

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE ISOLADOS DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* SENSÍVEIS E RESISTENTES À
MILTEFOSINA**

VITÓRIA
2011

JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE ISOLADOS DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* SENSÍVEIS E RESISTENTES À
MILTEFOSINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elenice Moreira Lemos.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Suely Gomes de Figueiredo.

Colaboradora: Prof^a. Dra. Héliida Monteiro de Andrade.

VITÓRIA

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T833a Trindade, Juliana Brambilla Carnielli, 1983-
Análise proteômica de isolados de *Leishmania (Leishmania)*
chagasi sensíveis e resistentes à miltefosina / Juliana Brambilla
Carnielli Trindade. – 2011.
110 f. : il.

Orientadora: Elenice Moreira Lemos.
Co-Orientadora: Suely Gomes de Figueiredo.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania (L.) chagasi*. 3.
Resistência à drogas. 4. Miltefosina. 5. Proteoma. I. Lemos,
Elenice Moreira. II. Figueiredo, Suely Gomes de. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE apresentou dissertação intitulada: “ANÁLISE PROTEÔMICA DE ISOLADOS DE *Leishmania (Leishmania) chagasi* SENSÍVEIS E RESISTENTES À MILTEFOSINA” em sessão pública, no dia 05 de abril de 2011, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a farmacêutica JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 05 de abril de 2011

Prof. Dra. Patrícia Cuervo Escobar
(Membro Externo)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Membro Interno)

Prof. Dra. Elenice Moreira Lemos
(Orientadora)

Prof. Dra. Suely Gomes de Figueiredo
(Co-Orientadora)

Aos meus pais e irmãos que deram alicerce para mais esta fase do meu aprendizado. Obrigada pelo apoio incondicional, força, carinho, companheirismo e incentivos dispensados durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas e por sua benção. Obrigada pelo Conhecimento e por todas suas maravilhosas formas de manifestação.

Às Professoras Elenice e Suely, minhas orientadoras, pela competência científica e acompanhamento do trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, paciência, incentivo, entusiasmo, confiança, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Muito obrigada pela amizade e pela agradável convivência.

À Prof. Helida da UFMG por abrir as portas de seu laboratório para a concretização deste trabalho. Obrigada por partilhar seus conhecimentos, pela disponibilidade, dedicação e por sua alegria.

À Simone Pires do Lab Leish-BH por me ajudar em muitas análises proteômicas. Obrigada por seu apoio, amizade, dedicação, paciência em me ensinar e pelos muitos momentos de descontração.

Às amigas Rê e Laura do Lab Leish-Vix por me ensinar, com muita paciência, a cultivar as gracinhas das *Leish*. Obrigada por todo apoio, amizade e sem dúvida nenhuma, pelos muitos momentos engraçados.

Ao Léo do LQP por ajudar a montar o **PROTEOMES**. Muito obrigada por todo apoio, sugestões e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Patrícia Cuervo Escobar e Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, pela disponibilidade e competência na avaliação deste trabalho.

Ao Filipe do LQP por participar da minha formação profissional desde a iniciação científica. Muito obrigada pelos ensinamentos, amizade e pela agradável convivência.

Ao Prof. Fausto por sua generosidade em ensinar e pelas valiosas sugestões, esclarecimentos e correções.

Aos amigos do Lab Leish-Dengue, Mari, Jauber, Camila, Marco, Nayana, Lígia Rodrigo, Priscila e Gilson. Obrigada pela amizade, ajuda, troca de idéias e cada momento de convivência.

Aos amigos do LQP, Gigi, Pedro, Olavo, Fernandinha, Helena, Thiago, Vinícius, Lucas, Renan, Rafael e Prof. Edna. Obrigada pela amizade, ajuda e alegrias compartilhadas.

Aos amigos do Lab Leish-BH, Júnior, Ali, Talita, Angélica, André, Felipe, Paula, João, Elaine e Jordanna. Obrigada pela ajuda e pelos momentos de alegrias em BH.

À minha prima Maria Beatriz Martinez Carnielli por corrigir todo o texto. Muito obrigada pela disponibilidade em ajudar, motivação e pelo apoio.

À Fabíola pela correção do abstract. Muito obrigada pela ajuda.

Às amigas do CEFETES, Maressa, Thaís, Désirée e Beth. Muito obrigada por participarem da minha formação científica e pelos muito momentos de alegria.

Aos amigos da turma de mestrado: Diego, Rafa, Cris, Adriele, Manu, Elisa, Adriana, Thiago, Steven e Elizonete. Obrigada pela amizade e alegria compartilhadas durante o mestrado. Espero que nossa amizade perdure e que possamos trilhar outras experiências profissionais juntos.

Ao Dr. Reynaldo Dietze, coordenador do NDI. Obrigada pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Marta Nascimento Cordeiro e à Dra Márcia Helena Borges, pesquisadoras da FUNED, por permitir minha participação no curso de eletroforese bidimensional.

Ao Lu e à Tê por me receberem de forma tão gentil e acolhedora em BH.

Aos professores da Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, pela confiança em nosso trabalho e estímulos para aprender e ir adiante.

A todos os funcionários do NDI, em especial a Láu, Carlinha, Valéria, Janete, Rose, Leduk, Andriago e Maria Emília, pela atenção e disponibilidade sempre que necessário.

À Solange Vinhas, pelas valiosas sugestões e pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, em especial à Fátima e à Wayna, por todo auxílio durante o mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFES, Nino, Elias, Maria Helena, Soninha e Evaldo, pelos auxílios para a realização desse trabalho.

À CAPES, CNPq e NDI pelo apoio financeiro.

A minha família, pelo incentivo e amor inigualáveis. Obrigada pela dedicação ao meu crescimento pessoal e profissional.

Àquelas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização e concretização desta pesquisa.

Tudo isso foi essencial para o término deste trabalho. Muito obrigada!

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity.”

Albert Einstein

RESUMO

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica, fatal se não tratada, causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* complexo *donovani*, o qual abriga a espécie *L. (L.) chagasi*. O tratamento da LV conta com poucas opções terapêuticas, incluindo os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e a miltefosina. A miltefosina foi recentemente aprovada na Índia como a primeira droga de administração oral para o tratamento da LV. Os mecanismos de resistência à miltefosina estão sendo elucidados em linhagens experimentais de *Leishmania* spp. resistentes a esta droga. Entretanto, os mecanismos de resistência à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania* são pouco conhecidos. Neste estudo foi utilizada a técnica de eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas com o objetivo de destacar e identificar proteínas que são diferencialmente expressas entre formas promastigotas de isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis (S: S1 e S2) e resistentes (R: R1 e R2) à miltefosina, obtidos de pacientes com LV que participaram de um estudo clínico realizado no Brasil para avaliar a eficácia dessa droga. Os perfis protéicos obtidos dos isolados clínicos apresentaram em média 459 “spots”, correspondendo a 5,7% dos produtos gênicos preditos para *Leishmania* spp. A análise comparativa entre os perfis protéicos dos isolados clínicos S e R permitiu a detecção de 80 “spots” diferencialmente expressos. Desses, 18 “spots” foram encontrados exclusivamente no perfil do grupo S e apenas 1 no grupo R, enquanto 48 “spots” apresentaram diferença quantitativa na expressão protéica entre os grupos. Os demais “spots” foram encontrados em um único isolado (7 em S1, 3 em S2 e 2 em R1) ou em três isolados simultaneamente (1 em S1, S2 e R1). A análise desses “spots” por espectrometria de massas em sistema MALDI/TOF-TOF identificou 49 “spots” (61,3%), os quais correspondem a 32 proteínas distintas e 7 proteínas hipotéticas. Entre as proteínas identificadas, a peroxirredoxina (expressão aumentada em R) e uma cisteíno peptidase semelhante à calpaína (exclusiva do grupo S) foram destacadas por indicar que os isolados resistentes são menos susceptíveis ao processo de morte celular programada. Estes dados sugerem que estas proteínas podem estar relacionadas com o fenótipo resistência à miltefosina.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) chagasi* – miltefosina – resistência – proteoma.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a systemic disease that is fatal if untreated and is caused by the *Leishmania donovani* complex, which include the *Leishmania (L.) chagasi*. Visceral leishmaniasis treatment relies on a few chemotherapeutic drugs including Sb(V), amphotericin B and miltefosine. Miltefosine was recently approved as the first oral drug active against visceral leishmaniasis in India. Miltefosine resistance mechanisms are being elucidated in laboratory *Leishmania* spp. isolates but are less clear in clinical isolates. In this study, we used comparative two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry methodologies to highlight and identify proteins that are differentially expressed between miltefosine-sensitive (S: S1 and S2) and –resistant (R: R1 and R2) *L. (L.) chagasi* isolates from kala-azar patients included in clinical trial in Brazil, in order to assess the effectiveness of this drug. We describe here a high-resolution proteome for *L. (L.) chagasi* promastigotes comprising an average of 459 spots, which corresponds to 5,7% of gene products predicted for *Leishmania* spp. Following comparison of the whole proteome profiles between sensitive and resistant *L. (L.) chagasi* clinical field strains, 80 differentially expressed spots were detected. Eighteen spots were found to be specific of a sensitive group and only one of a resistant group, while 48 spots changed in intensity between these groups. The others spots were present in a unique isolates (7 in S1, 3 in S2 and 2 in R1) or in three isolates simultaneously (1 in S1, S2 e R1). MALDI/TOF-TOF mass spectrometry allowed the identification of 49 spots (61,3%) corresponding to 32 distinct protein and 7 hypothetical proteins. Among the proteins identified, the comparative proteomics screen highlighted two proteins, peroxidoxin (overexpressed in R group) and calpain-like cisteína peptidase (exclusively detected in S), differentially expressed, suggesting that programmed cell death is reduced in resistant parasite. These data suggest that these proteins may be related to resistance phenotype to miltefosine.

Keywords: *Leishmania (L.) chagasi* – miltefosine – resistance – proteome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2009.** Adaptado de WHO (2009).22
- Figura 2 – Ciclo evolutivo das espécies de *Leishmania* spp.** As formas promastigotas metacíclicas inoculadas na derme, por fêmeas de flebotomíneos, são internalizadas por células fagocíticas residentes, e dentro do fagolisossomo se transformam em amastigotas. As formas amastigotas multiplicam-se, rompem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas. As formas amastigotas disseminam-se por meio dos sistemas linfático e vascular e, ocasionalmente infiltram a medula óssea, fígado e baço. Adaptado de Handman (2001).24
- Figura 3 –Estrutura química das drogas atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose visceral.** Adaptado de Wikipedia (2010) e Croft e Coombs (2003). ...25
- Figura 4 - Ligação e internalização da miltefosina em parasitas *Leishmania* spp.** A miltefosina é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório da droga. (a) ligação da droga do lado extracelular da membrana plasmática; (b) a fração de droga ligada à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade “flip-flop”. Adaptado de Perez-Victória e outros (2006b).32
- Figura 5 - Do genoma ao proteoma: um aumento na complexidade e na dinâmica.** A diversidade de produtos gênicos oriundos de um único gene é devida principalmente aos “splicing” alternativos dos transcritos e às modificações co- e pós-traducionais das proteínas. É predito no genoma humano cerca de 30.000 ORFs, cada um dos quais, origina em média 6 diferentes espécies de mRNA. Estes são traduzidos a proteínas que são processadas em diferentes vias, gerando cerca de 8 a 10 diferentes formas modificadas de proteínas. Portanto, o genoma humano pode potencialmente produzir cerca de $(30.000 \times 6 \times 10)$ 1.8 milhões de diferentes espécies protéicas. Adaptado de Jensen (2004).41
- Figura 6 - Diagrama esquemático da separação de proteínas por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas.** Mistura de proteínas

resolvida em tira com gradiente de pH imobilizado (IPG – immobilized pH gradient) de acordo com o pI de cada proteína e independente do seu tamanho. Após a focalização isoeletrica, as proteínas são separadas pela sua massa molecular (MM) no sistema SDS-PAGE. Os “spots” protéicos de interesse são identificados por análise de espectrometria de massa “in tandem”. A análise dos fragmentos tripticos resulta no espectro de massas MS, do qual são selecionados íons parentais (pico em vermelho) para serem fragmentados em sua cadeia peptídica, gerando o espectro MS/MS. Por meio da diferença entre as massas dos fragmentos do íon parental (seta de duas direções), a seqüência de aminoácidos do peptídeo pode ser determinada. Adaptado de BIO-RAD (2010) e PHILLIPS e BOGYO (2005).43

Figura 7 - Hierarquia dos grupos para sobreposição das imagens. Esquerda: identificação dos grupos. Centro: isolados dos pacientes. Grupo de amostras de *L. (L.) chagasi* sensíveis (S) ou resistentes (R) à miltefosina. Para cada fenótipo, dois isolados foram avaliados, resultando em 4 diferentes grupos de isolados (S1, S2, R1 e R2). Para cada isolado, três géis (de cultivos independentes) foram obtidos, perfazendo um total de 12 imagens. Direita: três géis de cultivos independentes do isolado da cepa padrão *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). O símbolo ✓ representa a realização de “match” entre as imagens com a imagem de referência (figura com detalhe em vermelho) dentro do respectivo nível.55

Figura 8 - Susceptibilidade dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* à miltefosina. A atividade da miltefosina foi mensurada após a incubação das formas intracelulares amastigotas (a) e das formas promastigotas (b) com diferentes concentrações de miltefosina. Cada ponto representa a média de três ensaios independentes e as barras indicam o desvio padrão.61

Figura 9 - Determinação da faixa de pH para separação do extrato protéico solúvel de *L. (L.) chagasi*. Géis obtidos após separação de 500 µg de proteínas solúveis de *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75 por: (a) IEF em IPG-strip 17 cm pH 3-10; ou (b) IEF em IPG-strip 17 cm pH 4-7. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com Coomassie G-250.62

Figura 10 - Determinação da quantidade de proteína solúvel de *L. (L.) chagasi* para análise em gel 2D. Extrato protéico solúvel de *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75 separado por IEF em “IPG strip” pH 4-7. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com Coomassie G-250. (a) 500 µg de proteínas. (b) 800 µg de proteína.....63

Figura 11 - Reprodutibilidade do sistema de eletroforese bidimensional. (a) Perfil 2D dos extratos (800µg) obtidos de três crescimentos independentes de *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75. A focalização isoeétrica foi realizada em “IPG strip” pH 4-7 de 17 cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12%. O triângulo vermelho identifica a imagem selecionada como referência. Os valores posicionados à esquerda dos géis representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão. (b) “Scatter plot” representando, por meio da dependência linear, a relação entre os valores (% volume) dos “spots” de um gel (eixo X) com os valores (% volume) correspondentes no gel de referência (eixo Y). Corr = coeficiente de correlação. Count = número de “match” entre as imagens analisadas.64

Figura 12 - Perfil protéico dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina. Alíquotas de 800 µg de proteínas solúveis foram focalizadas em “IPG strip” pH 4-7 de 17 cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12%. O triângulo vermelho identifica a imagem selecionada como referência. Os valores posicionados à esquerda dos géis representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão.....66

Figura 13 - Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos “spots” diferencialmente expressos entre os isolados analisados.67

Figura 14 - Análise de correlação entre os valores experimentais e teóricos de massa molecular e ponto isoeétrico das proteínas identificadas dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi*. (a) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de MM (Spearman $r = 0,86$, $p < 0,0001$). (b) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de pI (Spearman $r = 0,68$, $p < 0,0001$).....74

Figura 15 - Comparação entre os perfis proteômicos dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina. (a) Géis representativos do grupo de isolados sensíveis e resistentes, destacando as regiões com os “spots” possivelmente relacionados com o mecanismo de resistência à miltefosina. (b) “Zoom” das regiões destacadas na parte “a” da figura, mostrando a diferença na expressão proteica entre os isolados dos grupos sensíveis e resistentes.78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resposta clínica e sensibilidade *in vitro* dos isolados de *L. (L.) chagasi* à miltefosina.60**
- Tabela 2 - Análise de reprodutibilidade dentro dos grupos dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* analisados. As imagens foram relacionadas com a respectiva imagem de referência de cada grupo.....67**
- Tabela 3 - Identificação dos “spots” protéicos, com diferença quantitativa de expressão ($p < 0,05$) entre os isolados de *L. (L.) chagasi* resistentes e sensíveis à miltefosina, por MS e MS/MS.....69**
- Tabela 4 - Identificação dos “spots” protéicos, presentes exclusivamente nos isolados de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina, por MS e MS/MS.73**
- Tabela 5 – Classificação funcional das proteínas identificadas por MS. As categorias funcionais foram definidas de acordo com as anotações dos processos biológicos dos bancos de dados do Gene Ontology e KEGG Orthology.....75**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

14-3-3 protein – tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein.

