionária (3 dias de estacionária) na proporção de 10 parasitos por macrófago durante 4 horas a 37°C. As células infectadas foram lavadas 3 vezes com RPMI incompleto para remover promastigotas não internalizadas e mantidas em meio RPMI em 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C durante 48 horas. No final do ensaio, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X (1.540 x g, 10 minutos a 4°C), coradas com corante de Panótico (kit Panótico Rápido LB, Laborclin, Paraná, Brasil), secas, montadas em lâminas de vidro com meio de montagem Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe BV, Alphen an den Rijn, Holanda), os parasitos intracelulares foram contados usando um microscópio Leica DM500 usando uma objetiva de 100x e 300 células em triplicatas técnicas foram contadas.

#### **4.4.3 Citometria de fluxo**

Parasitos na fase logarítmica e estacionária (3° e 8° dia respectivamente) de cultivo da cepa WT e linhagem TM40 de *L.braziliensis* e de *L.amazonensis*, como controle do ensaio, foram centrifugados a 200 x g, 4°C, 10 minutos para remoção das células mortas. Posteriormente, 10<sup>7</sup> células foram coletadas por centrifugação (1540 x g, 10 minutos, 4°C) e lavadas três vezes com PBS 1x (1.540 x g, 10 minutos a 4°C). Em seguida, os parasitos foram fixados em 300 µL 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*.

#### **4.5 Microscopia eletrônica**

Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura foram realizados com promastigotas na fase log tardia da cepa WT e linhagem TM40 (1×10<sup>8</sup>). Para

microscopia de varredura, as formas foram coletadas, lavadas em 10 mL PBS 1X contendo  $\text{CaCl}_2$  [0,9 mM] e  $\text{MgCl}_2$  [0,5 mM] (1.540 x g, 10 minutos a 4°C), e incubadas 90 minutos a temperatura ambiente (TA) em 1 mL de 2% glutaraldeído em PBS (com cálcio e magnésio). Os parasitos foram sedimentados e ressuspensos em 1 mL de cacodilato de sódio [0,1 M] (pH 7,4) e incubados durante 2 dias a 4°C. O material foi analisado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Bioagentes Moleculares e Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (BCMBP - FMRP / USP).

A microscopia de transmissão foi realizada com  $3 \times 10^8$  promastigotas submetidas a 2 tratamentos distintos: (1) WT tratado com 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina por 24 horas; (2) TM40 resistente. Os parasitos foram sedimentados por centrifugação a 2000 xg, 4°C por 10 minutos. Os sedimentos foram lavados 3 vezes com PBS 1X (1.540 x g, 10 minutos a 4°C), e uma vez com cacodilato de sódio [0,1 M] pH 7,4. O sedimento foi suspenso em solução de fixação (cacodilato de sódio [0,1 M] pH 7,4, 2% glutaraldeído (v/v), 2% paraformaldeído (v/v) e 0,05%  $\text{CaCl}_2$  (m/v)) e incubado por 2 horas a TA. Após a fixação as células foram lavadas 2 vezes com cacodilato de sódio [0,1 M] pH 7,4 (1.540 x g, 10 minutos a 4°C), e mantidas por 3 dias em tampão (cacodilato de sódio [0,1 M] pH 7,4 e 5% (m/v) sacarose). Este material foi analisado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - Biofísica, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

## **4.6 Amplificação gênica na linhagem TM40**

### **4.6.1 Pulsed-Field (PFGE)**

O preparo do DNA genômico de *Leishmania* em blocos de agarose tem a vantagem de fornecer um DNA íntegro ao final do procedimento para as posteriores análises. Esse DNA contido nos blocos de agarose pode ser utilizado diretamente para verificação do cariótipo molecular por eletroforese em campo pulsátil (do inglês, PFGE). Para o preparo dos blocos utilizou-se células de uma cultura em fase de crescimento exponencial. Os parasitos foram centrifugados a 1000 xg por 10 minutos, 4°C e dispersados em meio M199 sem SFB de forma a obter  $3,5 \times 10^8$  promastigotas/mL. Essa suspensão de promastigotas foi diluída 1:1 na solução PSG-agarose 1%, preparada pela mistura de volumes iguais, a 42°C, de solução PSG 2X ( $\text{NaCl}$  [130 mM]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [142 mM];  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [8,0 mM] e glicose 2%) com solução de agarose LMP (*low melting point agarose*) 2%. Ao término do

procedimento os blocos contêm: agarose 0,5%; NaCl [32,5 mM]; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [35,5 mM]; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [2,0 mM], glicose 0,5% e 1x10<sup>7</sup> promastigotas. A suspensão final foi distribuída em placas de acrílico com poços de dimensões aproximadas de 0,04 x 0,06 x 0,02 cm (63 µL/poço), mantidas a 4°C por 20 minutos antes dos blocos serem excisados e transferidos para a solução de lise onde ficaram incubados por 2 dias a 42°C. Os blocos foram lavados com solução de Tris-HCl [200 mM] e EDTA [100 mM], por 2 dias, com trocas periódicas a cada 24 horas. Os blocos podem ser estocados durante anos nesta mesma solução se mantidos a 4°C.

O DNA cromossômico contido em blocos de agarose foi submetido a diferentes condições eletroforéticas de acordo com a necessidade de separação (em gel agarose *low melting* 2% para corrida curta). Desse modo, o tempo de corrida e o protocolo de alternância dos pulsos foram programados no aparelho *CHEF DRII* (BioRad): pulso inicial de 10 a 30 segundos durante 24 horas a 4,5 V/cm para separação de moléculas circulares (corrida curta). Para a corrida curta, a eletroforese ocorreu com o gel submerso em solução tampão TBE diluído 0,5X (Tris [0,045 M], ácido bórico [0,045 M] e EDTA [0,001 M], pH 8 com temperatura controlada de 11-14°C. Terminada a separação dos fragmentos de DNA, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo [0,5 µg/mL] por uma hora e descorado a seguir por 30 minutos, em água milli-Q. Os cromossomos foram visualizados sob luz UV<sub>260nm</sub>.

#### **4.6.2 Eletroforese em gel de alternância de campo ortogonal**

Para análise de eletroforese em gel com alternância de campo ortogonal (OFAGE), foram preparados blocos de agarose contendo DNA cromossômico conforme descrito na sessão anterior. O DNA foi fracionado em 0,5% de agarose, 0,5X TBE, 14°C, a 300 V por 20 h, com intervalos de 40 s entre o pulso. Os géis foram corados no pós-operatório com brometo de etídeo [0,5 µg/mL].

#### **4.6.3 Lise alcalina do material amplificado**

Para a lise alcalina, utilizou-se 1x10<sup>7</sup> promastigotas em fase estacionária. Os parasitos foram lavados três vezes com PBS por centrifugação a 1540 xg, 10 min, 4°C. A extração de DNA foi realizada com o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídeo.

## 4.7 Análise metabolômica comparativa entre as linhagens WT e TM40

As linhagens WT e TM40 da espécie *Leishmania braziliensis* foram cultivadas de forma sincrônica e monitoradas diariamente através de observação microscópica e contagem em câmaras de Neubauer. Os parasitos foram coletados na fase log tardia para extração dos metabólitos.

### 4.7.1 Extração e derivatização dos metabólitos

Para a extração dos metabólitos, os parasitos foram submetidos ao *quenching* metabólico por meio da imersão das garrafas de cultivo em banho de etanol/gelo seco por aproximadamente 10 segundos, para evitar que as alterações encontradas no metabolismo estejam associadas com o manuseio das amostras e/ou ao método de extração (VINCENT e BARRETT, 2015). As garrafas foram alíquotadas em 10 tubos contendo  $4 \times 10^7$  parasitos/cada. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X gelado (0-4°C) por centrifugação à 4°C, 1540 x g por 10 minutos e os sedimentos foram armazenados à -80°C até o momento do uso. Ao sedimento foi adicionado 300 µL de uma solução de clorofórmio/metanol/água (1:3:1) gelada e as células foram submetidas a quatro ciclos repetidos de congelamento e descongelamento (aproximadamente 0°C e 37°C). O lisado foi centrifugado por 10 minutos, 16000 x g à 4°C e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para um frasco *vial* de vidro contendo um inserto. Adicionalmente, foi produzida uma amostra de branco, que consiste no processamento do solvente de extração. 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 10 µL de metoxiamina (15 ppm, 15 mg/mL) em piridina. Os tubos foram encapsulados e submetidos a três ciclos de agitação em vórtex por cinco minutos e incubados *overnight* à temperatura ambiente em local protegido da luz. Para silição, 10 µL de BSFTA+TMS (99:1) foram adicionados aos *vials* descapsulados. Em sequência, os *vials* foram recapsulados, submetidos a agitação em vórtex por 5 minutos e incubados por 1 hora à 70°C. As amostras foram descapsuladas e 100 µL de heptano contendo 10 ppm de padrão C18 foram adicionados. Foram coletados 20 µL de cada amostra para o preparo dos controles de qualidade ou *quality control* (QC), de modo que foram produzidos 1 QC para cada 5 amostras. Em seguida, as amostras foram armazenadas à -80°C até a sua injeção no GC-MS.

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

Os parâmetros da injeção das amostras no GC-MS para metabolômica foram previamente otimizados por Garcia e Barbas (2011). Dois microlitros das amostras derivatizadas 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<sup>®</sup>) integrada a uma coluna ultrainterte 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<sup>®</sup>). 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 quadropólo (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.

#### **4.7.3 Processamento dos dados**

O software AMDIS 2.69 foi utilizado para executar o processo de deconvolução. Em seguida, o alinhamento foi realizado com o software Mass Profiler Professional 14 (Agilent). Os dados foram escalonados 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). Os perfis metabólicos foram analisados por análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de menor quadrado parcial (PLS-DA). Este método matemático permite a visualização das diferenças mais importantes entre as amostras e ajuda a identificar os valores atípicos e a construir um modelo estatístico que otimize a separação entre as linhagens. As diferenças foram avaliadas para metabólitos individuais por comparação de grupos usando *JackKnife* de modelos, Análise Discriminante

de Projeção Ortogonal de Estrutura Latente (OPLS-DA), realizados pelo *software* SIMCAP 14.1 (Umetrics).