2DE – Eletroforese Bidimensional.

2DE-MS – Eletroforese Bidimensional acoplada a Espectrometria de Massas.

ABC – ATP Binding Cassette.

ACTH – Hormônio adenocorticotrófico.

AmB – Anfotericina B.

BAD – Bcl2 Antagonist of Cell Death.

Bcl2 – B-Cell CLL/Lymphoma 2.

Bcl-XI – Bcl2 Related Gene.

CE₅₀ – Concentração da droga que produz 50% do efeito máximo.

DE₅₀ – Quantidade de droga que gera a resposta terapêutica em 50% da população analisada.

DIGE – Differential Gel Electrophoresis (Gel de Eletroforese Diferencial).

GM-CSF – Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor.

GO – Gene Ontology.

IEF – Isoelectric Focusing (Focalização Isoelétrica).

IFN- γ – Interferon γ .

IPG – Immobilized pH Gradient (Gradiente de pH imobilizado).

KO – Kegg Orthology.

KSR-1 – Kinase Suppressor of RAS1.

LbMT – *Leishmania brasiliensis* Miltefosine Transporter (Transportador de Miltefosina em *Leishmania brasiliensis*).

LbRos3 – *Leishmania brasiliensis* β subunit for LbMT (β subunidade de LbMT em *Leishmania brasiliensis*).

LdMT – *Leishmania donovani* Miltefosine Transporter (Transportador de Miltefosina em *Leishmania donovani*).

LdRos3 – *Leishmania donovani* β subunit for LdMT (β subunidade de LdMT em *Leishmania donovani*).

LIB – Liver Infusion Broth.

LIT – Liver Infusion Tryptose.

LV – Leishmaniose Visceral.

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (Ionização/Desorção a Laser assistida por Matrix).

m/z – Relação massa/carga.

NCBI nr – National Center for Biotechnology Information non-redundant (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundantes).

NNN – Meio de cultura sólido Novy, MacNeal e Nicolle.

ORF – Open Reading Frame (Fase de Leitura Aberta).

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase).

PMF – Peptide/Protein Mass Fingerprinting (Impressão digital das Massas de Peptídeo/Proteína).

Raf-1 – V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1.

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos).

RPMI – Roswell Park Memorial Institute médium (meio de cultura Roswell Park Memorial Institute).

Sb(III) – Antimonial trivalente.

Sb(V) – Antimonial pentavalente.

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis
(Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio).

SHP-1 – Tyrosine Phosphatase SHP1 (Tirosina Fosfatase SHP1).

TOF – Time of Flight (Tempo de Vôo).

$\Delta\Psi_m$ – Potencial da membrana mitocondrial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL	22
1.2. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	25
1.2.1. ANTIMONIAIS PENTAVALENTES.....	26
1.2.2. ANFOTERICINA B.....	27
1.2.3. MILTEFOSINA.....	28
1.2.3.1. Mecanismo de Ação Anti- <i>Leishmania</i> da Miltefosina.....	30
1.2.3.2. Variação de Susceptibilidade à Miltefosina entre as Formas Evolutivas e Diferentes Espécies de <i>Leishmania</i> spp.....	35
1.2.3.3. Mecanismos de Resistência à Miltefosina.....	37
1.3. ANÁLISE PROTEÔMICA.....	40
2. OBJETIVOS.....	46
2.1. OBJETIVO GERAL	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. METODOLOGIA	48
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	48
3.2. REAGENTES	48
3.3. ISOLADOS DE <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	49
3.4. CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) chagasi</i>	49
3.5. CARACTERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA.....	50
3.5.1. SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> À MILTEFOSINA.....	50
3.5.2. SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> À MILTEFOSINA.....	51

3.6. OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO.....	53
3.7. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE)	53
3.7.1. PRIMEIRA DIMENSÃO – FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA	53
3.7.2. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DAS PROTEÍNAS	54
3.7.3. SEGUNDA DIMENSÃO – SDS-PAGE.....	54
3.8. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS IMAGENS	54
3.9. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	56
3.9.1. DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS, EXTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	56
3.9.2. PESQUISA EM BANCO DE DADOS.....	58
4. RESULTADOS.....	60
4.1. CARACTERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>L. (L.) chagasi</i>	60
4.2. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL PARA ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i>	61
4.3. ANÁLISE COMPARATIVA DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> SENSÍVEIS E RESISTENTES À MILTEFOSINA	65
4.4. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	68
5. DISCUSSÃO	80
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	91
7. PERSPECTIVAS.....	93
8. REFERÊNCIAS.....	95

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL

Leishmaniose visceral (LV), uma doença sistêmica também conhecida como “Kala-azar” (pele negra) ou “Kala-jwar” (febre negra), é causada por parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* complexo *donovani* (LAISON e SHAW, 1987), que engloba as espécies: *Leishmania (L.) donovani* (LAVERAN e MESNIL, 1903), agente causador de uma antroponose no sul do continente Asiático (Índia, Bangladesh e Nepal) e no leste africano; *Leishmania (L.) infantum* (NICOLLE e COMTE, 1908), encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e parte do continente Asiático; e *Leishmania (L.) chagasi* (CUNHA e CHAGAS, 1937), agente etiológico de uma zoonose nas Américas (BERN, MAGUIRE e ALVAR, 2008).

A leishmaniose visceral é endêmica em 65 países (Figura 1), com uma estimativa de 500.000 novos casos por ano. Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão apresentam o maior índice, que em conjunto perfazem 90% dos casos (WHO, 2006). Nas Américas, a LV humana ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que 90% dos casos registrados ocorrem no Brasil (BRASIL, 2007).

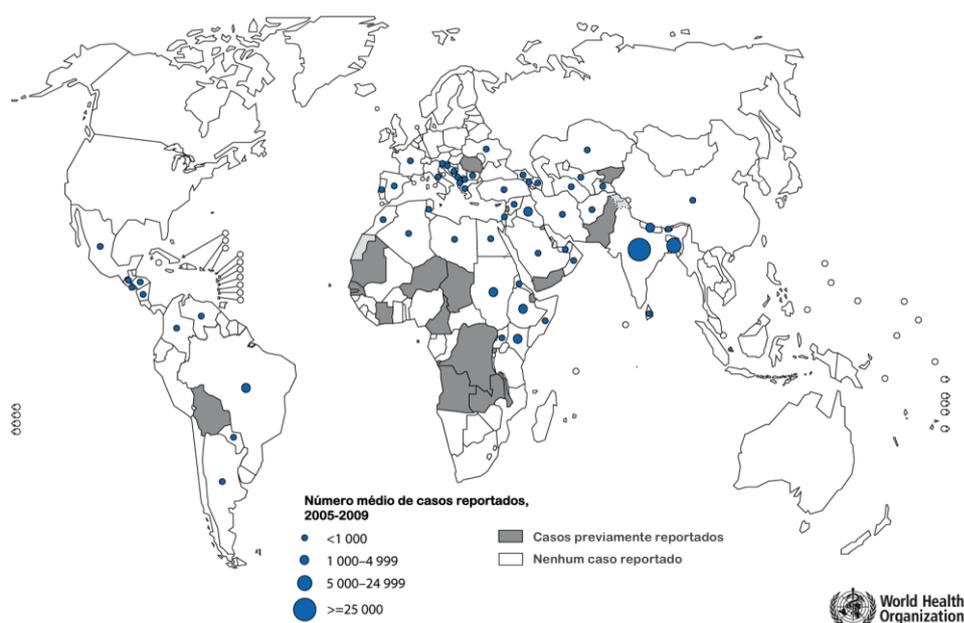


Figura 1 – Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2009. Adaptado de WHO (2009).

O ciclo evolutivo do parasita compreende duas formas principais distintas: promastigota, forma flagelada presente no tubo digestivo do vetor; e amastigota, forma imóvel, que se desenvolve no interior de células do sistema fagocitário mononuclear dos hospedeiros mamíferos (Figura 2). As formas infectantes (promastigotas metacíclicas) inoculadas na pele do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo de fêmeas do flebotomíneo infectadas, são internalizadas por células dendríticas e macrófagos residentes. Dentro do vacúolo parasitóforo dessas células, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, que sobrevivem e multiplicam-se no fagolisossomo por meio de uma complexa relação parasito-hospedeiro. Após intensa multiplicação das amastigotas ocorre o rompimento das células infectadas e subsequente liberação dessas formas que vão infectar outras células fagocíticas. As células fagocíticas da pele, provavelmente células de Langerhans, são responsáveis pela disseminação dos parasitas por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos para os linfonodos, baço, fígado e medula óssea. A infecção do vetor ocorre por ingestão de macrófagos contendo formas amastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo anterior do inseto ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação destas formas, que se diferenciam em promastigotas em aproximadamente 13 a 15 horas. As formas promastigotas multiplicam-se por divisão binária e transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em formas infectantes - promastigotas metacíclicas (RITTIG e BOGDAN, 2000; BESTEIRO *et al.*, 2007; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Após o período de incubação, que ocorre geralmente entre 2 a 6 meses, os pacientes que não evoluíram para a cura clínica, apresentam sinais e sintomas de infecção sistêmica persistente (incluindo febre, calafrios, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso) e invasão parasitária do sangue e do sistema fagocitário mononuclear (linfonodos, baço e fígado). A fadiga e fraqueza podem ser agravados pela anemia, a qual é causada por um estado inflamatório persistente, aumento da destruição periférica dos eritrócitos devido à esplenomegalia e, ocasionalmente, por sangramento. Com o avanço da doença, distensão abdominal e dor podem ser observadas em decorrência da intensificação da esplenomegalia e concomitante

hepatomegalia. A LV, se não tratada evolui para óbito na quase totalidade dos casos (>95%) (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

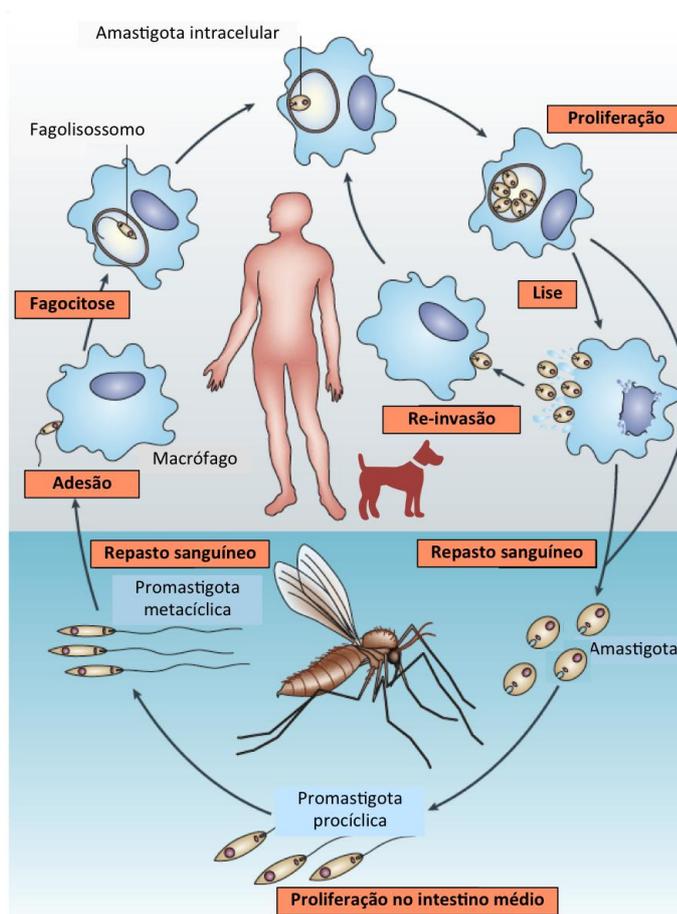


Figura 2 – Ciclo evolutivo das espécies de *Leishmania* spp. As formas promastigotas metacíclicas inoculadas na derme, por fêmeas de flebotomíneos, são internalizadas por células fagocíticas residentes, e dentro do fagolisossomo se transformam em amastigotas. As formas amastigotas multiplicam-se, rompem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas. As formas amastigotas disseminam-se por meio dos sistemas linfático e vascular e, ocasionalmente infiltram a medula óssea, fígado e baço. Adaptado de Handman (2001).

A infecção primária, quando curada, leva à proteção contra infecções futuras na maioria dos casos, sugerindo a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose. Entretanto, até o momento não foi produzida uma vacina efetiva contra essa parasitose, sendo a quimioterapia a principal forma de controle da leishmaniose visceral (OUELLETTE, DRUMMELSMITH e PAPADOPOULOU, 2004).