Para identificação de diferenças entre as linhagens, 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 ao teste T de *Student* e as não normais foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney U, utilizando um valor  $p < 0,05$

#### **4.8 Análises de bioinformática**

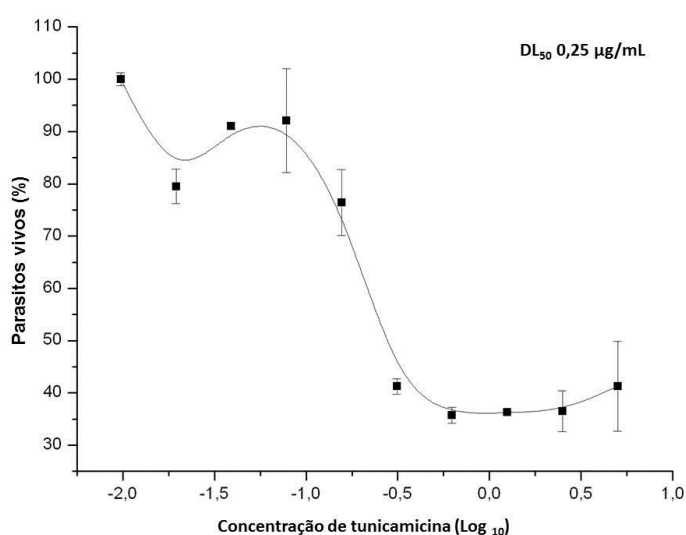
O enriquecimento de vias metabólicas foi determinado pelo *software* MBRole 2.0. A base de dados utilizada para identificar os metabólitos desse estudo foi o KEGG. A lista com as identidades KEGG foi submetida a análises, tendo a *L.major* como organismo de referência. As vias que apresentaram valor de  $p < 0,05$  foram consideradas enriquecidas e estatisticamente significantes.

Todos os metabólitos considerados estatisticamente significativos foram categorizados conforme sua classificação bioquímica e via bioquímica relacionada. Essas classificações foram definidas com base em informações disponíveis sobre cada metabólito no KEGG, HMDB, *Pubchem*, e ChEBI.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Geração dos mutantes resistentes e DL<sub>50</sub> para tunicamicina em *Leishmania braziliensis*

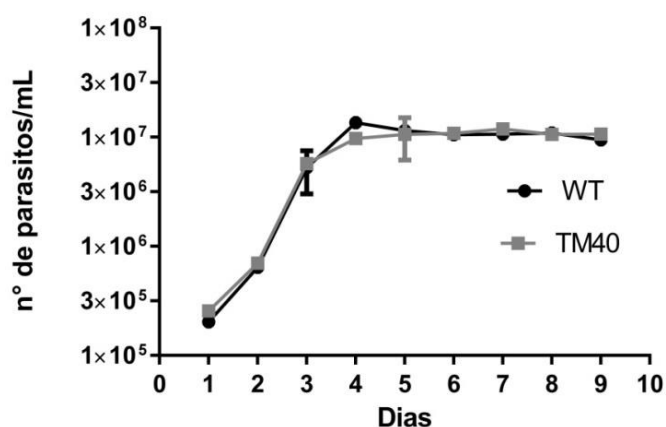
A DL<sub>50</sub> para tunicamicina da cepa WT de *L.braziliensis* foi determinada para calcular as concentrações a serem utilizadas na seleção *stepwise*, sendo obtido o valor de 0,25 µg/mL (figura 4). Então, partiu-se de um valor de 8 vezes da DL<sub>50</sub> [2 µg/mL], para iniciar a geração dos mutantes, até uma concentração de 40 µg/mL de tunicamicina, que corresponde a 80 vezes a DL<sub>50</sub>. A concentração de 40 µg/mL foi escolhida para manter os parasitos mutantes sob pressão da droga para a realização dos experimentos.



**Figura 4. DL<sub>50</sub> de tunicamicina para *Leishmania braziliensis*.** Parasitos da cepa WT foram utilizados para o ensaio de DL<sub>50</sub> de tunicamicina. O ensaio utilizou o antibiótico tunicamicina em uma diluição em série de 6 a 0,01 µg/mL em M199 (suplementado com 10% de SFB e 2% urina humana) contendo 2x10<sup>5</sup> parasitos/mL.

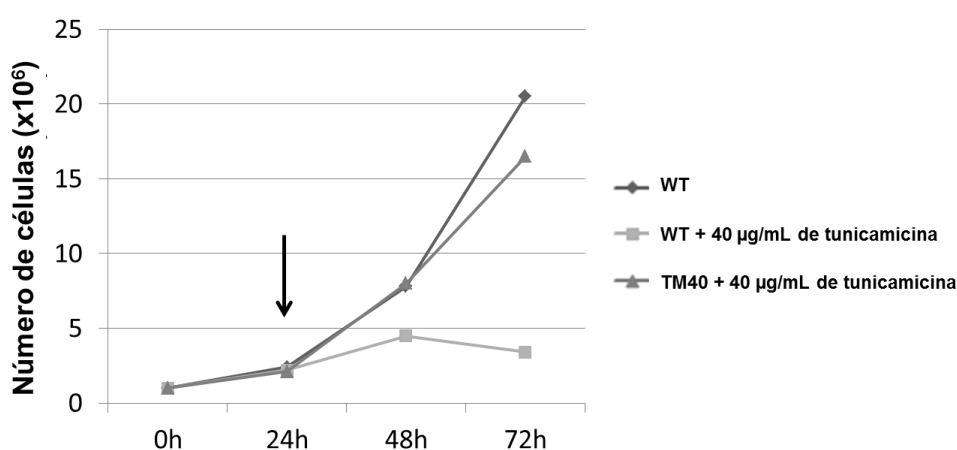
### 5.2 Curva de crescimento

Com o objetivo de se avaliar se a linhagem resistente TM40 apresentava alguma alteração no padrão proliferativo, foram realizadas contagens diárias das duas linhagens, para a construção do gráfico e determinação do perfil de crescimento. O perfil de crescimento das duas cepas foi semelhante durante todos os dias de contagem sem diferença estatisticamente significativa. As cepas apresentaram uma fase logarítmica de 4 dias e se mantiveram na fase estacionária até o último dia de contagem.



**Figura 5** Perfil de crescimento da cepa WT e linhagem TM40 de *L. braziliensis in vitro*. Os parasitos foram cultivados em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de urina. A linhagem TM40 foi mantida sob pressão de 40 µg/mL de tunicamicina. O crescimento foi monitorado através de contagens diárias em câmaras de Neubauer.

Para avaliar o fenótipo de resistência apresentado pela linhagem TM40, realizamos a comparação da proliferação da linhagem TM40, sob pressão de droga e da cepa WT sem e sob pressão de 40 µg/mL de tunicamicina. Até o momento da adição da droga (seta), as cepas apresentavam a mesma taxa de crescimento. Após a droga ser incorporada ao meio de cultivo, os perfis da TM40 e WT sem a pressão de droga se mantiveram semelhantes, mas a cepa WT, sob pressão de droga teve seu crescimento inibido (figura 6).

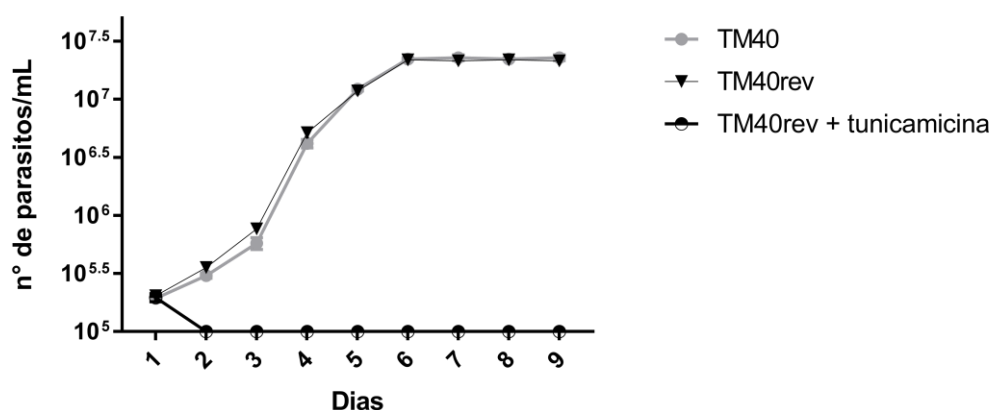


**Figura 6.** Comparação da proliferação da cepa WT e linhagem TM40 sob pressão da tunicamicina. A cepa WT e a linhagem TM40 foram submetidas a pressão de 40 µg/mL de tunicamicina após 24 horas do início da contagem do número de parasitos em cultivo axênico.



### 5.3 Reversão do fenótipo de resistência da TM40

A linhagem TM40 foi submetida a 20 passagens sucessivas sem a droga tunicamicina, gerando a linhagem TM40 revertente (TM40rev), que foi avaliada quanto a sua taxa de proliferação, em contagens diárias por 9 dias. Como pode ser observado na fig. 7, a cepa TM40 sob pressão de droga e TM40rev sem pressão de droga apresentaram perfil de crescimento semelhante, durante todos os dias de contagem sem diferença estatisticamente significativa. As cepas apresentaram uma fase logarítmica de 4 dias e se mantiveram na fase estacionária, até o último dia de contagem. No entanto, a cultura da TM40rev quando submetida a pressão de droga [40 ug/mL] se tornou inviável.



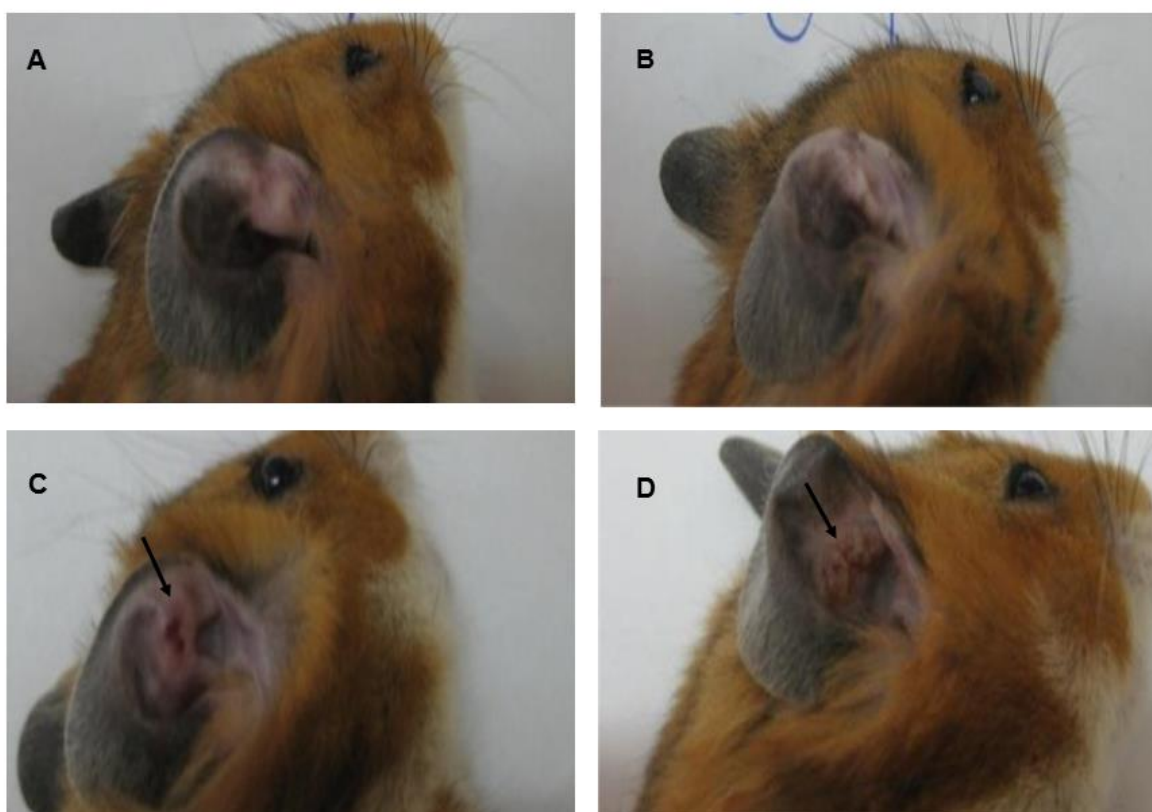
**Figura 7. Perfil de crescimento das linhagens TM40 e TM40rev de *L. braziliensis* in vitro.** Os parasitos foram cultivados em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de urina. A linhagem TM40 foi mantida sob pressão de 40 µg/mL de tunicamicina. A TM40rev foi submetida a pressão de 40 µg/mL de tunicamicina, mas ao segundo dia de contagem o cultivo se tornou inviável. O crescimento foi monitorado através de contagens diárias em câmaras de Neubauer.

### 5.4 Avaliação da virulência da linhagem TM40

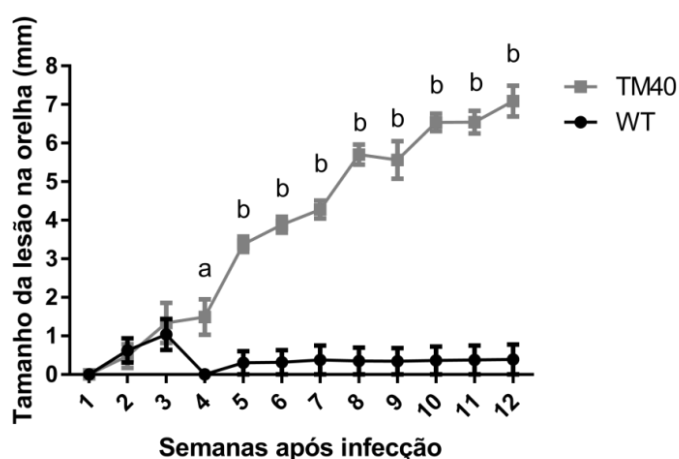
Para avaliar o perfil de virulência da cepa de *L. braziliensis* WT e da linhagem resistente TM40,  $10^5$  promastigotas em fase estacionária foram inoculadas em orelha de hamsters. As avaliações semanais, a partir da segunda semana e no período total de 12 semanas indicaram que todos os hamsters infectados com a cepa WT apresentaram sinais inflamatórios (eritema e edema). Na segunda medição (2ª semana), a média de diâmetro das lesões foi de 0,62 mm. Porém, após as três primeiras semanas e até o período final do experimento (12 semanas), as

lesões do grupo WT regrediram, sendo observada a cura espontânea (Figura 8.A e B, figura 9).

Os animais da linhagem TM40 apresentaram as mesmas características iniciais da WT, com média de tamanho de lesões na medição da 2ª semana de 0,47 mm e (Figura 9). Após esse período, as lesões evoluíram, atingindo média final às 12 semanas de 7,08 mm ( $p < 0,001$ ) (figura 9), com aspecto ulcerado e granular, superfície necrótica e bordas eritematosas elevadas (Figura 8.C e D), portanto, sem cura espontânea nesse período.

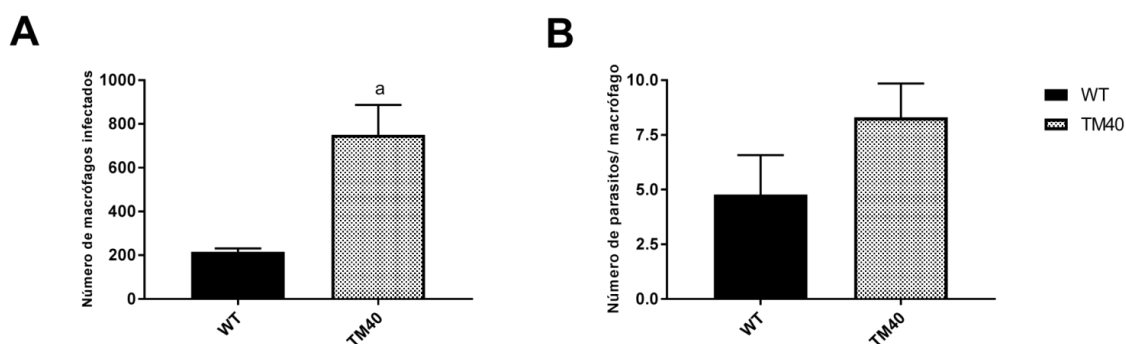


**Figura 8.** Representação da infecção em hamsters da cepa de *Leishmania braziliensis* WT e a linhagem resistente a tucamicina TM40. **A e B:** Animais infectados na orelha direita (n=8) com a cepa WT, após 12 semanas de infecção, apresentando cura espontânea da lesão. **C e D:** Animais infectados na orelha direita (n=8) com a cepa WT, após 12 semanas de infecção, apresentando lesões com aspecto ulcerado e granular, superfície necrótica e bordas eritematosas elevadas.



**Figura 9. Curso da infecção, medido por meio do edema desencadeado pela infecção em orelha de hamsters com *Leishmania braziliensis* cepa WT e linhagem resistente a tunicamicina TM40.** Após infecção com  $10^5$  promastigotas, os animais de cada grupo (n=8) foram monitorados por 12 semanas, por medição do tamanho das lesões. Animais inoculados com a cepa WT apresentaram aumento da lesão até a 3ª semana e após, houve regressão e cura. A linhagem TM40 causou lesões que aumentaram gradativamente até a 12ª semana. As letras a e b indicam diferenças significativas no tamanho das lesões causadas por WT e TM40 (a:  $p < 0,05$ , b:  $p < 0,001$ ).

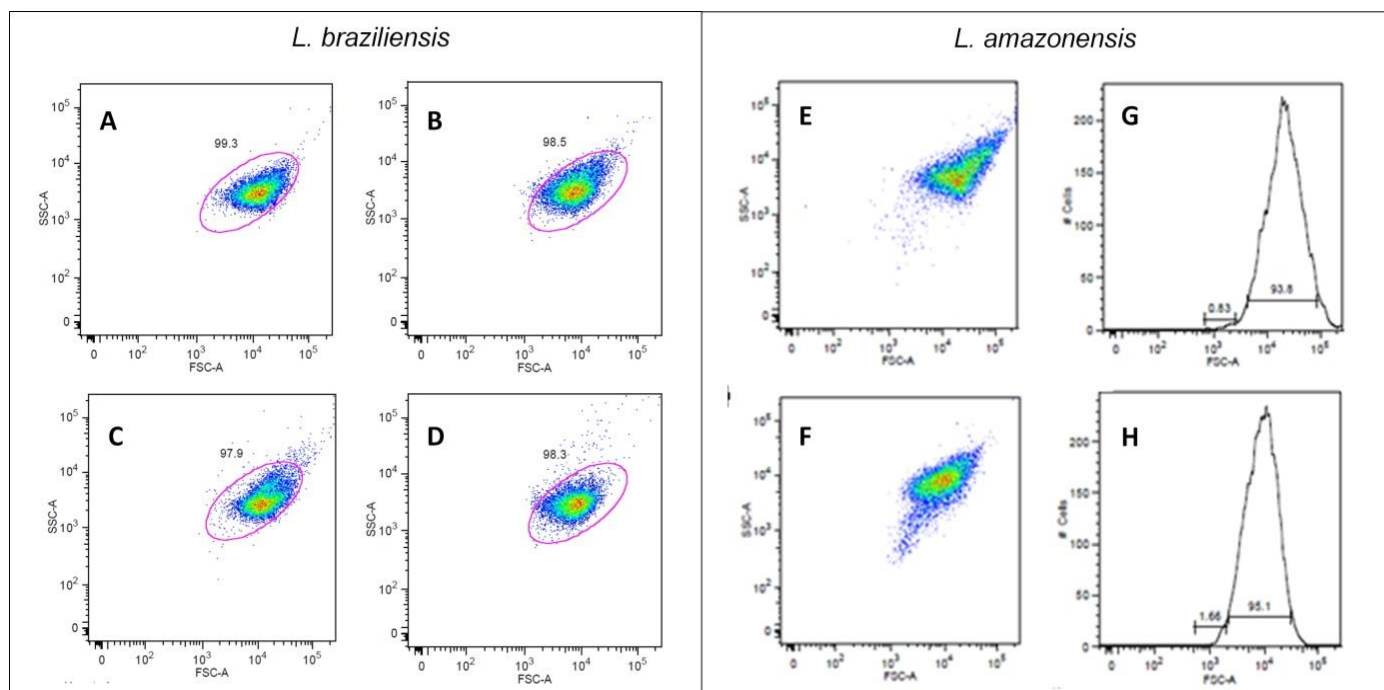
A infecção *in vitro* de macrófagos coletados de peritônio de camundongos BALB/c infectados com a linhagem TM40 e WT foi determinada e comparada em dois experimentos independentes feitos em triplicata. A linhagem TM40 apresentou um maior número de macrófagos infectados, quando comparada à cepa WT, sendo aproximadamente 750 macrófagos infectados contra 200 macrófagos infectados, respectivamente. Não houve diferença significativa entre a linhagem TM40 e a cepa WT na quantidade de amastigotas por macrófago infectado.



**Figura 10. Infecção *in vitro* de macrófagos da cepa WT e linhagem TM40.** A infecção *in vitro* de macrófagos foi realizada na proporção de 10 parasitos por macrófago **A**. Contagem de macrófagos infectados pela cepa WT e linhagem TM40. **B**. Contagem do número de parasitos por macrófago

infectado pela cepa WT e linhagem TM40. A linhagem TM40 apresentou um maior número de macrófagos infectados em 48 horas de infecção. Já a quantidade de amastigotas por macrófago não apresentou diferença entre a cepa WT e linhagem TM40 em 48 horas de infecção.