1.2. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Com o desenvolvimento de novas drogas e o aperfeiçoamento de suas formulações já em uso, a terapia contra leishmaniose visceral vem se mostrando mais promissora nas últimas décadas. Contudo, as drogas atualmente disponíveis apresentam limitações quanto ao número de opções terapêuticas, eficácia, via de administração (parenteral, exceto para miltefosina), toxicidade, tempo prolongado de tratamento e necessidade de hospitalização e monitoramento. As drogas preconizadas para a terapia da LV incluem os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina, cujas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 3.

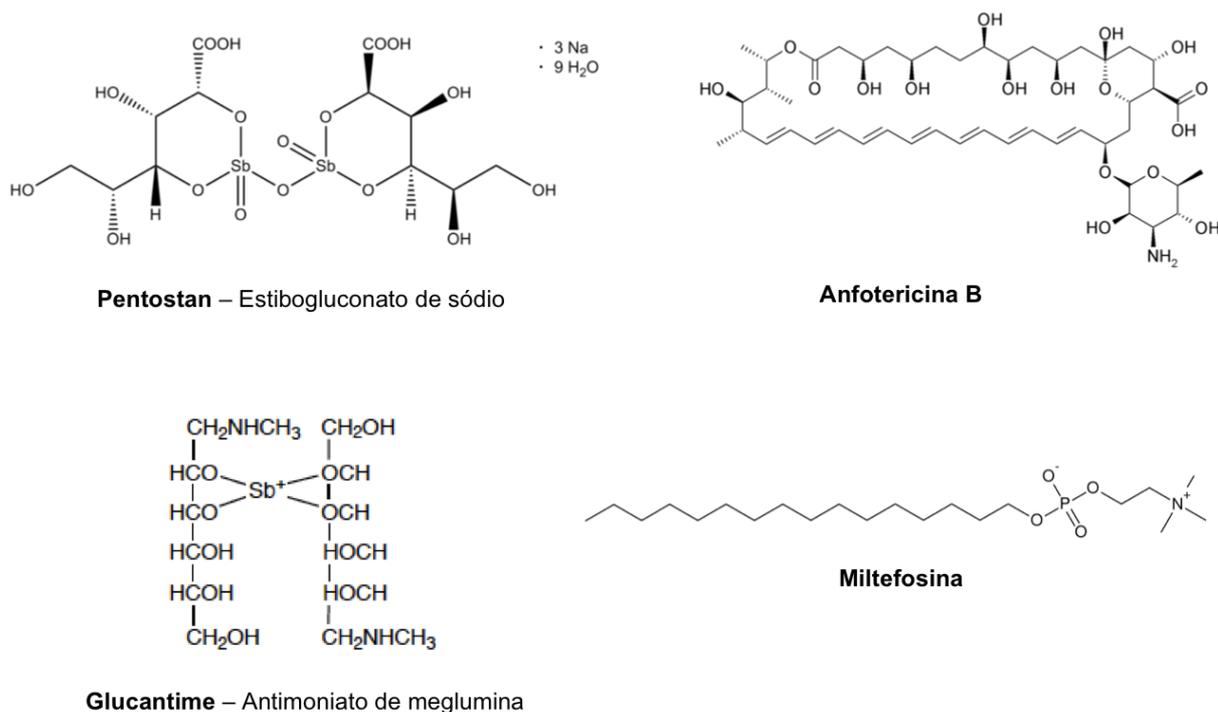


Figura 3 –Estrutura química das drogas atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose visceral. Adaptado de Wikipedia (2010) e Croft e Coombs (2003).

1.2.1. ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

Os antimoniais pentavalentes (Sb(V)) (estibogluconato de sódio – Pentostam; e antimoniato de meglumina – Glucantime) foram introduzidos na terapia da leishmaniose visceral no ano de 1945 e ainda permanecem como droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses em diversas parte do mundo. Apesar de décadas de uso o mecanismo de ação dos antimoniais não foi completamente elucidado. Os Sb(V) são caracterizados como pró-drogas, pois é aceito que para desencadear sua atividade anti-*Leishmania* eles devem ser convertidos a antimonial trivalente (Sb(III)) (CARTER *et al.*, 2006; SINGH, 2006; KOTHARI *et al.*, 2007). Evidências recentes de estudos *in vitro* indicam que essas drogas atuam por: indução de apoptose em *Leishmania* spp. (LEE *et al.*, 2002; SINGH, 2006); e inibição da tripanotiona redutase, resultando no acúmulo de espécies reativas do oxigênio devido à perda intracelular de tióis (SINGH, 2006; WYLLIE, VICKERS e FAIRLAMB, 2008).

Recentemente, os antimoniais têm se tornado obsoletos em certas áreas da Índia e arredores, onde a resistência à droga aumentou drasticamente nos últimos anos, como demonstrado pela redução significativa de sua eficácia (a dose e/ou duração do tratamento aumentou 10 vezes em relação ao tratamento usual) e pelo aumento na porcentagem de falha terapêutica (>60%) (SUNDAR, 2001). Apesar do uso dos Sb(V) ter sido abandonado na Índia, essas drogas ainda permanecem como tratamento de primeira escolha na maioria das outras áreas endêmicas para LV, onde a taxa de cura excede a 90% e poucos casos de recidiva são reportados (MINODIER *et al.*, 1998; MALTEZOU *et al.*, 2000; RAGUENAUD *et al.*, 2007; GRADONI *et al.*, 2008). Entretanto, a terapia com Sb(V) apresenta desvantagens devido à ação teratogênica e cardiotoxicidade, as quais limitam seu uso em grávidas e pacientes cardíacos (THAKUR e NARAYAN, 2004; PAGLIANO *et al.*, 2005), e aos efeitos adversos ocasionais (náusea, vômito, artralgia, disritmia cardíaca, hepatites, aumento dos níveis das transaminases hepáticas, pancreatites e pneumonites) (MINODIER *et al.*, 1998; MALTEZOU *et al.*, 2000; SUNDAR *et al.*, 2000; RAGUENAUD *et al.*, 2007; MOORE e LOCKWOOD, 2010).

1.2.2. ANFOTERICINA B

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico poliênico que vem sendo utilizado desde a década de 60 como tratamento de segunda escolha para leishmanioses, e em áreas com alto índice de resistência aos antimoniais já é usada como droga de primeira escolha. Esse composto apresenta atividade seletiva contra *Leishmania* spp. devido à sua maior afinidade pelo ergosterol (esteróide predominante nas células de *Leishmania* spp.) que pelo colesterol (esteróide predominante nas células de mamíferos) (GOAD, HOLZ e BEACH, 1984; CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006). A anfotericina B apresenta alta efetividade como droga anti-*Leishmania*, mesmo no tratamento dos casos de resistência aos antimonias (THAKUR *et al.*, 1999). Contudo, a sua formulação convencional (desoxicolato) apresenta desvantagens, como administração parenteral lenta e elevada toxicidade associada com graves efeitos adversos (febre e calafrios durante a infusão, nefrotoxicidade, hipocalcemia e queda do nível de hemoglobina), que limitam sua utilização (SUNDAR *et al.*, 2004; SUNDAR *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de formulações lipídicas da AmB (Ambisome, lipossomal; Abelcet, complexo lipídico; e Amphocil, dispersão de colesterol) tem superado as desvantagens da sua formulação convencional, tornando as reações adversas negligenciáveis com melhoria da qualidade terapêutica dessa droga. Estas formulações apresentam seletividade pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando a atividade anti-*Leishmania* localizada e a efetividade com doses menores (ADLER-MOORE e PROFFITT, 2002; 2003; CROFT e COOMBS, 2003; MALTEZOU, 2010). A formulação lipossomal tem mostrado taxa de cura superior a 95% em pacientes da Índia com LV (SUNDAR *et al.*, 2004) e seu esquema terapêutico vem sendo otimizado quanto ao tempo de tratamento (3 a 5 dias) com o objetivo de reduzir custos com cuidados hospitalares, necessários durante o período de tratamento (THAKUR *et al.*, 1996; SUNDAR *et al.*, 2002b; GRADONI *et al.*, 2008). Entretanto, o elevado custo dessa formulação, mesmo utilizando os esquemas terapêuticos mais curtos, limita sua utilização.

Embora alguns casos de recidivas tenham sido observados após o tratamento com AmB, especialmente em pacientes HIV positivos, a ocorrência de resistência em

isolados clínicos ainda não é considerada um problema (DURAND *et al.*, 1998; DI GIORGIO *et al.*, 1999; LACHAUD *et al.*, 2009). Contudo, com a disseminação do uso dessa droga, especialmente das formulações lipídicas, que apresentam elevada meia-vida plasmática, a possibilidade de ocorrência de resistência não pode ser ignorada.

1.2.3. MILTEFOSINA

O avanço mais significativo na terapia da leishmaniose visceral nos últimos anos foi a descoberta de uma droga oral efetiva, a miltefosina (hexadecilfosfocolina), um análogo de fosfolípido. A miltefosina é a primeira droga de administração oral registrada para o tratamento da leishmaniose visceral e mais recentemente para tratamento da leishmaniose cutânea (CROFT e ENGEL, 2006).

O desenvolvimento de derivados de fosfolípidios como droga baseou-se essencialmente em relatos prévios de sua atividade antineoplásica. A miltefosina foi sintetizada no Instituto Max-Planck (Alemanha) pelo pesquisador Hansjoerg Eibl (EIBL e UNGER, 1990), e usada com sucesso no tratamento de metástases cutâneas de câncer de mama, sendo a primeira droga antineoplásica de aplicação tópica (Miltex) registrada (BURK *et al.*, 1994).

De forma independente, Bill Pendergast e Joseph Chan em 1982 na fundação Burroughs Wellcome nos EUA sintetizaram a miltefosina. Em 1984, esta droga, juntamente com outros alquil-fosfocolinas e um alquil-fosfoetanolamina, foram selecionadas para um “screening” contra parasitas *Leishmania* e Tripanossomas, realizado em Beckenham, Reino Unido (CROFT e ENGEL, 2006). Dentre as substâncias avaliadas, sete (incluindo a miltefosina) apresentaram atividade contra formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) donovani* (CROFT *et al.*, 1987). A miltefosina apesar de não ter apresentado atividade muito elevada (5,0 µg/mL), no modelo *in vitro* de macrófagos de camundongos, foi bem tolerada pelas células hospedeiras e, portanto, selecionada (junto com outras 3 drogas) para a avaliação *in vivo* em camundongos BALB/c. Nessa etapa, foi determinada a DE₅₀ (quantidade de

droga que gera a resposta terapêutica em 50% da população analisada) de 12,8 mg/kg/dia para a miltefosina administrada por via subcutânea durante 5 dias.

Subseqüentemente, Unger e Kuhlencord, conhecendo os resultados de Croft e colaboradores (1987) e a biodisponibilidade oral da miltefosina (de estudos de fase II em pacientes com câncer) realizaram testes para verificar a eficácia oral da miltefosina em modelos *in vivo* (BALB/c) contra *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*. Os resultados desse estudo demonstraram que a miltefosina apresentou excelente atividade anti-*Leishmania*, alcançando níveis superiores a 95% de supressão da carga parasitária de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no fígado, baço e medula óssea após administração oral de 20 mg/kg/dia durante 5 dias. Ainda nesse estudo foi verificada uma maior atividade anti-*Leishmania* da miltefosina quando comparada ao estibogluconato de sódio (tratamento padrão) (KUHLENCORD *et al.*, 1992). Esses resultados foram a base para a decisão do início do programa de desenvolvimento da miltefosina, para o tratamento da leishmaniose visceral, pela ASTA Medica (atual Zentaris) (CROFT e ENGEL, 2006).

O primeiro ensaio clínico de fase I/II da miltefosina, o qual envolveu 30 pacientes com LV, foi iniciado por H. Murray, S. Sundar e ASTA Medica na Índia em 1997. Este estudo estabeleceu que doses diárias de 100-150 mg da droga durante 28 dias foram bem toleradas e conduziram à elevada taxa de cura (SUNDAR *et al.*, 1998). Em seguida, outros estudos de fase II foram realizados, confirmando os resultados do estudo piloto descrito acima e acrescentando informações favoráveis à eficácia da miltefosina nos casos refratários aos antimoniais pentavalentes (JHA *et al.*, 1999; SUNDAR *et al.*, 1999). Esses resultados levaram a um estudo multicêntrico de fase III, em colaboração com a indústria farmacêutica, a Organização Mundial da Saúde (WHO/TDR – World Health Organization/Tropical Diseases Research) e o governo indiano, cujos dados (94% de cura) estabeleceram de forma inquestionável a eficácia anti-*Leishmania* da miltefosina (ENGEL, 2002; GANGULY, 2002; SUNDAR *et al.*, 2002a). Em março de 2002 a miltefosina (Impavido™) foi aprovada como a primeira droga de administração oral para o tratamento de leishmaniose visceral na Índia (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006) e, atualmente é também licenciada na Alemanha e Colômbia para o tratamento da leishmaniose visceral e cutânea, respectivamente (MALTEZOU, 2010).

Resultados satisfatórios da eficácia da miltefosina também têm sido relatados em pacientes portadores de LV co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (THAKUR *et al.*, 2000). Contudo, um estudo mais recente observou elevada taxa de recidiva entre esses pacientes após o tratamento com miltefosina (SINDERMANN *et al.*, 2004).

Os eventos adversos observados nos estudos clínicos da miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral em geral são brandos e toleráveis, sendo representados principalmente por desconforto gastrointestinal transitório como vômito e diarreia, e aumento dos níveis das transaminases hepáticas e da creatinina (SUNDAR *et al.*, 2002a; BHATTACHARYA *et al.*, 2007). As principais preocupações para o uso disseminado da miltefosina incluem o seu potencial teratogênico e sua elevada meia vida (150-200 h), a qual pode facilitar a emergência de parasitas resistentes, devido a permanência de níveis sub-terapêuticos da droga na corrente sanguínea por algumas semanas após o tratamento (BERMAN, 2005).

Além da vantagem da via oral de administração, um estudo utilizando modelos animais (camundongos) mostrou que a miltefosina possui distribuição favorável no sistema fagocítico mononuclear, principal alvo do parasita causador da leishmaniose visceral (BREISER *et al.*, 1987), o que acarreta efeitos satisfatórios de supressão ou morte dos parasitas no baço e na medula óssea (KUHLENCORD *et al.*, 1992). Dessa forma, pode-se considerar que a implementação da miltefosina na clínica, é um marco para o tratamento da leishmaniose.