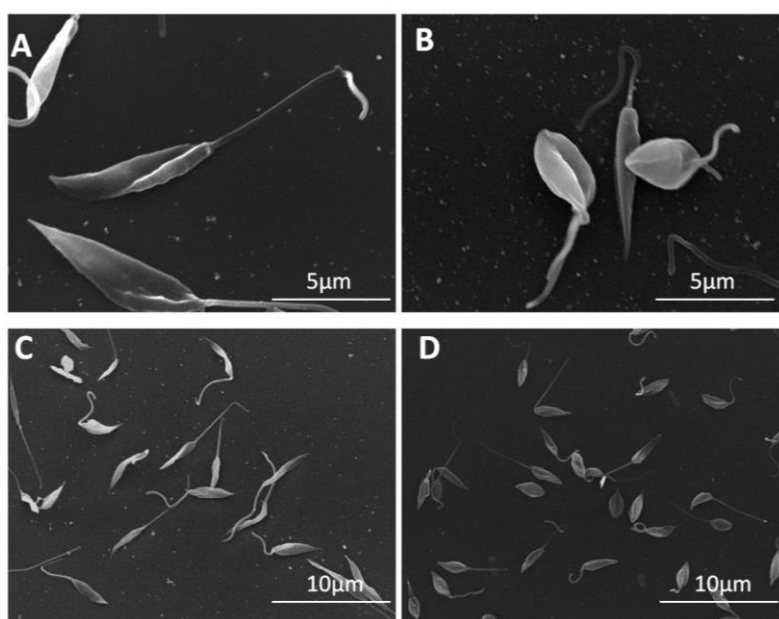
Com objetivo de avaliar as diferenças morfológicas entre promastigotas procíclicas e metacíclicas das cepas WT e TM40, foram realizados ensaios de citometria de fluxo analisando tamanho celular e granulosidade, para identificação e acompanhamento da metaciclogênese *in vitro* de *Leishmania* (SARAIVA *et al.*, 2005). Para tal, as cepas WT e TM40 nos dias 3 e 8 (fases logarítmica e estacionária, respectivamente) foram analisadas por citometria de fluxo, como representado na figura 11. Nossos resultados sugerem que o perfil da cultura das duas linhagens se mantém uniforme ao longo do tempo de cultivo. Em contraste, a proporção de células pequenas na cultura de *L. amazonensis* variou de aproximadamente 0,83% para 1,66%, aos 3 e 8 dias de cultivo, respectivamente, sugerindo que para essa espécie, nas condições empregadas, ocorre, em pequena fração, a diferenciação em promastigotas metacíclicas.



**Figura 11. Análise por citometria de fluxo da cepa WT e linhagem TM40 em cultivo axênico. A:** *L. braziliensis* WT 3 dias de cultivo; **B:** *L. braziliensis* WT 8 dias de cultivo; **C:** *L. braziliensis* TM40 com 3 dias de cultivo; **D:** *L. braziliensis* TM40 8 dias de cultivo; **E:** *L. amazonensis* 3 dias de cultivo; **F:** *L. amazonensis* 8 dias de cultivo. Aquisição de 10.000 eventos.

### 5.5 Análise dos efeitos da tunicamicina sobre a morfologia dos parasitos

As alterações morfológicas causadas pelo bloqueio da N-glicosilação gerado pelo antibiótico tunicamicina foram avaliadas em experimentos de microscopia de varredura das duas cepas WT e TM40. A linhagem TM40 (figura 12.B e D) apresentou uma redução do tamanho, quando comparado com a WT (figura 12.A e C), na microscopia. Foi também observado por microscopia eletrônica de varredura que promastigotas da linhagem TM40 apresentam-se arredondadas em comparação com as promastigotas selvagens.

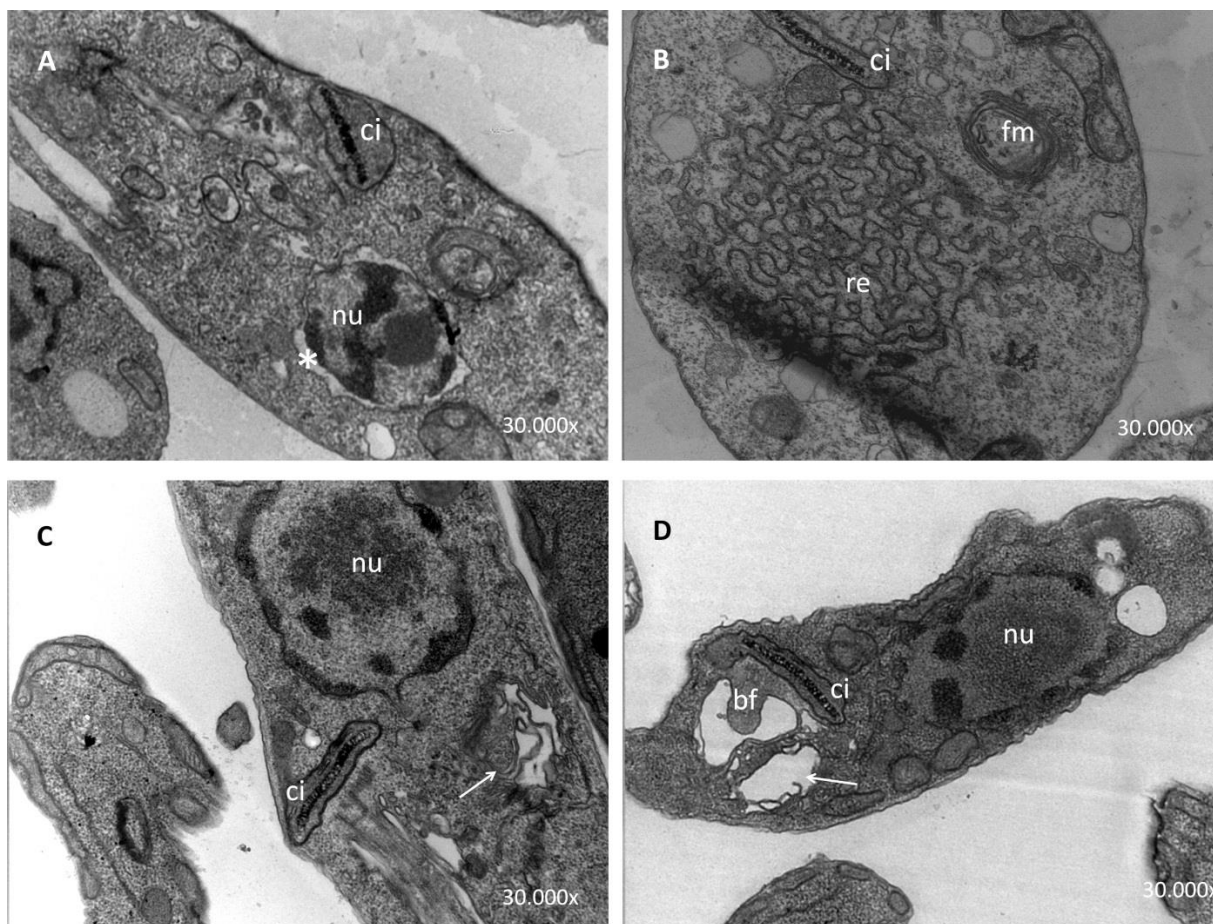


**Figura 12.** Avaliação das alterações morfológicas durante cultivo *in vitro* de *L. braziliensis* cepa WT e linhagem TM40 por microscopia de varredura. Os parasitos foram crescidos em garrafas de cultivo em meio M199 à 26°C, e foram coletados na fase log tardia (4º dia) de cultivo e analisados por microscopia de varredura e citometria de fluxo. **A e C** - *Leishmania braziliensis* WT. **B e D** - *Leishmania braziliensis* TM40.

Para avaliar os efeitos causados pela tunicamicina sobre a cepa WT e a linhagem TM40, foi realizado um ensaio de microscopia eletrônica de transmissão. A cepa WT foi submetida ao cultivo por 24 horas de incubação com 40 μg/mL de tunicamicina. Após 24 horas foi possível observar um deslocamento da membrana nuclear, uma desorganização do retículo endoplasmático e a presença de figuras de mielina, indicando morte celular (Figura 13. A e B).

Já a linhagem resistente TM40 apresentou um perfil diferente da cepa WT tratada com tunicamicina. Não foi observado deslocamento da membrana nuclear,

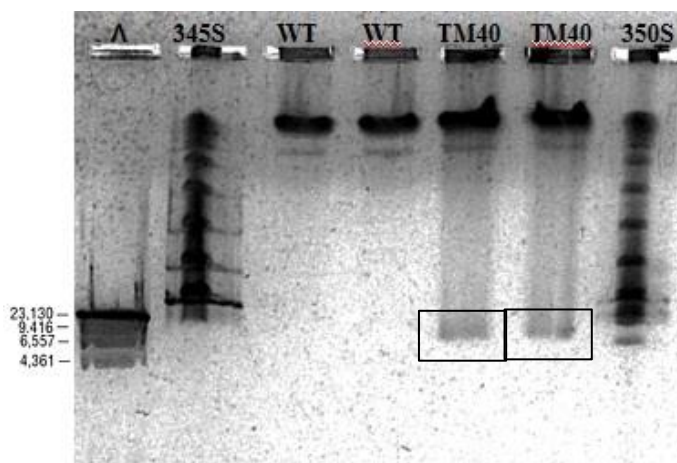
mas o complexo de Golgi apresentou um afastamento das cisternas, sendo percebido pelas lamelas desorganizadas. (Figura 13. C e D).



**Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão da cepa de *L. braziliensis* WT e linhagem resistente TM40. A e B:** Cepa WT tratada com 40 µg/mL de tunicamicina por 24 horas. **C e D:** Linhagem resistente TM40. Na cepa WT são observados deslocamento da membrana nuclear (indicado pela \*), desorganização do retículo endoplasmático e a presença de figuras de mielina, indicativos de degeneração e morte celular. A linhagem TM40 apresentou essas estruturas de aspecto normal, exceto pelo afastamento das cisternas do complexo de Golgi (indicado pela seta). nu: núcleo, ci: cinetoplasto, re: retículo endoplasmático, bf: bolsa flagelar, cg: complexo de Golgi. Aumento de 30.000x.

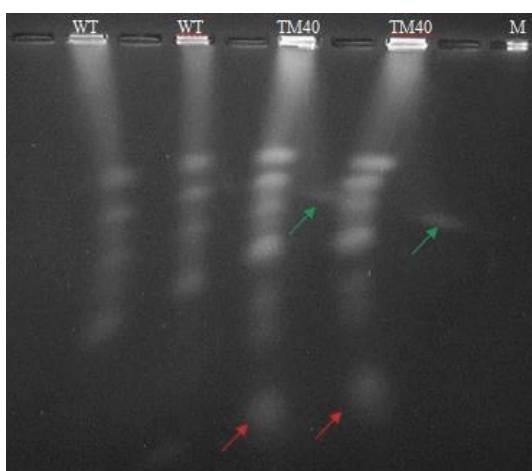
### 5.6 Amplificação gênica na linhagem TM40

Para avaliar se a indução de resistência à tunicamicina promove alguma alteração nos cromossomas do parasito, realizou-se a análise do cariótipo molecular por eletroforese em campo pulsátil. Utilizando as condições de “corrida curta”, observou-se a presença de uma banda, de aproximadamente 20 Kb, somente nas canaletas correspondentes à TM40 (figura 14, delimitado pela caixa).



**Figura 14. Eletroforese em campo pulsátil em gel de agarose low-melting 2% da cepa WT e linhagem TM40.** Da esquerda para a direita: Lambda DNA-Hind III, *Yeast Chromosome PFG Marker* (Catálogo NO345S, New England Biolabs®), WT, WT, TM40 e TM40, Low Range PFG Marker (Catálogo NO350S, New England Biolabs®). Observou-se a presença de uma banda, de aproximadamente 20 Kb, somente nas canaletas correspondentes à TM40 (delimitado pela caixa).

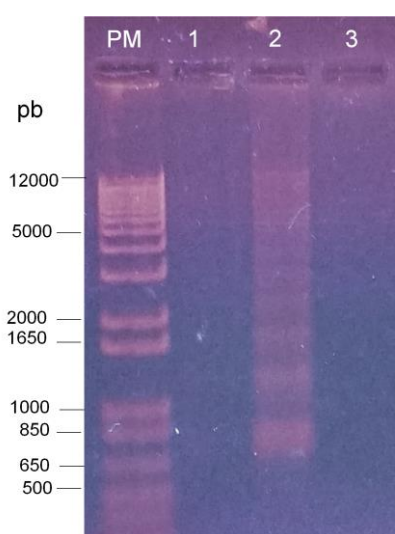
Utilizando a técnica de eletroforese em campo pulsátil OFAGE, com disposição dos eletrodos e condições de pulso e voltagem que permitem distinção entre fragmentos de DNA lineares e circulares, observamos que o mutante TM40 apresenta tanto amplificação de fragmentos lineares quanto circulares. O material genético amplificado que aparece na parte inferior do gel (figura 15, indicado pelas setas inferiores), nas canaletas correspondentes à linhagem TM40, sugere a amplificação de DNA linear e a banda que surge na lateral das canaletas sugere amplificação de material genético extracromossômico circular (figura 15, indicado pelas setas superiores).



**Figura 15. Eletroforese em gel de alternância de campo ortogonal das linhagens WT e TM40.** Gel agarose 1% (pulso de 58 segundos por 48 horas a 200 V). A disposição dos conferiu um aspecto distorcido dos rastros de DNA, permitindo que o DNA circular presente apenas na linhagem TM40

seja visível lateralmente (setas superiores). As setas inferiores indicam a presença de DNA linear amplificado na linhagem resistente. O marcador (M) não pode ser visto devido à distorção.

Com o objetivo de averiguar se passagens sucessivas sem a pressão de tunicamicina, gerando a cepa TM40rev, desencadeava alterações nas ampliações gênicas observadas na TM40, procedeu-se a extração por lise alcalina e o DNA extraído foi submetido a uma corrida eletroforética. A linhagem TM40 manteve seu perfil de amplificação gênica, mas como observado na figura 16, canaleta 3, mas não se observa padrão similar na TM40rev, com ausência de material circular purificado pelo método de lise alcalina.



**Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos amplicons circulares.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio. PM: padrão molecular; 1: cepa WT; 2: linhagem TM40 sob pressão de 40 ug/mL de tunicamicina; 3: linhagem TM40 revertida após 20 passagens sem pressão de droga.

### 5.7 Comparação do metaboloma da cepa WT e linhagem TM40 de *L. braziliensis* por GC-MS

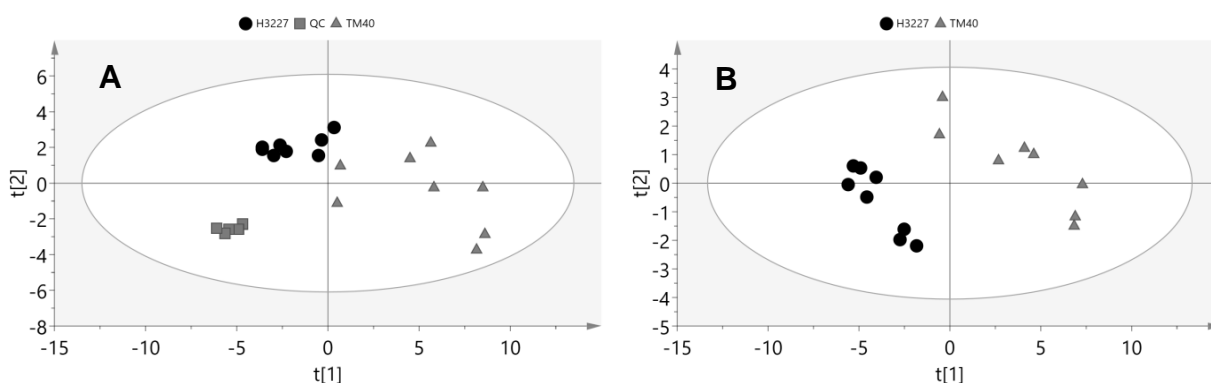
Tendo em vista as diferenças fenotípicas e moleculares da linhagem resistente TM40, além da sua característica resistência ao antibiótico em relação à cepa WT, aplicamos uma análise comparativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, para identificação diferencial de metabólitos nas duas linhagens.

Para avaliar a qualidade dos experimentos foi utilizado um método não-supervisionado de estatística multivariada, a análise dos componentes principais (PCA). O agrupamento de amostras ocorre apenas quando a diferença entre os grupos é maior que a variação dentro de cada grupo (WORLEY; POWERS, 2013).



Nota-se que os QCs (*quality controls*) agrupam-se em uma determinada região do gráfico, demonstrando que há estabilidade e reprodutibilidade na técnica utilizada para as análises do metaboloma (figura 17.A).

Ao confirmar a reprodutibilidade da técnica por PCA, partimos para as análises discriminantes utilizando a metodologia de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O método permite uma maior definição das separações entre os grupos analisados devido a sua natureza supervisionada. A figura 17.B representa uma análise de PLS-DA dos dados e é possível observar a separação das duas cepas no mesmo plano. Os parâmetros de qualidade da análise foram  $R^2$ : 0,544 e  $Q^2$ : 0,666, demonstrando a alta reprodutibilidade e capacidade predição estatística do modelo.



**Figura 17. Análises de PCA e PLS-DA dos metabólitos obtidos por GC-MS de *Leishmania braziliensis* cepa WT e linhagem resistente a tunicamicina TM40. A:** Análise de componentes principais construído com os metabólitos obtidos pelo GC-MS na presença dos QCs. Foram analisadas oito replicatas de cada linhagem, WT e TM40 e 5 QCs.  $R^2$ : 0,781 e  $Q^2$ :0,45. **B:** Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais classificando as replicatas em linhagens WT e TM40. Este gráfico foi construído com base nos metabólitos identificados pelo GC-MS.  $R^2$ =0,544 e  $Q^2$ =0,666.

A metodologia de cromatografia gasosa empregada permitiu a identificação de 27 metabólitos diferentemente abundantes nas duas cepas analisadas, WT e TM40. Com o intuito de identificar diferenças significativas os metabólitos foram submetidos a análises univariadas, que avaliaram os metabólitos por testes paramétricos e ao teste T de *Student* utilizando um valor  $p < 0,05$  e por multivariada, onde foi realizado o *jackknife* a partir de modelos de Análise Discriminante de Projeção Ortogonal de Estrutura Latente (OPLS-DA). Os dados foram sobrepostos e apresentados na Tabela 1, onde os metabólitos listados são significativos por ambas análises estatísticas.

Tabela 1. Enriquecimento de vias metabólicas pelo MBRole\*

| Metabólitos                               | p valor  |
|---|----------|
| Biossíntese de ácidos graxos              | 1.26e-04 |
| Biossíntese de ácidos graxos insaturados  | 9.43e-06 |
| Ciclo dos ácidos tricarboxílicos          | 5.65e-03 |
| Metabolismo de galactose                  | 2.13e-02 |
| Metabolismo de glicerolípido              | 5.39e-04 |
| Metabolismo de piruvato                   | 1.39e-02 |
| Metabolismo de propanoato                 | 9.84e-03 |
| Metabolismo de tirosina                   | 1.94e-02 |
| Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato | 1.86e-03 |
| Síntese de glicerol fosfato               | 2.31e-02 |
| UMP                                       | 1.85e-02 |
| Uracila para uridina                      | 1.85e-02 |

\* Utilizadas as anotações das vias do KEGG, sendo estatisticamente significativas as vias com um p valor <0,05.

As categorias bioquímicas classificadas como aminoácidos, peptídeos e conjugados, e lipídios e esteróis foram as mais representativas com 30% e 29% do total dos metabólitos, respectivamente. Em seguida, os carboidratos com 15%, dos ácidos nucleicos (purinas, pirimidinas e conjugados) 11%, ácidos orgânicos e derivados 7%, e glicerídios e compostos orgânicos com 4% (figura 18).

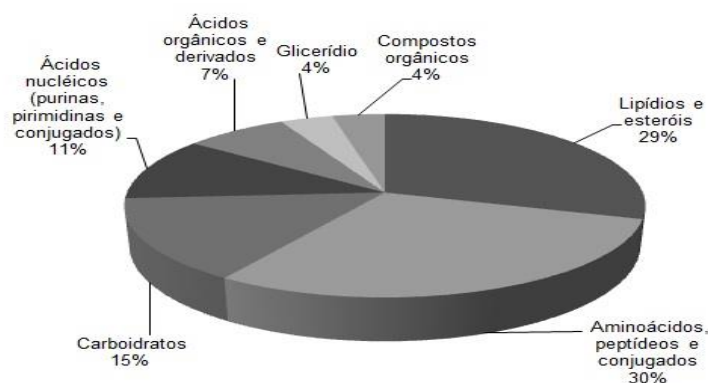


Figura 18. Classificação bioquímica dos compostos identificados por GC-MS em *Leishmania braziliensis* cepa WT e linhagem resistente a tunicamicina TM40. Todos os metabólitos estatisticamente significativos foram categorizados conforme sua classificação bioquímica. As categorias bioquímicas foram definidas com base em informações disponíveis sobre cada metabólito no KEGG, HMDB, Pubchem, e *ChEBI*.

Na Tabela 2, são listados todos os metabólitos identificados produzidos nas duas cepas no momento de análise e suas características como: a fórmula química, massa isotópica, classificação bioquímica e via bioquímica relacionada. A Tabela 2 também apresenta a média de abundância iônica de cada metabólito em cada cepa e o *fold change* de abundância dos metabólitos em comparação da TM40 frente à WT. Um total de 23 metabólitos está presente nas duas cepas, porém a TM40 apresentou um aumento da abundância de todos estes metabólitos em relação à WT. Os valores de *fold change* variaram de 1,336 a 6,149.

Dentre os metabólitos identificados, quatro estavam presentes em uma única cepa, ou TM40 ou WT, no momento metabólico analisado. A metionina foi o único metabólito identificado somente na análise da cepa WT, enquanto a lisina, prolina e adenosina foram detectados somente na linhagem TM40.