1.2.3.1. Mecanismo de Ação Anti-*Leishmania* da Miltefosina

O mecanismo de ação anti-*Leishmania* da miltefosina a nível molecular é pouco conhecido até o momento e, parte do conhecimento deste mecanismo, foi obtido de estudos utilizando linhagens experimentais resistentes a essa droga. A elucidação dos mecanismos de resistência tem claramente mostrado que o acúmulo intracelular da droga é um pré-requisito para a ação da miltefosina (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006b), o qual ocorre em três diferentes etapas (Figura 4):

- i. *Ligação da droga no lado extracelular da membrana plasmática.* Sob condições normais de cultura, a miltefosina se liga à albumina, a qual atua como reservatório para a droga. Devido ao seu caráter anfifílico a miltefosina é capaz de se solubilizar em água e de se ligar à monocamadas lipídicas (RAKOTOMANGA, SAINT-PIERRE-CHAZALET e LOISEAU, 2005), o que estabelece um equilíbrio entre a fração ligada à albumina e a fração ligada à membrana plasmática. Esse equilíbrio é deslocado pela concentração da droga, quantidade de albumina e pelo número de células (membrana plasmática) (PEREZ-VICTORIA, CASTANYS e GAMARRO, 2003a).
- ii. *Internalização da droga.* Apesar de as moléculas fosfolipídicas se difundirem rapidamente na monocamada lipídica, o movimento “flip-flop” na bicamada lipídica é geralmente muito lento (POMORSKI *et al.*, 2003). Dois possíveis mecanismos de internalização da miltefosina têm sido descritos: (a) endocitose dos monômeros de miltefosina integrados na membrana plasmática como membros da vesícula endocítica. Os parasitas *Leishmania* apresentam elevada atividade endocítica, a qual é restrita a uma região especializada da bolsa flagelar (MCCONVILLE *et al.*, 2002). Entretanto, essa via de internalização é importante apenas em circunstâncias em que a quantidade de droga ligada à membrana é extremamente alta. (b) translocação dos monômeros de miltefosina por atividade de proteínas flipase específicas. Esse é o mecanismo de internalização da miltefosina mais importante e depende de duas proteínas (transportador LdMT e sua subunidade beta LdRos3) que, provavelmente, formam um complexo de translocação na membrana plasmática (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2003a; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006a).
- iii. *Alvo intracelular, metabolismo e eliminação da miltefosina.* Os monômeros de miltefosina na face citosólica da membrana podem se desprender desta e estabelecer um equilíbrio com as membranas das organelas citoplasmáticas devido à sua solubilidade em água. Contudo, ainda não é conhecida a distribuição intracelular da miltefosina, assim como o seu acúmulo em organelas (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006b). Enquanto a capacidade de internalizar a miltefosina é muito elevada, o metabolismo da droga dentro das células de *Leishmania* é muito lento ou até mesmo negligenciável (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2003a), o que resulta em elevada concentração intracelular.

Por fim, mecanismos de eliminação da droga, como exocitose ou atividade floparse por translocadores protéicos (membros da família de transportadores ABC), podem reduzir a concentração de droga dentro da célula do parasita (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2001; RYBCZYNSKA *et al.*, 2001).

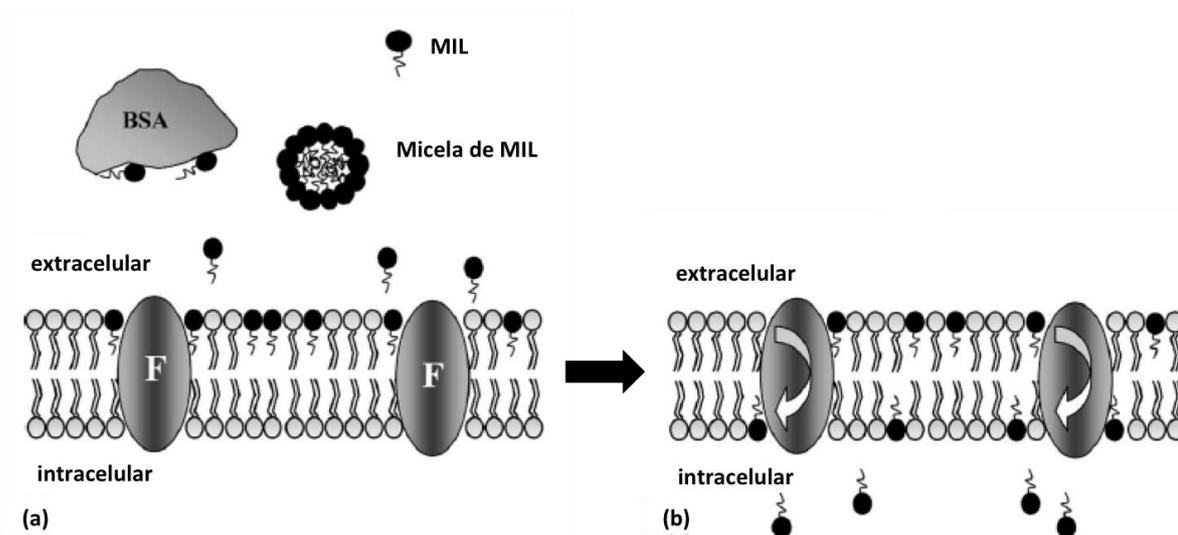


Figura 4 - Ligação e internalização da miltefosina em parasitas *Leishmania* spp. A miltefosina é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório da droga. (a) ligação da droga do lado extracelular da membrana plasmática; (b) a fração de droga ligada à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade “flip-flop”. Adaptado de Perez-Victória e outros (2006b).

Estudos experimentais vêm demonstrando que o mecanismo de ação da miltefosina pode interferir com lipídios do parasita em diferentes níveis:

- i. Causando danos à membrana flagelar, com extensiva formação de protuberâncias (SANTA-RITA *et al.*, 2000).
- ii. Interferindo no metabolismo de alquil-lipídio e de glicosilfosfatidilinositol (LUX *et al.*, 1996) e no remodelamento de éter-lipídios, por meio de inibição (dose-dependente) da atividade da enzima alquil-liso-fosfatidilcolina aciltransferase específica (LUX *et al.*, 2000). Contudo a concentração de miltefosina necessária para esta inibição é muito maior que a concentração capaz de matar os parasitas, o que sugere um outro alvo primário da droga (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006b).

iii. Inibindo a síntese *de novo* de fosfatidilcolina (LIRA *et al.*, 2001). Fosfatidilcolina é o principal lipídio da membrana de *Leishmania* spp., representando 33% do total de lipídios e 50% dos fosfolipídios nesse parasita (WASSEF, FIORETTI e DWYER, 1985). Tem sido postulado que a colina possui função essencial no desenvolvimento dos parasitas *Leishmania*, implicando que estes possuam uma maquinaria para síntese *de novo* de fosfocolina a partir da colina e requer um transportador para incorporação de colina do hospedeiro, que é inibido pela miltefosina (CHAUDHURI, CHATTERJEE e BANERJEE, 1982; ZUFFEREY e MAMOUN, 2002).

A miltefosina também pode exercer sua atividade anti-*Leishmania* por modulação do processo de morte celular semelhante a apoptose, visto que fenômenos relacionados a esse processo (encarquilhamento celular, condensação do DNA nuclear, fragmentação do DNA e exposição de fosfatidilserina) têm sido reportados após o tratamento de tripanossomídeos com miltefosina (PARIS *et al.*, 2004; VERMA e DEY, 2004). Contudo, os estudos de van der Sanden e outros (2004) mostraram que a indução desse tipo de morte celular por essa droga não possui como via primária a inibição da síntese de fosfatidilcolina. Mais recentemente Azzouz e colaboradores (2005) sugeriram que a miltefosina também pode exercer sua ação leishmanicida por meio da inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, sendo esta última a mais afetada.

Outro possível alvo intracelular dos fosfolipídios em tripanossomídeos é a mitocôndria. Estudos experimentais demonstraram uma redução substancial do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após o tratamento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi* por miltefosina e edelfosina, respectivamente (SANTA-RITA *et al.*, 2004; SANTA-RITA *et al.*, 2005; SANTA-RITA, BARBOSA e DE CASTRO, 2006). Associado a isto, Vergnes e colaboradores (2007) observaram variação nos níveis de expressão de HSP83 e SKCRP14.1, proteínas envolvidas no processo de manutenção do $\Delta\Psi_m$, em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* o que foi relacionada com o fenótipo de resistência à miltefosina. Luque-Ortega e Rivas (2007) também verificaram uma redução do nível intracelular de ATP e do consumo de oxigênio, em *L. (L.) donovani* após incubação com miltefosina, a qual foi relacionada com a inibição da fosforilação oxidativa

(inibição específica do citocromo c oxidase), principal fonte de síntese de ATP em *Leishmania* spp. (VAN HELLEMOND e TIELENS, 1997).

A miltefosina também pode desempenhar uma forma indireta de ação anti-*Leishmania*, por meio de seu efeito imunomodulador, o qual tem sido relacionado com sua atividade co-estimulatória *in vitro* sobre células T e macrófagos (VEHMEYER *et al.*, 1991; EUE, ZEISIG e ARNDT, 1995; SAFA *et al.*, 1997), assim como com o aumento da síntese de IFN- γ e GM-CSF por células mononucleares periféricas humanas (HOCHHUTH *et al.*, 1992). Em sua formulação lipossomal, a miltefosina foi capaz de induzir a síntese de óxido nítrico em linhagem U937 de histiócitos humanos ou em macrófagos peritoneais (EUE *et al.*, 1995; ZEISIG *et al.*, 1995). Adicionalmente, o tratamento oral com altas doses de miltefosina (45 mg/kg/dose por 5 dias) levou a um aumento significativo no recrutamento de células endoteliais, macrófagos, células T helper, células T citotóxicas e de células B no baço de camundongos sem timo (SAFA *et al.*, 1997). Recentemente, foi observado que macrófagos infectados com *L. (L.) donovani* e posteriormente tratados com miltefosina, aumentam a responsividade ao IFN- γ , por meio do aumento do número de receptores para IFN- γ , e reverterem a resposta imunológica do tipo Th2 para Th1 por meio da indução de IL-12 (WADHONE *et al.*, 2009).

Contudo, estudos da atividade da miltefosina contra *L. (L.) donovani* em camundongos imunodeficientes em células T e B e em macrófagos ativados, têm mostrado que esses tipos de respostas imunes não são necessárias para a atividade da miltefosina sobre *L. (L.) donovani* (MURRAY e DELPH-ETIENNE, 2000; ESCOBAR, YARDLEY e CROFT, 2001). Dessa forma, a miltefosina pode ser uma droga potencialmente útil no tratamento de leishmanioses em pacientes com imunodeficiência, como, por exemplo, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

1.2.3.2. Variação de Susceptibilidade à Miltefosina entre as Formas Evolutivas e Diferentes Espécies de *Leishmania* spp.

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a miltefosina apresenta atividade anti-parasitária contra as formas amastigotas e promastigotas de várias espécies de *Leishmania* (CROFT *et al.*, 1987; KUHLENCORD *et al.*, 1992; CROFT, SNOWDON e YARDLEY, 1996; LE FICHOUX *et al.*, 1998; UNGER, 1998; ESCOBAR *et al.*, 2001; ESCOBAR *et al.*, 2002), apresentando, entretanto, variação na sua eficácia dependendo da forma evolutiva e da espécie do parasita.

Escobar e colaboradores (2002) avaliaram a sensibilidade *in vitro* à miltefosina de seis diferentes espécies de *Leishmania* (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) major*), e observaram que a espécie *L. (L.) donovani* apresentou maior susceptibilidade, tanto na forma amastigota quanto na promastigota (CE₅₀ de 4,6-3,3 µM e 0,4-0,5 µM, respectivamente), enquanto a espécie *L. (L.) major* apresentou menor susceptibilidade (CE₅₀ de 31,6-37,2 µM para a forma amastigota e de 4,8-13,1 µM para a forma promastigota). Esses mesmos autores também observaram que, independente da espécie de *Leishmania*, formas promastigotas apresentaram maior susceptibilidade à miltefosina que as suas respectivas formas amastigotas.

Entretanto, Azzous e colaboradores (2005) verificaram que as formas promastigotas foram menos susceptíveis (CE₅₀ de 26,73-33,31 µM) que as formas amastigotas (CE₅₀ de 16,46-23,16 µM) de *L. (L.) donovani*, sugerindo que os alquil-fosfolipídios aumentam a citotoxicidade dos macrófagos e conseqüentemente ajudam a eliminar os parasitas dentro das células infectadas, uma vez que já foi demonstrado que lisofosfolipídios estimulam a explosão respiratória em macrófagos peritoneais (BRACHWITZ e VOLLGRAF, 1995).

Diferenças de susceptibilidade também foram observadas em um ensaio clínico controlado realizado na Colômbia e Guatemala, onde os pacientes receberam 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias para o tratamento de leishmaniose cutânea (SOTO *et al.*, 2004). Na Colômbia, onde a espécie *L. (V.) panamensis* é predominante, foi observado taxas de cura de 91% para o grupo tratado com miltefosina, enquanto na

Guatemala, onde as espécies predominantes são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, taxa de cura de apenas 53% foi alcançada.

Utilizando o modelo experimental de infecção de macrófagos, Yardley e colaboradores (2005) também observaram uma variação significativa na sensibilidade à miltefosina em isolados clínicos de diferentes espécies de *Leishmania* do Peru e Nepal. Todos os isolados de *L. donovani* oriundos de pacientes Nepaleses, respondedores ou não-respondedores ao antimoniato pentavalente, apresentaram sensibilidade intrínseca à miltefosina com CE_{50} variando de 0,1 a 14 μ M. Já os isolados de pacientes com leishmaniose cutânea do Peru, pertencentes ao complexo *L. (Viannia) braziliensis*, apresentaram-se resistentes à miltefosina até 73 μ M, com exceção da espécie *L. (V.) lainsoni*, a qual apresentou CE_{50} comparável (4,6-8,3 μ M) aos valores encontrados para *L. (L.) donovani*.

Outro estudo realizado recentemente na Bolívia revelou que a eficácia da miltefosina também sofre influência da área geográfica, uma vez que uma taxa de cura superior (88%) àquela encontrada na Guatemala (53%) foi observada após o tratamento com miltefosina em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* (SOTO *et al.*, 2008). Dessa forma, a miltefosina tem se mostrado mais efetiva para isolados de *L. (V.) braziliensis* dessa região do que para *L. (V.) braziliensis* encontrada na Guatemala (SOTO *et al.*, 2004).