Foi realizado um enriquecimento de vias metabólicas no MBRole 2.0 e encontramos 12 vias enriquecidas, utilizando todos os metabólitos identificados. As vias enriquecidas listadas na Tabela 1 apresentam valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 2. Metabólitos detectados na cepa WT e linhagem TM40 de *L.braziliensis* por GC-MS\*

| Metabólito                 | Fórmula   | Massa (Da) | Média WT | Média TM40 | Fold change | Via bioquímica  |
|----------------------------|---|------------|----------|------------|-------------|---|
| Ácido linoleico            | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>                  | 280.240    | 6,422    | 12,859     | 2,002       | Biossíntese de ácidos graxos insaturados                              |
| Ácido mirístico            | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>                  | 228.209    | 22,809   | 32,874     | 1,441       | Biossíntese de ácidos graxos  |
| Ácido oleico               | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>                  | 282.256    | 7,966    | 14,208     | 1,784       | Biossíntese de ácidos graxos e ácidos graxos insaturados              |
| Ácido palmítico            | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>                  | 256.240    | 80,354   | 130,504    | 1,624       | Biossíntese de ácidos graxos e ácidos graxos insaturados              |
| Ácido esteárico            | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>                  | 284.271    | 84,853   | 116,829    | 1,377       | Biossíntese de ácidos graxos e ácidos graxos insaturados              |
| Ácido araquídico           | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>                  | 312.303    | 1,415    | 2,613      | 1,846       | Biossíntese de ácidos graxos insaturados                              |
| Ergosterol                 | C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O                               | 396.339    | 46,395   | 93,033     | 2,005       | Biossíntese de esteroides   |
| Succinato                  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>                    | 118.027    | 14,670   | 27,854     | 1,899       | Ciclo do citrato, metabolismo do glioxilato dicarboxilato             |
| Leucina                    | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                  | 131.094    | 11,254   | 17,223     | 1,53        | Degradação de valina, leucina e isoleucina                            |
| Treo-3-hidroxi-L-aspartato | C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>5</sub>                   | 149.032    | 15,984   | 98,292     | 6,149       | Degradação do glioxilato e dicarboxilato                              |
| Trans-hidroxiprolina       | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>                   | 131.058    | 4,528    | 6,051      | 1,336       | Metabolismo de arginina e prolina                                     |
| Valina/norvalina           | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                  | 117.079    | 10,609   | 28,981     | 2,558       | Degradação de valina, leucina e isoleucina                            |
| Norleucina                 | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                  | 131.094    | 21,776   | 29,878     | 1,372       | Degradação de valina, leucina e isoleucina                            |
| Fosfoglicerato             | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> P                  | 185.993    | 3,891    | 8,047      | 2,068       | Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato, Glicólise / Gliconeogênese |
| Ácido fosfoglicérico       | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> P                  | 185.993    | 4,370    | 10,758     | 2,462       | Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato, Glicólise / Gliconeogênese |
| Inositol                   | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                   | 180.063    | 375,407  | 797,741    | 2,125       | Metabolismo de galactose  |
| Manitol                    | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>                   | 182.079    | 3,844    | 12,083     | 3,143       | Metabolismo de frutose e manose                                       |
| Malato                     | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                    | 134.021    | 5,723    | 9,105      | 1,591       | Ciclo do citrato, metabolismo do glioxilato e dicarboxilato           |
| Ácido p-hidroxifenilático  | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                   | 182.173    | 1,045    | 2,137      | 2,045       | Biossíntese de ubiquinona, Metabolismo da tirosina                    |
| Adenosina-5-monofosfato    | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P | 345.048    | 1,498    | 8,991      | 6,002       | Metabolismo de purina   |
| Uracila                    | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>     | 112.027    | 4,060    | 18,643     | 4,592       | Metabolismo de pirimidina, biossíntese de CoA                         |
| Lactato                    | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                    | 90.032     | 25,204   | 62,113     | 2,464       | Glicose e gliconeogênese  |
| Glicerol                   | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                    | 92.047     | 139,433  | 204,544    | 1,467       | Metabolismo dos glicerolípido   |

\*Os metabólitos identificados por GC-MS foram categorizados em vias bioquímicas relacionadas com base nas informações disponíveis em: KEGG, PubChem e HMDB.

## 6. DISCUSSÃO

A composição do glicocálice de *Leishmania* exerce forte influência nas interações entre o parasito e o hospedeiro e determina o perfil de resposta imunológica gerada pelo hospedeiro (SACKS e SHER, 2002), assim como, em muitos casos o perfil de virulência da cepa do parasito. Por isso, o entendimento de cada passo da glicosilação, nas diferentes vias associadas a este processo biológico, é fundamental para gerar ferramentas e estratégias que permitam a investigação dos mecanismos moleculares que modelam o perfil patogênico destes protozoários.

O emprego de uma abordagem quimio-genética é uma poderosa estratégia para estudar mecanismos moleculares compensatórios que emergem em determinados fenótipos produzidos pela exposição a compostos químicos inibidores de vias moleculares e bioquímicas. Por atuar na inibição do passo inicial da via de N-glicosilação, a tunicamicina é uma droga muito útil para estudar os mecanismos genético-moleculares acionados para superar as perturbações biológicas causadas pela deficiência na síntese de proteínas N-glicosiladas (DUKSIN and MAHONY, 1982). Ainda, como ressaltado por Beverley (1991), a seleção *in vitro* de linhagens de *Leishmania* resistentes a antibióticos é uma estratégia importante para permitir a investigação dos mecanismos envolvidos na aquisição da resistência às drogas. Nesse contexto, uma linhagem de *Leishmania* resistente à tunicamicina é um interessante modelo biológico que pode auxiliar tanto no entendimento de processos biológicos relacionados com os mecanismos de resistência, como também na compreensão das vias bioquímicas que controlam a N-glicosilação, controle de qualidade de proteínas e estresse do retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

Alterações no processo de glicosilação causam severos distúrbios na homeostase celular em vários tipos de células eucarióticas (FOUFELLE e FROMENTY, 2015). Por isso, o perfil de crescimento, a morfologia e a infectividade da linhagem TM40 comparada à cepa WT foram inicialmente investigadas. O perfil similar de crescimento observado na cepa WT e linhagem TM40 corrobora com dados de outro estudo realizado com *L. amazonensis*, no qual o crescimento de linhagem selvagem e resistente também não apresentaram diferenças (KINK e CHANG, 1987). No entanto, durante o cultivo de linhagens selvagens com tunicamicina, os parasitos exibiram redução da taxa de proliferação, sendo este mesmo padrão foi observado em *L. braziliensis* por Dagger e colaboradores (1986).

Esses dados sugerem que a tunicamicina atua em vias essenciais para a sobrevivência dos parasitos. No entanto após a emergência de fenótipos resistentes, por exposição gradual a quantidades sub-letais da droga, observamos a ocorrência de um fenômeno de adaptação metabólica, caracterizado pela retomada da taxa proliferativa em níveis similares à da cepa selvagem.

Apesar da similaridade na taxa de replicação dos parasitos, o estresse causado pela pressão de droga sobre a linhagem TM40, foi evidenciado pelas diferenças morfológicas observadas pela microscopia eletrônica de varredura, nas quais a linhagem resistente à tunicamicina apresentou menor tamanho e forma mais arredondada, comparada com a cepa WT.

Os efeitos da tunicamicina também foram observados em nível subcelular por microscopia eletrônica de transmissão. Promastigotas de *L. braziliensis* WT tratadas com tunicamicina apresentaram perfil compatível com o de estresse do retículo endoplasmático, conforme com o que já havia sido reportado em estudos com células de mamíferos e outros microrganismos (FOUFELLE e FROMENTY, 2015), incluindo *L. braziliensis* (DAGGER *et al*, 1984).

O correto *folding* das proteínas é diretamente dependente do padrão de glicosilação adequado e falhas neste padrão comprometem a estabilidade da conformação tridimensional correta das proteínas. Um mecanismo de controle de qualidade de proteínas no RE impede que proteínas mal-dobradas sigam para as etapas subsequentes que ocorrem no complexo de Golgi. Proteínas glicosiladas e mal-dobradas são retro-translocadas para o citosol onde são degradadas pelo proteassomo, por um mecanismo conhecido como ERAD (*endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation*) (USHIODA, HOSEKI e NAGATA, 2013). Nossos resultados sugerem que a cepa selvagem tratada com tunicamicina apresenta um perfil compatível ao de estresse de RE, causado pelo acúmulo de proteínas que não são glicosiladas adequadamente (DOLAI e ADAK, 2014), gerando alteração na morfologia reticular, assim como já observado em outros protozoários (DAGGER, 1984).

Por outro lado, na avaliação do perfil microscópico da linhagem resistente TM40, observou-se o retículo endoplasmático com aspecto normal. No entanto, o complexo de Golgi mostrou desorganização acentuada das suas cisternas. Após a transferência inicial de glicanos pela via da N-glicosilação, as proteínas passam por um processo de “dobramento”, ou *folding*, e são transportadas para o complexo de

Golgi para uma posterior maturação e distribuição a seus respectivos locais de atuação (STANLEY, 2011; DOLAI e ADAK, 2014). Assim, é possível especular que vias alternativas de glicosilação possam estar ativadas na linhagem resistente à tunicamicina, no retículo endoplasmático dos parasitos resistentes. Estas glicosilações permitem que as proteínas sigam adiante pela via exocítica e atinjam as cisternas *cis* do aparelho de Golgi. Porém, as glicosilações alternativas não são adequadas para os passos subsequentes de *trimming* e adição de novos glicano, ocasionando a retenção destas proteínas mal processadas nas cisternas do Golgi, resultando na desorganização desta organela (CHERPANOVA, SHRIMAL e GILMORE, 2016), como observado por microscopia eletrônica de transmissão nas imagens da linhagem resistente. Coletivamente, essas informações fortalecem a hipótese de que vias compensatórias estão ativadas, conferindo um padrão de glicosilação alternativo aos mutantes, capacitando os mesmos para realizarem a glicosilação de suas proteínas corretamente, permitindo o transporte do RE para o complexo Golgi.

Concomitantemente à aquisição de resistência à tunicamicina, observou-se o aumento da virulência da linhagem TM40, em comparação com a cepa selvagem. As avaliações morfológicas da linhagem TM40 e WT por citometria de fluxo não demonstraram diferenças de tamanho dos parasitos, durante os dias de análises. Em várias espécies de *Leishmania* há ocorrência perceptível de formas metacíclicas durante todos os estágios do cultivo, mas durante a fase estacionária ocorre um aumento na proporção dessas formas (LOUASSINI *et al.*, 1999). Considerando o resultado das análises por citometria das duas linhagens, acreditamos que o aumento de virulência observado na linhagem TM40 parece não estar associado à alterações na metaciclogênese.

A análise do genoma por eletroforese em campo pulsátil revelou que a linhagem resistente à tunicamicina apresenta material genético amplificado, tanto linear, como extracromossômico circular. Nosso conjunto de dados permite sugerir que o aumento da virulência observado na linhagem TM40 possa ocorrer por um mecanismo distinto do discutido por Kink e Chang (1987), em *L. amazonensis*, no qual o material genético amplificado foi de 63 kb e apenas o gene da N-acetilglicosamina fosfotransferase foi o relacionado a resistência e conseqüentemente à virulência. Os DNAs extracromossômicos circulares e lineares observados na TM40, em nosso estudo possuem um tamanho diferente, de

aproximadamente 20 kb. Provavelmente, o aumento da amplificação gênica está modificando o conteúdo das vesículas da via exocítica e, conseqüentemente, promovendo modificações do glicocálice do parasito, o que leva a alterações no padrão de interação parasito-hospedeiro. No entanto, mais estudos são necessários para a elucidação e validação desses processos.