Da mesma forma, um ensaio clínico desenvolvido por nosso grupo de pesquisa para avaliar a eficácia da miltefosina em pacientes portadores de LV no Brasil, observou uma alta taxa de recidiva após o tratamento com 2,5 mg de miltefosina/kg/dia durante 28 (Montes Claros – MG) ou 42 dias (Piauí) (dados não publicados). Diferente dos resultados encontrados nos ensaios clínicos desenvolvidos na Índia, em que apenas 6% de falha terapêutica foi reportado (SUNDAR *et al.*, 2002a), cerca de 50% dos pacientes avaliados no Brasil apresentaram recidiva após o tratamento com miltefosina, o que levou à interrupção do estudo. Uma das hipóteses investigada foi se a *L. (L.) chagasi*, espécie causadora da doença no Brasil, era menos susceptível à miltefosina que a *L. donovani* espécie causadora da LV na Índia. Contudo, os resultados de um estudo comparativo entre essas espécies encontraram valores de CE_{50} semelhantes. Outra hipótese investigada foi a

ocorrência de sensibilidade variada à miltefosina entre isolados de *L. (L.) chagasi*, justificando a alta taxa de recidiva dos pacientes portadores de LV tratados no Brasil. Os resultados obtidos de ensaios de infecção *in vitro* de macrófagos murinos demonstraram que, na maioria dos casos, os isolados clínicos de pacientes que apresentaram recidiva eram resistentes à miltefosina, enquanto todos os isolados de pacientes que evoluíram para a cura eram sensíveis à miltefosina. Esses dados corroboram, portanto, a hipótese de que a recidiva da LV em pacientes tratados com miltefosina no Brasil pode ser devida à resistência primária desses isolados à droga (comunicação pessoal, MONTI-ROCHA, R. e colaboradores).

1.2.3.3. Mecanismos de Resistência à Miltefosina

Na tentativa de avaliar os mecanismos de resistência de *Leishmania* spp. à miltefosina, vários estudos têm sido realizados utilizando principalmente parasitas resistentes à droga obtidos experimentalmente.

A indução facilitada de linhagens resistentes à miltefosina em laboratório revela a magnitude biológica do parasita em evadir essa droga. A caracterização dessas linhagens resistentes indica que a redução no acúmulo intracelular da miltefosina no parasita está relacionada com os fenótipos de resistência observados (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2001; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2003b; SEIFERT *et al.*, 2003).

O primeiro estudo do mecanismo de resistência à miltefosina foi realizado utilizando uma linhagem experimental de *L. (L.) tropica* multi droga resistente (MDR), a qual apresentava elevada atividade de efluxo da droga. A caracterização desses parasitas revelou que a redução intracelular dos análogos de fosfolipídios (miltefosina e edelfosina) estava associada com a expressão aumentada da glicoproteína-P MDR1, um membro da super-família dos transportadores ABC (ATP Binding Cassette), que externalizam substâncias hidrofóbicas da célula (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2001).

Apesar do envolvimento das proteínas ABC na translocação de fosfolipídios, incluindo fosfatidilcolina, estar bem estabelecido em células de mamíferos (BOSCH

et al., 1997; BORST, ZELCER e VAN HELVOORT, 2000), os estudos realizados em parasitas *Leishmania* se limitam aos transportadores MDR1, ABCA1 e ABCA2.

Entretanto, os estudos de Perez-Victória e colaboradores (2003a) demonstraram que, em uma linhagem experimental de *L. (L.) donovani* resistente à miltefosina, a redução no acúmulo intracelular da droga é principalmente devida a alterações na habilidade do parasita em internalizá-la, uma vez que, a taxa de efluxo e de endocitose da droga foram similares entre as linhagens selvagens e resistentes. Essa linhagem resistente também apresentou menor acúmulo de um análogo de glicerofosfolípido, sugerindo que a internalização de miltefosina e a translocação de lipídios podem compartilhar o mesmo transportador. Foi também demonstrado que o metabolismo da miltefosina pelo parasita *Leishmania* pode ser considerado negligenciável, o que descarta alterações nessa via como mecanismo de evasão à droga.

Posteriormente, esses mesmos autores (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2003b) identificaram e clonaram um transportador de miltefosina, LdMT (*L. donovani* Miltefosine Transporter), com um open reading frame (ORF) de 1097 aminoácidos, que apresenta homologia com ATPase II humana. Esse transportador pertence a sub-família das translocases de aminofosfolípidios e está localizado na membrana plasmática e na bolsa flagelar. LdMT é responsável pela translocação de miltefosina e de glicerofosfolípidios em parasitas *Leishmania*, modulando, portanto, a internalização e a potência de drogas análogas de fosfolípidios. Esses pesquisadores verificaram que as bases moleculares para o fenótipo de resistência consistiu na aquisição de distintas mutações pontuais em cada um dos alelos LdMT presente na linhagem resistente, levando, portanto, à perda de função do transportador. Nesse contexto, esses autores sugerem que qualquer mutação capaz de inativar o transportador LdMT resultará em perda de sensibilidade à miltefosina e, portanto, o gene completo deve ser analisado para o monitoramento de resistência à droga. Investigações complementares realizadas por Seifert e colaboradores (2007) revelaram que o fenótipo de resistência induzido, por mutação pontual ou por “knockout” do gene LdMT, em formas promastigotas de *L. (L.) donovani*, permaneceu após a transformação para o estágio amastigota intracelular.

Contudo, foi observado que apenas LdMT não é suficiente para exercer a atividade de translocação de fosfolipídios e da miltefosina pela membrana plasmática. A atividade de LdMT é dependente de uma β sub-unidade específica denominada LdRos3 (pertencente a família das proteínas CDC50/Lem3 – uma β sub-unidade de P₄-ATPases) (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006a). LdMT e LdRos3, provavelmente por fazerem parte de uma mesma maquinaria de translocação do parasita, são mutuamente dependentes para alcançarem suas localizações adequadas na membrana plasmática (seu local de ação), assim como para exercerem sua atividade de flipase (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006a). A menor capacidade de internalizar a miltefosina também foi relacionada com o baixo nível de expressão da subunidade LbRos3 e com a menor atividade do transportador LbMT em *L. (V.) brasiliensis*, os quais correspondem ao LdRos3 e ao LdMT em *L. (L.) donovani* (SANCHEZ-CANETE *et al.*, 2009).

Outros possíveis mecanismos de resistência à miltefosina descritos são: alterações no conteúdo lipídico e no nível de insaturações de ácidos graxos e redução no nível de ergosterol, as quais foram observadas em formas promastigotas de *L. (L.) donovani* resistentes (RAKOTOMANGA *et al.*, 2005); e expressão aumentada de proteínas (HSP83 e SKCRP14.1) relacionadas com a manutenção do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) a qual foi associada com o fenótipo de resistência à miltefosina em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* (VERGNES *et al.*, 2007).

Alguns fatores intrínsecos da droga também podem contribuir para a emergência disseminada de parasitas resistentes à miltefosina: (i) o longo tempo de tratamento (28 dias); (ii) a elevada meia-vida da miltefosina (150 – 200 h), a qual resulta em níveis sub-terapêuticos por algumas semanas após o tratamento; (iii) e o mecanismo de ação da miltefosina, que apesar de desconhecido até o momento, apresenta como pré-requisito a internalização da droga.

Na ausência de novas drogas, o conhecimento sobre as bases moleculares da falência do tratamento e o desenvolvimento de novas ferramentas para detecção desse fenômeno podem contribuir para o uso racional da miltefosina e para traçar novas estratégias terapêuticas para o seu uso no tratamento da LV. Nesse contexto, a análise da expressão protéica por abordagens proteômica, tem se mostrado uma

estratégia efetiva na identificação de marcadores moleculares envolvidos no fenótipo de resistência a drogas em parasitas do gênero *Leishmania* (DRUMMELSMITH *et al.*, 2004; VERGNES *et al.*, 2007; SINGH, CHAVAN e DEY, 2008; EL FADILI *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2009).

1.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

O termo proteoma foi utilizado primeiramente por Wasinger e colaboradores (1995) como proteínas complementares ao genoma. Tradicionalmente, proteômica é definido como a análise do conjunto completo de proteínas (proteoma) expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinada situação e, ao contrário do genoma, não é estático, podendo ser modificado pelas condições e estímulos as quais este organismo está exposto.

Estudos em eucariotos e procariotos têm mostrado que o paradigma “um gene – uma proteína” é incorreto, visto que múltiplos produtos gênicos podem ser obtidos a partir de um único gene. Um produto gênico pode se apresentar em diversas formas (Figura 5), como resultado de “splicing” alternativo e de modificações co- e pós-traducionais (como fosforilações, glicosilação, acilação, etc) (JENSEN, 2004). É importante ressaltar que em muitos casos os níveis de RNA mensageiro (mRNA) transcritos não apresentam uma correlação direta com a expressão protéica (ANDERSON e SEILHAMER, 1997; GYGI *et al.*, 1999; MCNICOLL *et al.*, 2006). Dessa forma, o proteoma reflete a expressão das moléculas que influenciam mais diretamente a bioquímica e o funcionamento celular.

As espécies pertencentes à ordem Kinetoplastida, como *Leishmania* spp., por exemplo, não apresentam interrupções (íntrons) entre as regiões codificantes, exceto para o gene que codifica a polimerase poli-A (MAIR *et al.*, 2000), não ocorrendo, portanto, “splicing” alternativo do mRNA. Dessa forma, modificações pós-traducionais e alguns tipos de modificações pós-transcricionais são as principais responsáveis pela variedade de produtos gênicos observados nesses organismos.

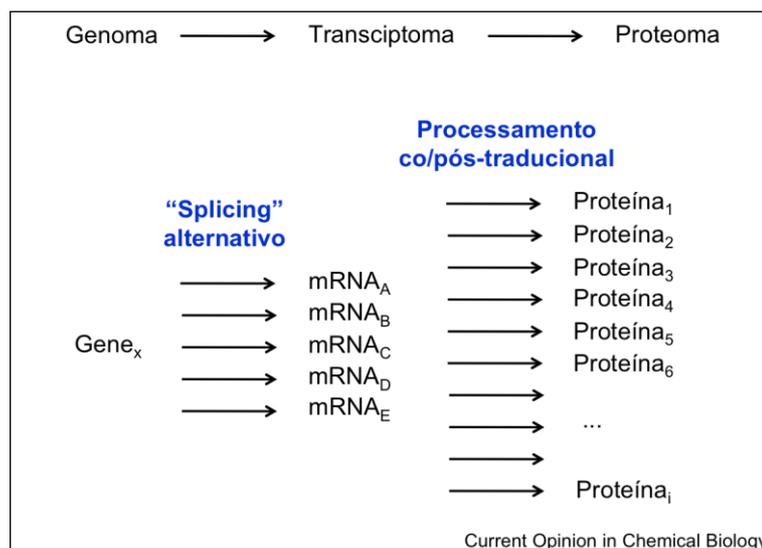


Figura 5 - Do genoma ao proteoma: um aumento na complexidade e na dinâmica. A diversidade de produtos gênicos oriundos de um único gene é devida principalmente aos “splicing” alternativos dos transcritos e às modificações co- e pós-traducionais das proteínas. É predito no genoma humano cerca de 30.000 ORFs, cada um dos quais, origina em média 6 diferentes espécies de mRNA. Estes são traduzidos a proteínas que são processadas em diferentes vias, gerando cerca de 8 a 10 diferentes formas modificadas de proteínas. Portanto, o genoma humano pode potencialmente produzir cerca de (30.000 x 6 x 10) 1.8 milhões de diferentes espécies protéicas. Adaptado de Jensen (2004).

A análise proteômica clássica fornece métodos que permitem determinar a identidade e a abundância de proteínas constituintes do proteoma e o conhecimento da função protéica pode ser inferido pela variação de sua expressão. A abordagem proteômica foi estabelecida na década passada com o desenvolvimento de métodos de seqüenciamento de proteínas, baseado na espectrometria de massas, acoplado com métodos de eletroforese em gel ou cromatografia, para resolver misturas protéicas. O parâmetro crítico que define o sucesso ou não da análise proteômica é a habilidade de resolver proteínas de uma mistura complexa. Uma das técnicas mais efetivas para atingir esse objetivo é a eletroforese bidimensional (2DE), que apesar de apresentar algumas limitações relacionadas com a solubilização de proteínas de membrana (altamente hidrofóbicas) e segregação de proteínas de pontos isoelétricos (pI) e tamanhos extremos (geralmente limitada entre 10 e 120 kDa), é uma abordagem com capacidade de analisar milhares de proteínas simultaneamente (GORG, WEISS e DUNN, 2004; VERCAUTEREN, ARCKENS e QUIRION, 2007).

Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas de acordo com sua carga líquida, por meio da focalização isoelétrica (IEF – isoelectric focusing), na primeira dimensão. Durante essa fase, as proteínas migram em direção ao eletrodo carregado, através de um gradiente específico de pH presente no gel, até alcançar seu pI, no qual a carga líquida da proteína é zero. Após a focalização isoelétrica, as proteínas são separadas na segunda dimensão baseada em sua massa molecular, usando a técnica padronizada de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Figura 6) (O'FARRELL, 1975).

A análise por eletroforese bidimensional gera informações de centenas de proteínas investigadas simultaneamente, incluindo: peso molecular; ponto isoelétrico; abundância relativa; e modificações pós-traducionais (VERCAUTEREN *et al.*, 2007). As modificações pós-traducionais podem ser identificadas na eletroforese 2D da seguinte forma: (i) modificações pós-traducionais que alteram o peso molecular e/ou o ponto isoelétrico das proteínas são refletidas em uma alteração na posição da mesma em relação ao “spot” protéico correspondente no mapa proteômico 2D. Embora as modificações pós-traducionais sempre alterem o massa molecular da proteína, em geral, essa variação é muito pequena para ser detectada por SDS-PAGE. Dessa forma, as modificações detectáveis na eletroforese 2D são aquelas que alteram o pI da molécula (fosforilação, acilação, deamidação, etc); (ii) em combinação com a técnica de Western blotting, anticorpos específicos para determinada modificação pós-traducional podem relevar “spots” no mapa proteômico 2D contendo proteínas com essas modificações (BOYD-KIMBALL *et al.*, 2006).

Subseqüente à separação, as proteínas são reveladas por corantes para a visualização dos spots protéicos, removidas e digeridas no gel com tripsina. Os fragmentos trípticos resultantes são extraídos do gel e analisados por espectrometria de massas (MS) “in tandem”, sendo a tecnologia MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) uma das mais utilizadas. Para análise dos fragmentos trípticos, estes são ionizados pelo sistema e resolvidos com base na razão massa/carga (m/z). Do espectro de massa resultante, íons parentais são selecionados para segunda análise de MS. Esses íons passam por uma célula de colisão, onde são submetidos a uma fragmentação ao longo da cadeia peptídica,

produzindo um padrão predito de fragmentos (MS/MS). Diferenças entre as massas desses fragmentos no espectro MS/MS podem ser usados para determinar a seqüência de aminoácidos da proteína analisada (Figura 6). Os resultados de massas obtidos são comparados com dados depositados em bancos internacionais, utilizando softwares que identificam proteínas. A identificação pode ser feita pelo padrão obtido das massas intactas dos fragmentos trípticos (PMF – peptide/protein mass fingerprinting), pela seqüência específica de fragmentos do MS/MS ou pela combinação desses.

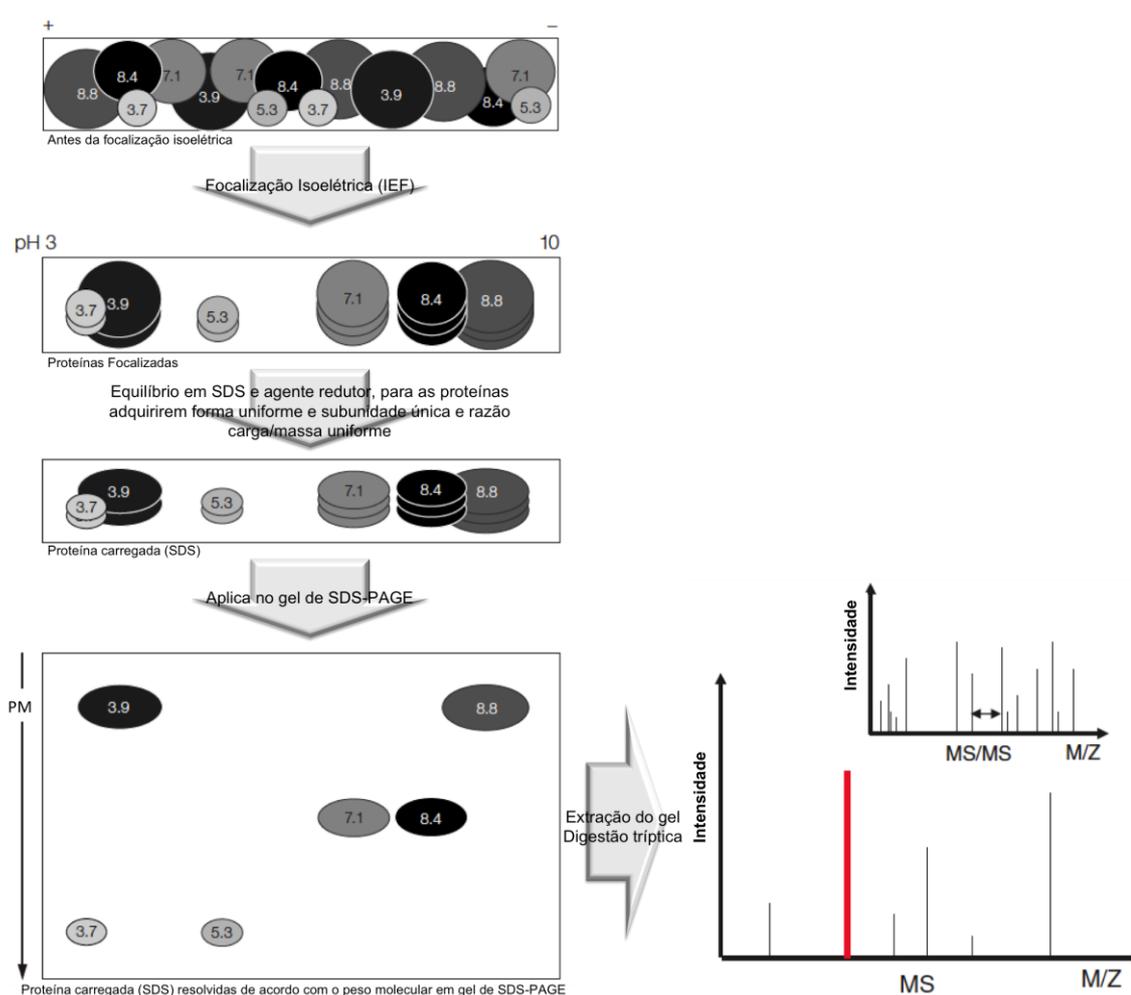


Figura 6 - Diagrama esquemático da separação de proteínas por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas. Mistura de proteínas resolvida em tira com gradiente de pH imobilizado (IPG – immobilized pH gradient) de acordo com o pI de cada proteína e independente do seu tamanho. Após a focalização isoeletrica, as proteínas são separadas pela sua massa molecular (MM) no sistema SDS-PAGE. Os “spots” protéicos de interesse são identificados por análise de espectrometria de massa “in tandem”. A análise dos fragmentos trípticos resulta no espectro de massas MS, do qual são selecionados íons parentais (pico em vermelho) para serem fragmentados em sua cadeia peptídica, gerando o espectro MS/MS. Por meio da diferença entre as massas dos fragmentos do íon parental (seta de duas direções), a seqüência de aminoácidos do peptídeo pode ser determinada. Adaptado de BIO-RAD (2010) e PHILLIPS e BOGYO (2005).

Em geral, a abordagem proteômica por eletroforese 2D-MS, é utilizada com a finalidade de obter um mapa de referência e/ou o perfil de expressão protéica de um determinado organismo. O objetivo do mapa de referência é definir a identidade e a localização do maior número possível de proteínas de um organismo (CORDWELL, NOUWENS e WALSH, 2001), que pode ser utilizado como ponto de referência para investigar a resposta de um determinado organismo a um estímulo externo, por exemplo. Entretanto, o sucesso na construção do mapa de referência de um organismo depende da disponibilidade do genoma seqüenciado do mesmo. Na falta de informações disponíveis de seqüências genômicas, pode-se utilizar genomas incompletos ou genomas de espécies relacionadas (NUGENT *et al.*, 2004).

O perfil de expressão protéica, por sua vez, pode ser utilizado para identificar proteínas envolvidas em determinados processos fisiológicos como: proteínas reguladas em patógenos resistentes à drogas (MCATEE, HOFFMAN e BERG, 2001; DRUMMELSMITH *et al.*, 2003); comparação da expressão protéica em resposta a estímulos externos (GUINA *et al.*, 2003; KAN *et al.*, 2004); mapeamento de alvos moleculares de drogas (SINGH, JAYASWAL e WILKINSON, 2001); e proteínas específicas para cada estágio de vida de parasitas dimórficos (EL FAKHRY, OUELLETTE e PAPADOPOULOU, 2002; BENTE *et al.*, 2003; MOJTAHEDI, CLOS e KAMALI-SARVESTANI, 2008)

Portanto, considerando as possibilidades oferecidas pela abordagem proteômica e a importância epidemiológica e médica da leishmaniose visceral, este estudo tem como objetivo comparar o perfil de expressão protéica de isolados de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes *in vitro* à miltefosina, obtidos de pacientes portadores de LV antes do tratamento com miltefosina, que apresentaram ou não falha terapêutica, visando detectar proteínas diferencialmente expressas por esses isolados que poderiam estar relacionadas aos mecanismos de resistência do parasita a essa droga.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas diferencialmente expressas em isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina, por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas, visando contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência do parasita à droga.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar as condições da eletroforese bidimensional (2DE) para isolados de *L. (L.) chagasi*.
- Obter o padrão protéico bidimensional expressado pelo genoma de isolados de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina.
- Localizar conjuntos de proteínas diferencialmente expressas nos diferentes isolados estudados.
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas entre os diferentes isolados estudados por espectrometria de massas.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

A utilização dos isolados de *L. (L.) chagasi* de pacientes para o desenvolvimento deste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, sob o registro no CEP-066/07. Título: “Avaliação da sensibilidade *in vitro* à miltefosina de cepas de *Leishmania (L.) chagasi* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose visceral”.

3.2. REAGENTES

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q e, todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica. As origens dos reagentes são:

Ágar, triptose e LIB (Liver Infusion Broth) da Becton, Dickinson and Company, (Brasil); cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dibásico de sódio, bicarbonato de amônio e acetonitrila grau HPLC da Merck S.A. (Brasil); Soro Fetal Bovino inativado (SFBi) da Cultiab (Brasil); solução antibiótica (10.000 unidades de penicilina/mL e 10 mg estreptomicina /mL), RPMI-1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio), D(+)glucose, hemina, trietanolamina, ácido fórmico, ácido trifluoracético (TFA), brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) e cocktail inibidor de proteases (para células mamíferas e extratos de tecidos) da Sigma-Aldrich (EUA); miltefosina gentilmente doada pela Zentaris Inc. (Canadá); corante hematológico Panótico Rápido da Laborclin (Brasil); anfólitos (Bio-Lyte 3-10), uréia, tiras com gradiente linear de pH imobilizado (IPG “strip”: Immobilized pH gradient), 3-[[3-cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), dithiothreitol (DTT) e padrão de peso molecular para SDS-PAGE (Broad Range) da Bio-Rad Laboratories Inc. (EUA); tiouréia, hidroximetil aminoetano (Tris), glicerol,

iodoacetamida, glicina, kit de dosagem de proteína (2-D Quant Kit) e tampão de reidratação (Destreak) da GE Healthcare (Reino Unido); sodium dodecyl sulfate (SDS) da J.T. Baker (EUA); solução de acrilamida-bis (Acrylamide/Bis Solution – 37,5:1 (30%T, 2.6%C)) da Serva Electrophoresis (Alemanha); agarose da BioAmérica Inc (EUA); matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) da Aldrich, (EUA); e tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade) da Promega (EUA).

3.3. ISOLADOS DE *Leishmania (L.) chagasi*

Os isolados de *L. (L.) chagasi* utilizados neste estudo foram obtidos de pacientes com leishmaniose visceral que participaram de um estudo clínico para avaliar a eficácia da droga miltefosina no Brasil (dados não publicados). Os isolados foram coletados antes do tratamento com 2,5 mg de miltefosina/kg/dia durante 28 dias. Foram utilizados isolados de 4 pacientes: 2 que responderam ao tratamento e apresentaram sensibilidade *in vitro* à droga (S1 e S2); e 2 que não responderam ao tratamento e apresentaram resistência *in vitro* à droga (R1 e R2). Todos os isolados foram previamente identificados como *L. (L.) chagasi* por meio da técnica PCR-RFLP descrita por Volpini e colaboradores (2004).

Para padronizar a técnica de eletroforese bidimensional foi utilizada a cepa padrão de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

3.4. CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (L.) chagasi*

As formas promastigotas criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas em meio bifásico agar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle – NNN (NOVY e MCNEAL, 1903; NICOLLE, 1908) associado ao meio LIT (Liver Infusion Tryptose) com 10% de SFBi. Após 4 dias de cultivo a 24°C (\pm 1°C) em estufa B.O.D., os parasitas foram examinadas quanto à motilidade, morfologia e ausência de contaminação e reinoculadas em meio LIT suplementado com 10% de SFBi e 2% de urina masculina estéril (HOWARD *et al.*, 1991). Para cada isolado,

massas de parasitas de três cultivos independentes, na fase logarítmica tardia de crescimento (a qual correspondeu ao 7º dia de crescimento), foram obtidas por centrifugação a 1000 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com meio RPMI-1640, sob as mesmas condições de centrifugação, por três vezes, e acondicionadas na forma de “pellet” úmido a -70°C até a etapa de obtenção do extrato protéico.

Durante o cultivo dos isolados em meio LIT, o número de células (promastigotas) por mL foi determinado diariamente, em câmara de Neubauer, para montagem de uma curva de crescimento para cada isolado.

3.5. CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA

3.5.1. SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania* À MILTEFOSINA

Os isolados de *L. (L.) chagasi* oriundos de pacientes respondedores e não-respondedores à miltefosina foram submetidos à análise de susceptibilidade à miltefosina *in vitro* utilizando ensaios de infecção de macrófagos.

Macrófagos peritoneais residentes foram obtidos de camundongos Suíços por lavagem com meio RPMI-1640. Os macrófagos foram plaqueados em lâminas de cultura de 16 poços (Lab-Tec™ – Chamber Slide – NUNC) com 8×10^4 células/poço (100 µL de uma suspensão de macrófagos em meio RPMI-1640) e incubados por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células não-aderentes foram removidas e os macrófagos aderentes foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, em fase logarítmica tardia, na razão de 7:1 (promastigotas:macrófagos) diluídas em meio RPMI-1640. A cultura foi mantida a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. Os parasitas extracelulares foram removidos da cultura por lavagem das células com meio RPMI-1640 e, em seguida, foram adicionadas

diferentes concentrações da droga (0,55; 1,67; 5,0; e 15 µM de miltefosina – maior concentração tolerada pelos macrófagos neste ensaio) preparadas em meio RPMI-1640/10% SFBi. Culturas não tratadas (0,0 µM de miltefosina) foram utilizadas como controle. Após 72 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂, as células da cultura foram fixadas e coradas utilizando o corante hematológico Panótico Rápido e 100 macrófagos/poço foram microscopicamente avaliados.

A atividade da droga foi avaliada pela porcentagem de células infectadas nas culturas tratadas com miltefosina em relação ao controle não-tratado de acordo com a Equação 1. A concentração de miltefosina que reduz em 50% o número de macrófagos infectados (CE₅₀) foi determinada por meio de análise de regressão logarítmica, utilizando o software Microsoft® Excel® 2008 versão 12.1.0, e expressa como média ± desvio padrão. Três ensaios independentes foram realizados para cada isolado, e os testes foram realizados em triplicata.

$$\% \text{inibição} = 100 - \left(\frac{C_{i(\text{tratado})}}{C_{i(\text{não-tratado})}} \times 100 \right) \quad \text{Eq.1}$$

Onde:

- $C_{i(\text{tratado})}$ = número de células infectadas, em 100 células avaliadas, na cultura tratada com miltefosina.
- $C_{i(\text{não-tratado})}$ = número de células infectadas, em 100 células avaliadas, no controle.

3.5.2. SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* À MILTEFOSINA

A sensibilidade *in vitro* das formas promastigotas dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* de pacientes respondedores e não-respondedores à miltefosina foi determinada pelo método colorimétrico, empregando o sal de tetrazólio (MTT) de acordo com as metodologias propostas por Sereno e Lemesre (1997) e Duta e colaboradores (2005). Em placa de 96 poços foi adicionado 100 µL de cultura de parasita na concentração de 2x10⁶ promastigotas/mL em meio LIT suplementado com 10% de SFBi e 4% de urina estéril. Em seguida foi adicionado 100 µL de miltefosina, em meio LIT suplementado com 10% SFBi, em diferentes concentrações

(concentrações finais no poço: 45, 15, 5, 1,67 e 0,56 μM miltefosina). Culturas com ausência da droga (0,0 μM de miltefosina) foram utilizadas como controle e poços contendo apenas meio LIT foram utilizados como branco do sistema. Após 72 horas de incubação a 24°C, a placa foi centrifugada a 900 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 140 μL do sobrenadante foram removidos da cultura e 25 μL /poço de solução estéril de 1,5 mg de MTT/mL em meio LIT foram adicionados. A placa foi incubada por 4 horas a 37°C para a conversão do sal de tetrazólio em formazan. A reação enzimática foi paralisada e o precipitado de formazan foi solubilizado pela adição de 200 μL de DMSO. Em seguida a densidade ótica foi mensurada a 492 nm e desta foi subtraído o valor da absorbância do branco.