Considerando que estas alterações morfológicas e moleculares observadas na linhagem resistente à tunicamicina poderiam afetar de maneira indireta a interação parasito-hospedeiro, procedemos com a análise metabolômica para tentar identificar assinaturas metabólicas associadas com a aquisição de resistência e aumento da virulência. Utilizamos a plataforma de cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas do tipo quadrupolo e uma abordagem metabolômica *untarget* que nos permite analisar uma ampla variedade de compostos orgânicos voláteis ou volatilizáveis de massa entre 10 e 700 Da (AGILENT, 2013).

Para facilitar o entendimento dos processos metabólicos alterados na linhagem resistente, construímos um esquema com os metabólitos encontrados pelo GC-MS, onde foram incluídos 23 dos 27 compostos identificados, juntamente com a sua abundância em cada espécie (figura 19). Quatro metabólitos (treo-3-hidroxi-L-aspartato, norleucina, ácido fosfoglicérico e ácido p-hidroxifenilático) foram excluídos desta análise, pois não foi possível integrá-los a nenhuma das vias propostas.

Considerando os 23 metabólitos, os dados indicaram que a linhagem resistente apresentou um aumento significativo da abundância de quase todos os metabólitos, com exceção da metionina que se encontra presente apenas na linhagem selvagem. Interessantemente, a metionina, que é um aminoácido essencial, foi somente encontrada nos parasitos selvagens, o que sugere que há uma alta demanda por este metabólito na linhagem resistente e a quantidade recuperada durante o procedimento de extração de metabólitos foi inferior ao limite de detecção da técnica.

O acetil-CoA é um metabólito central no metabolismo dos tripanossomatídeos, pois está presente em diversas vias catabólicas e anabólicas. *Leishmania spp* utiliza preferencialmente carboidratos simples como fonte de geração de energia e uma série de transportadores dessas moléculas são expressos constitutivamente para mediar a absorção dos açúcares por estes parasitos (SAUNDERS *et al.*, 2010). Após a internalização dos carboidratos ocorre sua



metabolização em organelas denominadas glicosossomos, que contém as enzimas constituintes da via glicolítica. Tal via tem como produto o piruvato, que é enviado para a mitocôndria para ser convertido em acetil-CoA (TIELENS e HELLEMOND, 2009).

Após a metionina sofrer oxidação para 2-cetobutirato há a conversão para succinil-CoA pelas enzimas mitocondriais (metilmalonil-Co-epimerase e metilmalonil-CoA mutase) (OPPERDOES e COOMBS, 2007). Succinil-CoA é transformado em succinato, levando ao incremento da síntese de acetil-CoA ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (TIELENS e HELLEMOND, 2009). O acetil-CoA pode ainda ser produto final da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (RIVIÈRE *et al.* 2009). Como alguns ácidos graxos foram encontrados de forma mais abundantes na linhagem resistente, acredita-se que esta seja outra via de alimentação para a produção de precursores da síntese de isoprenóide. No organismo resistente, observamos a mobilização de diversos metabólitos para a via glicolítica, degradação de ácidos graxos e aminoácidos, conseqüentemente levando ao aumento da produção de acetil-CoA.

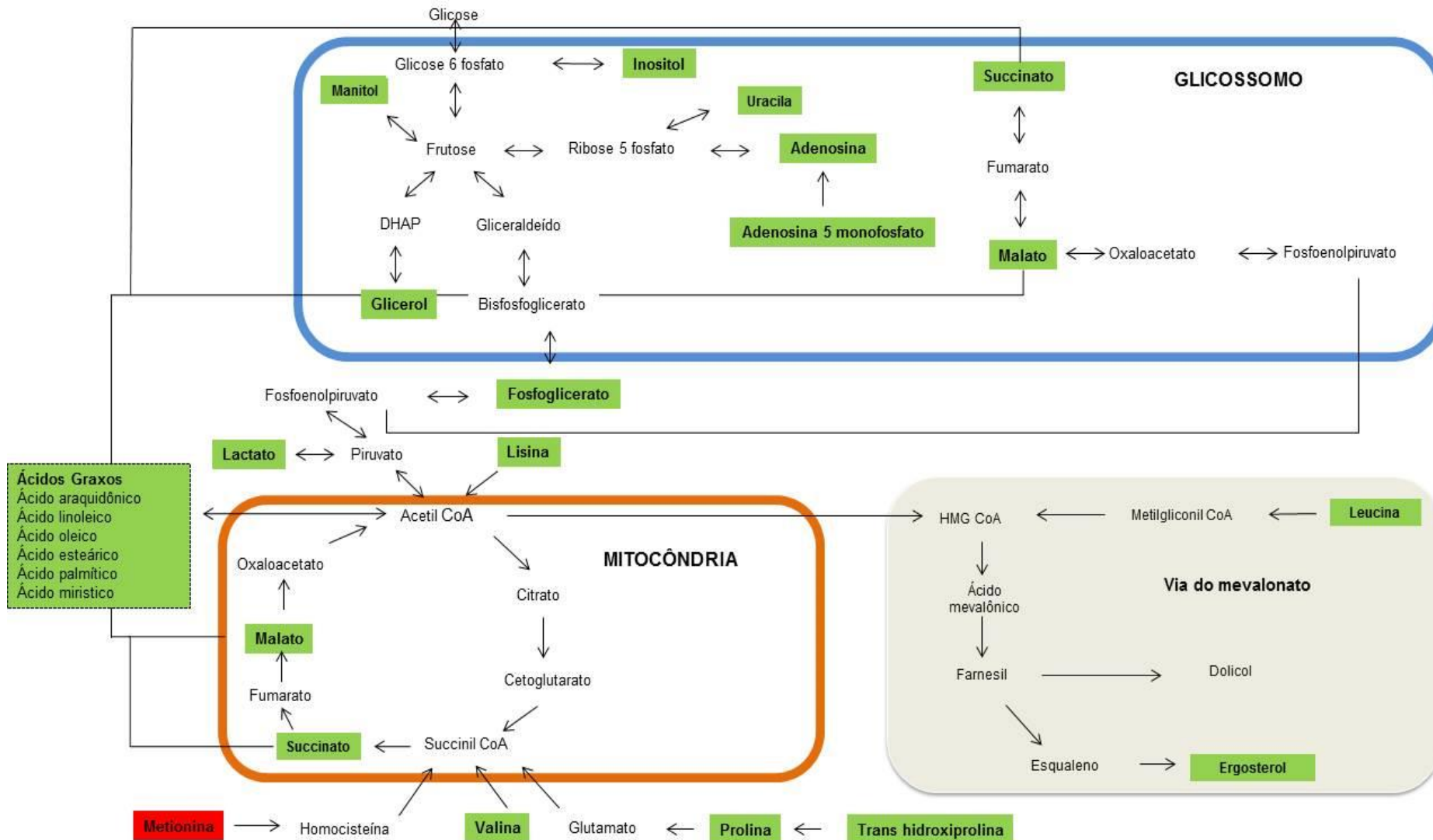
O acetil-CoA é um importante precursor da síntese de dolicol, uma molécula isoprenóide de cadeia longa, ligada à membrana do retículo endoplasmático e que serve de âncora para a iniciação da glicosilação proteica. O processo inicia-se com a montagem do bloco de glicanos no dolicol e posterior transferência *en bloc* para as proteínas (BREITLING e AEBI, 2013; BIEBERICH, 2014). Considerando nossa hipótese sobre a ativação de vias alternativas de glicosilação, que podem levar a um acúmulo de proteínas super-glicosiladas nos parasitos resistentes, é coerente que haja maior produção de dolicol, uma vez que este processo biológico depende desta molécula. A partir da análise metabolômica identificamos o aumento de diversos metabólitos que participam de vias envolvidas na biossíntese de acetil-CoA, sugerindo que este composto esteja sendo direcionado para a produção de isoprenóides (figura 19). O aumento da abundância de leucina também sugere ativação da biossíntese de isoprenóides, uma vez que a leucina é incorporada intacta a esta via biossintética (GINGER *et al.*, 2001).

A leucina e o acetil-CoA participam da via do mevalonato gerando HMG-CoA, que por sua vez é convertido em ácido mevalônico, que pode participar tanto da síntese de dolicol e/ou ergosterol (GINGER *et al.*, 2001; DINESH *et al.*, 2014). A leucina juntamente com outros aminoácidos também representa uma importante fonte de energia para os tripanossomatídeos, sendo considerado como a principal

fonte de carbono para a síntese de esteróis em *L. mexicana* (GINGER *et al.*, 1999). A abundância da leucina nos parasitos resistentes possivelmente está relacionada ao abastecimento da via de biossíntese de isoprenóides. Esta via tem como produtos o ergosterol, que apresentou abundância aumentada na linhagem resistente, e o dolicol.

A não identificação de alguns metabólitos como acetil-CoA, NADH e ATP pode ser explicada pela característica de serem moléculas grandes e termolábeis, que não são contempladas pela biblioteca de Fiehn, utilizada nas análises metabolômicas (AGILENT, 2013). Abordagens em estudos futuros, como outras plataformas metabolômicas, poderão levar à identificação de moléculas adicionais.

Contudo, os dados obtidos por meio da análise dos perfis morfológico e bioquímico apresentados pela linhagem TM40 fortalecem a hipótese de que vias compensatórias estão ativadas para reverter o quadro de bloqueio da glicosilação pela tunicamicina, gerando amplificações gênicas que provavelmente levam a alterações do glicocálice do parasito, resultando em modificações no padrão de interação parasito-hospedeiro.



**Figura 19.** Esquema simplificado de vias relacionadas com os metabólitos encontrados pelo GC-MS em cepa de *Leishmania braziliensis* WT e linhagem resistente TM40. No esquema 23 dos 27 compostos identificados estão representados, juntamente com a sua abundância em cada espécie. Os metabólitos com maior abundância na TM40 estão destacados em verde e os de menor abundância, em vermelho.

## 7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo permitem concluir que a linhagem de *L.braziliensis* resistente a tunicamicina gerada pelo método de *stepwise*, TM40, sofre alterações fenotípicas, bioquímicas e moleculares, relacionadas à amplificação gênica e ao bloqueio da N-glicosilação causada pela tunicamicina.

Coletivamente, os resultados demonstram o potencial da utilização desse modelo para entendimento do processo de resistência a drogas em *Leishmania*, contribuindo para uma melhor compreensão das alterações associadas à glicosilação de proteínas em *Leishmania* e como estas alterações impactam na interação parasito-hospedeiro.

**PERSPECTIVAS**

- Realizar o sequenciamento dos *amplicons* da linhagem TM40 por sequenciamento de nova geração (NGS);
- Avaliar o perfil proteico da linhagem TM40 comparativamente a cepa selvagem por análises proteômicas;
- Realizar ensaios de PCR em tempo real (RT-PCR) dos genes envolvidos com produção de moléculas isoprenóides;
- Identificar vias metabólicas envolvidas no processo de reversão do fenótipo de resistência, TM40rev, por GC-MS.

## RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. Agilent Fiehn Metabolomics Library. USA, 2013. 224p.
- AKPUNARLIEVA, S. *et al.* Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in Leishmania. *Journal of Proteomics*, v. 155, p. 85–98, 2017.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES-FERREIRA, E. V. C. *et al.* Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal Leishmania braziliensis Isolates from the Same Patient. *PLoS Negl Trop Dis* p. 1–19, 2015.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.
- BERN, C. *et al.* Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 5, p. 655–662, 2005.
- BEVERLEY, S. M. *et al.* Unstable DNA Amplifications in Methotrexate- Resistant Leishmania Consist of Extrachromosomal Circles which Relocalize during Stabilization. *Cell*. v. 38, n. September, p. 431–439, 1984.
- BEVERLEY, S. M. GENE AMPLIFICATION IN LEISHMANIA. 1991.
- BEVERLEY, S. M.; ELLENBERGER, T. E.; CORDINGLEY, J. S. Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 83, n. April, p. 2584–2588, 1986.
- BIEBERICH, E. Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins. *Adv Neurobiol*. p. 706–721, 2015.
- BREITLING, J.; AEBI, M. N-linked protein glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* p. 1–15, 2013.
- BURCHMORE, R. BARRETT, M. Life in vacuoles – nutrient acquisition by Leishmania amastigotes. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 12, p. 1311-1320, 2001.

CALLAHAN HL, BEVERLEY SM. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1991; 266:18427-18430.

CANUTO, G. A. B. et al. Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in *Leishmania*. *Anal Bioanal Chem*, v. 406, p. 3459–3476, 2014.

CARVALHO, L. P., PASSOS, S., SCHRIEFER, A., CARVALHO, E. M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol*, v. 3, p. 301-2012b.

CARVALHO, L.; PEARCE, E.; SCOTT, P. Functional Dichotomy of Dendritic Cells following Interaction with *Leishmania braziliensis*: Infected Cells Produce High Levels of TNF- $\alpha$ , whereas Bystander Dendritic Cells Are Activated to Promote T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 9, p. 6473-6480, 2008.

CHAPPUIS, F. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? . *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. S7-S16, 2007.

CHEREPANOVA, N.; SHRIMAL, S.; GILMORE, R. ScienceDirect N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 41, p. 57–65, 2016.

CORFIELD, A. Eukaryotic protein glycosylation : a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 147, n. 2, p. 119–147, 2017. CRUZ, A.K., et al., Current treatment and drug discovery against *Leishmania spp.* and *Plasmodium spp.*: a review. *Curr Drug Targets*, 2009. 10(3): p. 178-92.

DAGGER, F.; AYESTA, C.; HERNANDEZ, A. The effect of tunicamycin on *Leishmania braziliensis* cell growth, cell morphology and ultrastructure. *Biology of the Cell*, v. 50, n. 2, p. 173-189, 1984.

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

DE JESUS, J.; MESQUITA-RODRIGUES, C.; CUERVO, P. Proteomics Advances in the Study of *Leishmania* Parasites and Leishmaniasis. *Subcellular Biochemistry*, p.

323-349, 2013.

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

DINESH, N. *et al.* Microbial Pathogenesis Exploring *Leishmania donovani* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) as a potential drug target by biochemical, biophysical and inhibition studies. *Microbial Pathogenesis*, v. 66, p. 14–23, 2014.

DOLAI, S.; ADAK, S. Endoplasmic reticulum stress responses in *Leishmania*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, p. 1–8, 2014.

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

DUKSINSG, D.; MAHONEYLLL, W. C. Relationship of the Structure and Biological Activity. *The Journal of biological chemistry* v. 257, n. 6, p. 3105–3109, 1982.

EHRCHEN, J. *et al.* Keratinocytes Determine Th1 Immunity during Early Experimental Leishmaniasis. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 4, p. e1000871, 2010.

ELLENBERGER, T. E.; BEVERLEY, S. M. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 25, p. 15094–15103, 1989.

FERRIS, S. P.; KODALI, V. K.; KAUFMAN, R. J. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *The Company of Biologists*, p. 331–341, 2014.

FOUFELLE, F.; FROMENTY, B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacology research & perspectives*, v. 4, n. 1, p. e00211, 2016.

GARCIA, A.; BARBAS, C. Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)-Based Metabolomics. *Methods in Molecular Biology*, v. 708, p. 191–204, 2011.



GHOSH, A. et al. Metabolic reconfiguration of the central glucose metabolism: a crucial strategy of *Leishmania donovani* for its survival during oxidative stress. *The FASEB Journal*, v. 29, n. 5, p. 2081-2098, 2015.

GINGER, M. L. et al. The Biosynthetic Incorporation of the Intact Leucine Skeleton into Sterol by the Trypanosomatid *Leishmania mexicana* \* The amino acid leucine is efficiently used by the trypano-. *The Journal of biological chemistry* v. 276, n. 15, p. 11674–11682, 2001.

GINGER, M. L.; CHANCE, M. L.; GOAD, L. J. sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. v. 405, p. 397–405, 1999.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. *Journal of postgraduate medicine*, v. 49, n. 1, p. 50–4, 2003.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

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

HORTA, M. et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*, v. 2012, p. 1-11, 2012.

JENSEN, R. ENGLUND, P. Network News: The Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 473-491, 2012.

KAPLER, G.; et al. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Molecular and Cellular Biology*, v. 10, n. 3, p. 1084-1094, 1990.

KARP PD, PALEY S, ROMERO P. The Pathway Tools software. *Bioinformatics*.v18 Suppl 1:S225-32, 2002

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics*

*in Dermatology*, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KIND'T, R. *et al.* Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. v. 4, n. 11, 2010.

KINK, J. A.; CHANG, K. P. Tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana amazonensis*: expression of virulence associated with an increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase and amplification of its presumptive gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 5, p. 1253–1257, 1987.

LAFFITTE, M. N. *et al.* Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance [ version 1 ; referees : 5 approved ]. *F1000 Research* v. 5, p. 1–10, 2016.

LAINSON, R. & SHAW, J. J.. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 3, p. 421-4, 1987.

LEAVITT, R.; SCHLESINGER, S.; KORNFELD, S. Tunicamycin Inhibits Glycosylation and Multiplication of Sindbis and Vesicular Stomatitis Viruses. v. 21, n. 1, p. 375–385, 1977.

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease : lessons from mouse models of leishmaniasis. v. 7, n. April, p. 294–305, 2006.

LOUASSINI, M., Activity of key enzymes in glucose catabolism during the growth and metacyclogenesis of *Leishmania infantum*. *Parasitol Research*. v. 85, 1999.

LUKES, J. *et al.* Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure MINIREVIEW Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure. v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.

MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol*, v. 190, n. 1-2, p. 37-42, 2001.

MORENO, J. Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v. 23, n. 3, p. 86-88, 2007.

MOUGNEAU, E *et al.*, N. Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunological Reviews*, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. v. 366, 2005.

NOLAN, T.FARRELL, J. Inhibition of in vivo and in vitro infectivity of *Leishmania donovani* by tunicamycin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 16, n. 2, p. 127-135, 1985.

OLAFSON, R. W. *et al.* Structures of the N-Linked Oligosaccharides of Gp63 , the Major Surface Glycoprotein , from *Leishmania mexicana amazonensis* \*. v. 265, n. 21, p. 12240–12247, 1990.

OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Practical Progress and New Drugs for Changing Patterns of Leishmaniasis. *Parasitology Today*, v. 9, n. 9, p. 323–328, 1993.

OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. *TRENDS in Parasitology*, v. 23, n. 4, 2007.

OUELLETTE, M.; LÉGARÉ, D.; PAPADOPOULOU, B. Multidrug Resistance and ABC Transporters in Parasitic Protozoa Further Reading. v. 3, p. 201–206, 2001.

PAGET, T. *et al.* Metabolomics and Protozoan Parasites. v. 58, n. 2, p. 127–131, 2013.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 12, p. e1032–e1039, 2010.

PETERS, N. *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, 2008.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 21–25, 2007.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania* – Host-cell Interaction : v. 16, n. 7, 2000.

RIVIÈRE, L. *et al.*, 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31), 12694-12699.

ROGERS, M. E. *et al.* Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* v. 430, n. 6998, p. 463–467, 2010.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature immunology*, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002.

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

SAUNDERS, E. C. *et al.* Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. p. 1303–1313, 2010.

SCHELTEMA, R. A.; DECUYPERE, S.; KINDT, R. T. The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. p. 1291–1302, 2010.

SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Effect of glycosylation on protein folding : A close look at thermodynamic stabilization. 2008.

SILVA-ALMEIDA, M. *et al.* Proteinases as virulence factors in *Leishmania spp* . infection in mammals. p. 1–10, 2012.

SINHA, S.; *et al.* Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *International journal of dermatology*, v. 47, n. 12, p. 1263–70, 2008.

SPATH, G. *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*, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, 2003.

STANLEY, P. Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 3, p. 1–13, 2011.

STARK, G. R.; WAHL, G. M. Gene amplification. *Biochemistry*, v. 53, p. 447–491, 1984.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 6, 2013.

TAKATSUKI, A.; *et al.* Tunicamycin, a new antibiotic. *Journal of antibiotics*, v. XXIV, n. 4, 1970.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. v. 9, n. 10, p. 8–11, 2013.

TIELENS, A. G. M.; HELLEMOND, J. J. VAN. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends in Parasitology*, v. 25, 2009.

TURCO, S.; SPÄTH, G.; BEVERLEY, S. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 5, p. 223-226, 2001.

UENO, N.; WILSON, M. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

USHIODA, R.; HOSEKI, J.; NAGATA, K. Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. *Molecular Biology of the Cell*, v. 24, 2013.

VINCENT, I. M. *et al.* International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 1, p. 20–27, 2014.

VINCENT, I. M.; BARRETT, M. P. Metabolomic-Based Strategies for Anti-Parasite Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 20, p. 44–55, 2015.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, v. 92, p. 92–107, 2013.

XU, C.; NG, D. T. W. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nature Publishing Group*, n. October, 2015.

XUAN, L.; CHANG, K. P. The 63-Kilobase Circular Amplicon of Tunicamycin-

Resistant *Leishmania amazonensis* Contains a Functional. v. 12, n. 9, p. 4112–4122, 1992.

YANG, X. *et al.* Proteome-wide analysis of N-glycosylation stoichiometry using SWATH technology. *Journal of proteome research*. 2017.