A porcentagem de inibição para cada concentração de miltefosina testada foi determinada pela relação entre a absorbância da cultura tratada com a droga e a absorbância do controle não-tratado de acordo com a Equação 2. A concentração de miltefosina que reduz em 50% a sobrevivência do parasita (CE_{50}) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear (curva dose-resposta), utilizando o software prism versão 5.0b, e expressa como média \pm desvio padrão. Três ensaios independentes foram realizados para cada isolado, e os testes foram realizados em triplicata.

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \left(\frac{ABS_{tratada}}{ABS_{controle}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

Onde:

- $ABS_{tratada}$ = absorbância obtida na cultura tratada com miltefosina.
- $ABS_{controle}$ = absorbância obtida na cultura controle.

A diferença de sensibilidade à miltefosina entre os isolados clínico de *L. (L.) chagasi* foi determinada pelo teste estatístico bicaudal t-student (GraphPad prism versão 5.0b), assumindo significância estatística $\alpha < 0,05$.

3.6. OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO

As massa de parasitas na forma de “pellet” úmido (obtidas no item 3.4) foram ressuspensas em tampão de lise 2D (8 M de uréia, 2 M de tiouréia, 40 mM de Tris, 4% (p/v) de CHAPS, 0,2% de anfólitos e 1% (v/v) cocktail inibidor de proteases) na proporção de 1:3 (v:v). As células foram lisadas sob leve agitação por 2 horas à temperatura ambiente, seguida por passagem do homogenato em agulha 26 G por 10 vezes. Para obtenção do extrato protéico solúvel o material insolúvel do lisado celular foi removido por centrifugação a 20.000 g por 30 minutos a 20°C. Os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados a -70°C até sua utilização (ANDRADE *et al.*, 2008). O conteúdo protéico das amostras foi determinado pelo kit 2-D Quant Kit, conforme as indicações do fabricante.

3.7. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE)

3.7.1. PRIMEIRA DIMENSÃO – FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA

Alíquotas de 500 ou 800 µg de proteínas solúveis (conforme obtidas no item 3.6) foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, para volume final de 350 µL. As soluções das amostras foram transferidas para bandeja de reidratação e as “IPG strip” desidratadas (17 cm, pH 3-10 ou 4-7) foram colocadas e permaneceram sobre estas durante 30 minutos. Em seguida, foram realizadas as etapas de reidratação ativa (50 V por 12 horas a 20°C) e focalização isoelétrica (1ª etapa: 300 V por 3 horas; 2ª etapa: aumento gradual da voltagem, por rampa rápida, até 10.000 V em 2 horas; 3ª etapa: acúmulo de 60.000 Vh; 4ª etapa: 500 V por 5 horas) no sistema IEFCell (Bio-Rad) a 20°C com corrente máxima de 50 mA/gel.

3.7.2. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após a primeira dimensão, as proteínas eletrofocalizadas no gel foram submetidas à redução e alquilação. O processo consistiu de incubação seqüenciada com: (i) tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL de DTT, durante 15 minutos; e (ii) tampão de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodoacetamida durante 15 minutos.

3.7.3. SEGUNDA DIMENSÃO – SDS-PAGE

SDS-PAGE foi realizada de acordo com Laemmili (1970), utilizando o sistema Protean II XL (Bio-Rad) em tampão Tris/Glicina/SDS (TGS). As IPG “strips” contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para superfície do gel de poliacrilamina (12%) e seladas com solução de agarose 0,5% preparada em tampão TGS. A migração das proteínas ocorreu a 16 mA/gel por 30 minutos e, em seguida a 24 mA/gel até o término da corrida. Após a 2ª dimensão os géis foram corados com Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) segundo a metodologia proposta por Neuhoff e colaboradores (1988).

3.8. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS IMAGENS

Para obtenção das imagens, os géis 2D foram digitalizados utilizando scanner ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) no modo de transmissão calibrado. Para cada isolado clínico (S1, S2, R1 e R2) foram obtidos três géis 2D, cada um correspondente a extrato protéico de cultivos independentes (S1-01, S1-02 e S1-03; S2-01, S2-02 e S2-03; R1-01, R1-02 e R1-03; e R2-01, R2-02 e R2-03), perfazendo um total de 12 imagens. Três imagens, correspondentes a cultivos independentes, também foram obtidas para a cepa padrão *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

As imagens foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05 (GE Healthcare Life Sciences). A autenticidade de cada “spot” foi validada por inspeção

visual e editada quando necessário. A intensidade de cada spot foi normalizada em %Vol (Eq.3).

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100 \quad \text{Eq.3}$$

Onde:

- Vol = área da base do pico do “spot” (a 75% do cume) x intensidade do “spot”.
- Vol_s é o volume do “spot” s em um gel contendo n “spots”.

Para a realização da sobreposição (“match”) dos “spots” as imagens foram agrupadas de acordo com o esquema hierárquico mostrado na figura 7.

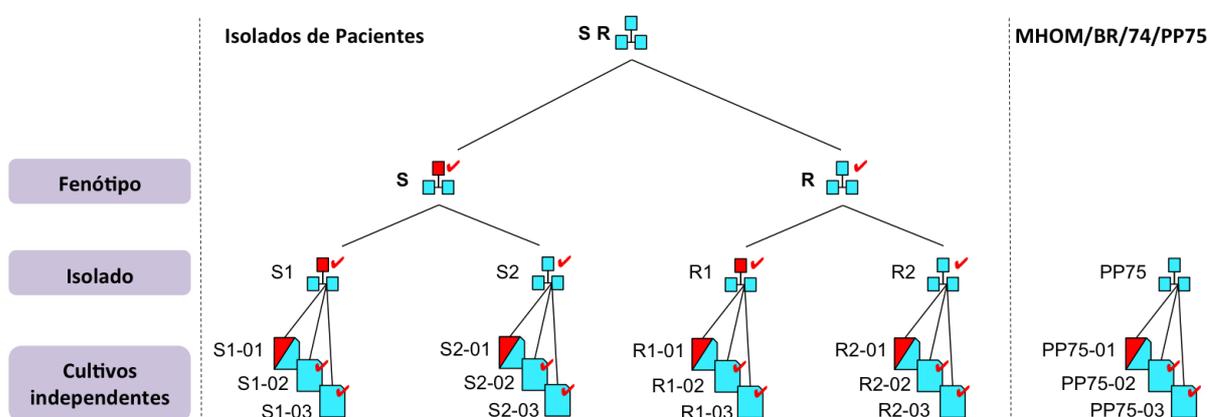


Figura 7 - Hierarquia dos grupos para sobreposição das imagens. Esquerda: identificação dos grupos. Centro: isolados dos pacientes. Grupo de amostras de *L. (L.) chagasi* sensíveis (S) ou resistentes (R) à miltefosina. Para cada fenótipo, dois isolados foram avaliados, resultando em 4 diferentes grupos de isolados (S1, S2, R1 e R2). Para cada isolado, três géis (de cultivos independentes) foram obtidos, perfazendo um total de 12 imagens. Direita: três géis de cultivos independentes do isolado da cepa padrão *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). O símbolo ✓ representa a realização de “match” entre as imagens com a imagem de referência (figura com detalhe em vermelho) dentro do respectivo nível.

A variação experimental foi determinada por meio de análise de correlação (“scatter plot”) dentro do grupo de imagens obtidas da cepa padrão *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e de cada isolado clínico (S1, S2, R1 e R2).

Posteriormente foram realizadas análises qualitativas de expressão protéica para identificação de “spots” exclusivos de cada grupo de isolados (S1, S2, R1 e R2) ou do fenótipo sensível (S) e resistente (R), e análises quantitativas para a identificação de proteínas com expressão diferenciada entre os grupos S e R.

Os critérios utilizados para seleção dos “spots” com diferença qualitativa na expressão protéica foram:

- Presença em todas as replicatas de um grupo de isolado (S1 ou S2 ou R1 ou R2) e ausência nas replicatas dos demais grupos; ou
- Presença em todas as replicatas de um fenótipo (S1 e S2 ou R1 e R2) e ausência em todas as replicatas do outro fenótipo.

A diferença quantitativa na expressão protéica dos “spots” reprodutíveis (presente em pelo menos cinco das seis imagens em cada grupo S ou R) foi determinada pelo teste estatístico ANOVA, assumindo significância estatística $\alpha < 0,05$. Também foram considerados “spots” protéicos de interesse, aqueles que estavam presentes apenas em um dos grupos de isolados de um mesmo fenótipo (S ou R) e apresentavam uma redução quantitativa ($\alpha < 0,05$ pelo teste ANOVA) em relação aos dois grupos de isolados do outro fenótipo.

3.9. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

3.9.1. DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS, EXTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS E ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os “spots” protéicos selecionados nas análises descrita no item 3.8 foram manualmente removidos do gel, fragmentados e, posteriormente descorados com

400 μL de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0 (três etapas de 15 minutos cada, sob agitação). Após a remoção do descorante, os “spots” foram tratados com 200 μL de acetonitrila P.A. até o gel se tornar opaco. Este solvente foi removido da amostra por concentração a vácuo (concentrador plus, Eppendorf). Posteriormente, os fragmentos dos géis foram reidratados com 10 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/ μL de tripsina. Após 30 minutos em banho de gelo, 20 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados para manter os pedaços de gel úmido durante a digestão triptica (37°C por 16 horas). Em seguida, a solução não incorporada ao gel foi recolhida e os pedaços do gel foram submetidos a lavagens sucessivas com 30 μL de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (duas etapas de 30 minutos cada, sob agitação) para completa remoção dos fragmentos tripticos. As três soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido por concentrador a vácuo, até aproximadamente 10 μL . Posteriormente as amostras obtidas foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C_{18} ; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. Os fragmentos da hidrólise triptica foram eluídos da resina em 6 μL de solução de acetonitrila 50%, contendo 0,1% de TFA (VERGOTE *et al.*, 2005). Um fragmento do gel em uma região sem “spot” protéico e um fragmento do gel correspondente à albumina bovina (BSA) do padrão de peso molecular foram utilizados, respectivamente, como controle negativo e positivo para as análises. Aliquotas de 0,5 e 1,0 μL de cada solução dos fragmentos dessalinizados foram aplicadas em placa anchorship 600 (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e em seguida co-cristalizada com 0,25 μL de solução saturada da matrix (5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70% / TFA 0,1%) a temperatura ambiente.

Os espectros de massas foram obtidos em sistema MALDI-TOF/TOF – Autoflex III™, softwares FlexControl™ e FlexAnalysis™ (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA), operando no modo positivo/refletor. A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de peptídeos Peptide Calibration Standard II (bradicinina $m/z = 757,39$; angiotensina II $m/z = 1046,54$; angiotensina I $m/z = 1296,68$; substância P $m/z = 1347,73$; bombesina $m/z = 1619,82$; substrato da renina $m/z = 1758,93$; ACTH (1-17) $m/z = 2093,08$; ACTH (18-39) $m/z = 2465,19$; e somatostatina (28) $m/z =$

3147,47) da Bruker Daltonics, Bilerica (EUA). Os sinais dos íons mais intensos foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS.

3.9.2. PESQUISA EM BANCO DE DADOS

Os espectros de massas obtidos de cada “spot” protéico (MS e MS/MS) foram combinados pelo software BioTools (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e posteriormente investigados nos bancos de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundante (NCBIInr), por meio do software MASCOT[®] (<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros de busca utilizados no MASCOT[®] foram: peptídeos trípticos com ausência de um único fragmento; ausência de restrições no peso molecular da proteína e na taxonomia; oxidação da metionina e carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente; valores de massa monoisotópica; carga do peptídeo 1+; e tolerância de 0,8 Da na massa do MS e do MS/MS. Score global do MASCOT[®] correspondente à significância estatística de $\alpha < 0,05$ foi utilizado para validação da identificação das proteínas, quando estas apresentavam homologia com espécies de *Leishmania*. Os índices de correlação entre o pI e MM experimental e teórico foram calculados pelo software prism versão 5.0b, por meio da análise de correlação de Spearman.

A categorização funcional das proteínas identificadas foi realizada por meio das anotações do processo biológico obtidas do “Gene Ontology” (GO) para *L. infantum* e confirmadas pela base de dados do “KEGG Orthology” (KO) (<http://www.genome.jp.kegg/kegg2.html>).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *L. (L.) chagasi*

Os isolados clínicos utilizados nesse estudo foram previamente identificados como *L. (L.) chagasi* pela técnica de PCR-RFLP descrita por Volpini e colaboradores (2004).

A susceptibilidade *in vitro* à miltefosina das formas amastigotas e promastigotas, dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes respondedores e não-respondedores, foi determinada pelo ensaio de infecção de macrófagos peritoneais e pelo ensaio com MTT, respectivamente. Os isolados de pacientes respondedores (S1 e S2) apresentaram uma sensibilidade maior à droga (CE₅₀ de 3,8 a 4,0 µM para as formas amastigotas e de 1,7 a 3,0 µM para as formas promastigotas) quando comparados com os isolados obtidos de pacientes não-respondedores (R1 e R2) (CE₅₀ > 15 µM para as formas amastigotas e de 9,4 a 9,9 µM para as formas promastigotas) (Tabela 1). Com bases nesses resultados, os isolados R1 e R2 foram considerados resistentes, enquanto que os isolados S1 e S2 foram considerados sensíveis à miltefosina.

Tabela 1 - Resposta clínica e sensibilidade *in vitro* dos isolados de *L. (L.) chagasi* à miltefosina.

Isolado	Resposta clínica	CE ₅₀ (µM) ^a	
		Amastigota	Promastigotas
S1	Cura	3,8 (± 0,3)	3,0 (± 0,8)*
S2	Cura	4,0 (± 1,2)	1,7 (± 0,4)**
R1	Recidiva	> 15	9,4 (± 0,5)
R2	Recidiva	> 15	9,9 (± 1,1)

^a CE₅₀ corresponde à concentração de miltefosina que reduz em 50% o número de macrófagos infectados ou que reduz em 50% a sobrevivência das formas promastigotas do parasita. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão referente aos ensaios independentes. * p<0,05 em relação aos dois isolados resistentes. ** p<0,01 em relação aos dois isolados resistentes.

A figura 8 mostra as curvas de inibição da infecção de macrófagos por amastigotas e das formas promastigotas dos isolados sensíveis e resistentes à miltefosina, utilizando diferentes concentrações da droga.

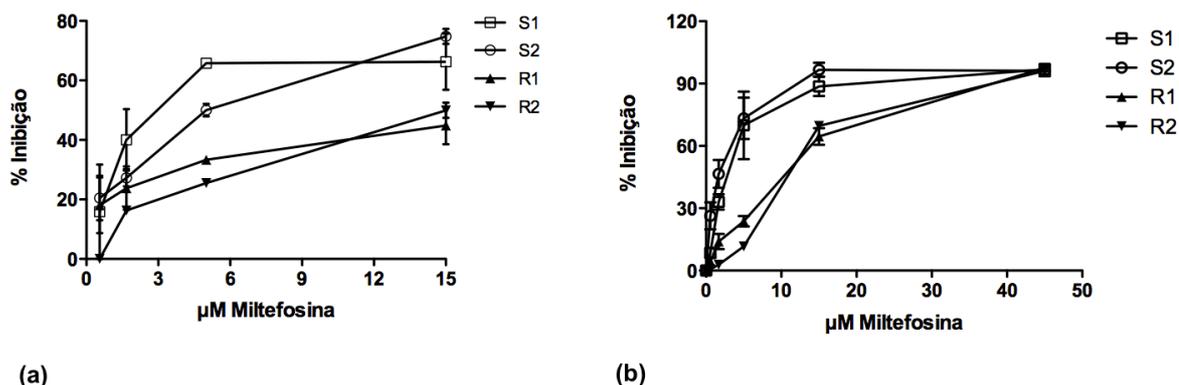


Figura 8 - Susceptibilidade dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* à miltefosina. A atividade da miltefosina foi mensurada após a incubação das formas intracelulares amastigotas (a) e das formas promastigotas (b) com diferentes concentrações de miltefosina. Cada ponto representa a média de três ensaios independentes e as barras indicam o desvio padrão.

4.2. PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL PARA ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

Extratos de proteínas solúveis obtidos de cultura de fase logarítmica tardia, correspondente ao sétimo dia de crescimento, da cepa padrão de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foram utilizados para padronizar todas as etapas da técnica de eletroforese bidimensional. A dosagem do conteúdo protéico do extrato solúvel revelou um rendimento médio de 1,98 mg de proteínas por 10^9 células de parasita. Como a densidade média de células na cultura em fase logarítmica foi de $2,8 \times 10^7$ /mL, um volume de 100 mL de cultura foi utilizado para obtenção de proteína em quantidade suficiente para a realização dos experimentos (análises proteômica).

Inicialmente foi determinada a faixa de pH que proporcionasse uma maior resolução das proteínas neste material. Para isso, as proteínas foram separadas por eletrofocalização em "IPG strip" de faixa linear de pH 3-10. Após separação por

SDS-PAGE (12%) foi observado que a maioria dos “spots” protéicos concentravam-se na região de pH 4-7 (Figura 9a). Como pode ser observado na figura 9b, uma maior resolução do perfil protéico foi obtida pela ampliação do gradiente de pH na faixa 4 a 7.

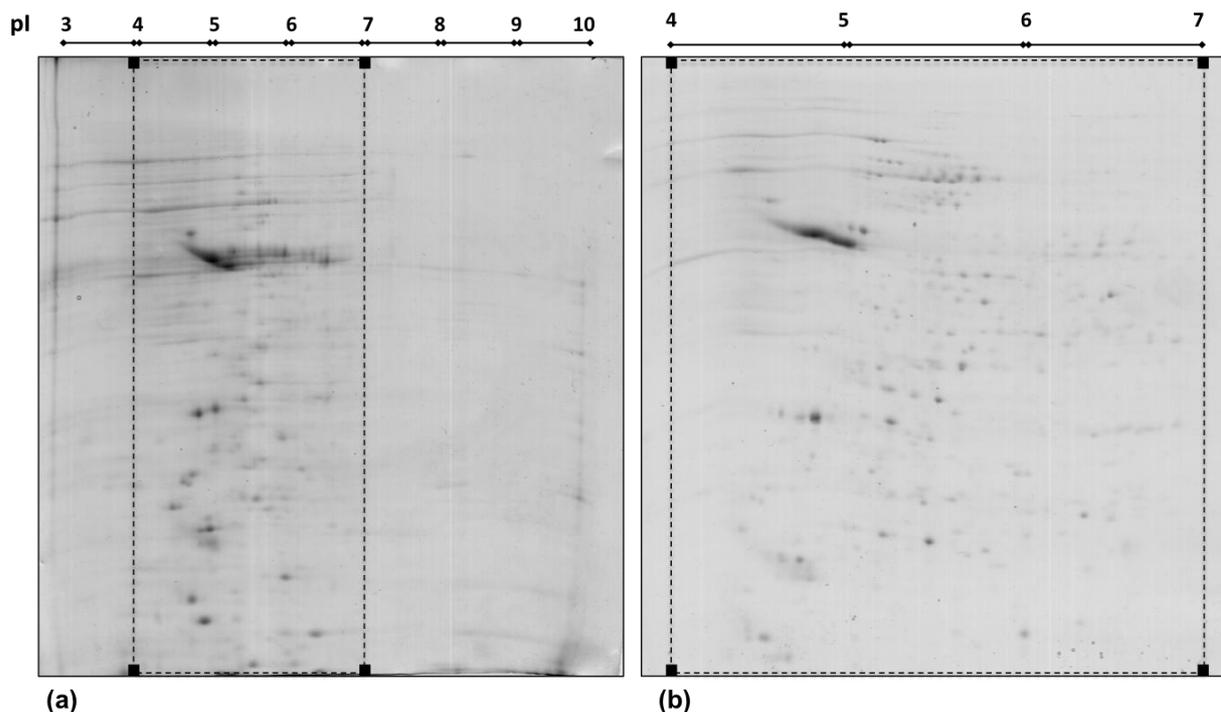


Figura 9 - Determinação da faixa de pH para separação do extrato protéico solúvel de *L. (L.) chagasi*. Géis obtidos após separação de 500 µg de proteínas solúveis de *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75 por: (a) IEF em IPG-strip 17 cm pH 3-10; ou (b) IEF em IPG-strip 17 cm pH 4-7. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com Coomassie G-250.

Outra etapa da padronização consistiu em determinar a quantidade apropriada de proteína a ser aplicada nos géis. A figura 10 mostra os perfis protéicos correspondentes à aplicação de amostras com as quantidades de proteínas solúveis avaliadas (500 e 800 µg). Um número maior de “spots” pôde ser visualizado com a aplicação de 800 µg de proteínas no gel. Pode também ser observado que essa quantidade de amostra proporciona maior densidade dos “spots” no gel sem perda de resolução dos mesmos.

Portanto, foi estabelecido a utilização de “IPG strip” com gradiente de pH de faixa 4 a 7 e a aplicação de amostras contendo 800 µg de proteínas por gel, para realização das eletroforeses bidimensionais posteriores.

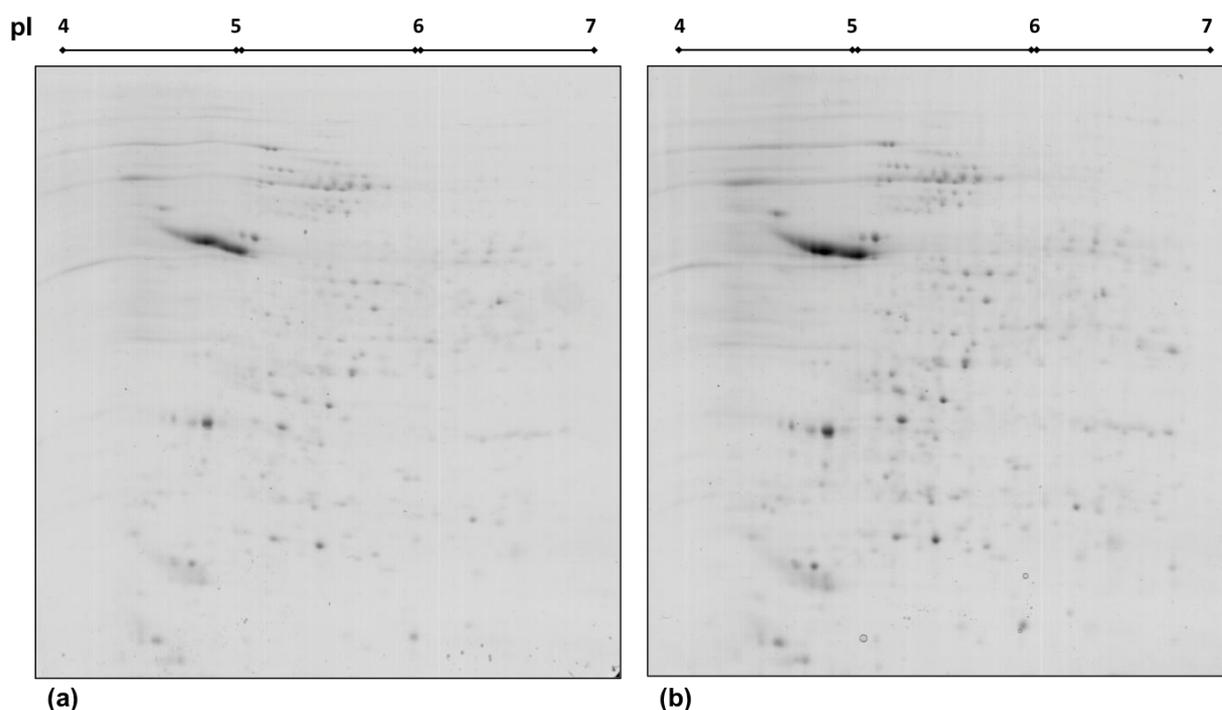


Figura 10 - Determinação da quantidade de proteína solúvel de *L. (L.) chagasi* para análise em gel 2D. Extrato protéico solúvel de *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75 separado por IEF em “IPG strip” pH 4-7. Segunda dimensão realizada em SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com Coomassie G-250. (a) 500 µg de proteínas. (b) 800 µg de proteína.

Utilizando as condições pré-estabelecidas foram realizadas três eletroforeses 2D das amostras correspondentes a cultivos independentes da cepa padrão de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). As imagens resultantes dos géis obtidos foram analisadas pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05 e, em média, 414 “spots” foram detectados. As proteínas detectadas apresentaram massa molecular variando entre 7 e 99 kDa, com a maioria dos “spots” protéicos localizados em regiões de massa molecular acima de 14 kDa. Os perfis protéicos obtidos dos três géis apresentaram elevada reprodutibilidade em termos do número total, intensidade e posição relativa dos “spots” protéicos, como indicado pelo coeficiente de correlação próximo de 1 e pela equação da regressão linear que correlaciona a % de volume

dos “spots” (Figura 11). Na equação $y = \text{slope} * x + \text{offset}$, o primeiro membro da equação indica o quanto em média os volumes dos “spots” são maiores (>1) ou menores (<1) que o volume do respectivo “spot” no gel de referência. O segundo membro da equação representa, por meio de uma unidade relativa, o deslocamento médio dos “spots” em relação aos respectivos “spots” no gel de referência.

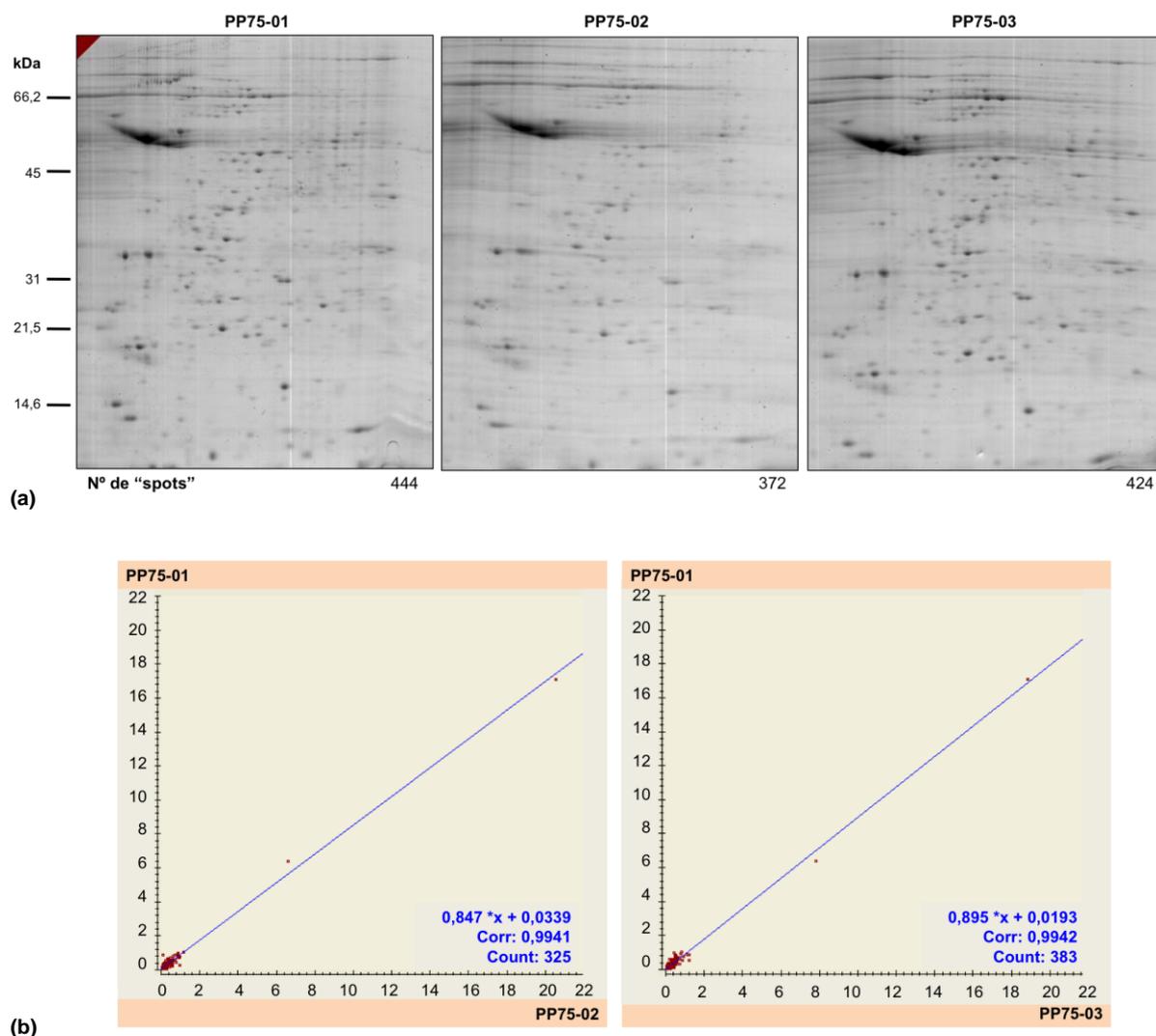


Figura 11 - Reprodutibilidade do sistema de eletroforese bidimensional. (a) Perfil 2D dos extratos (800 μ g) obtidos de três crescimentos independentes de *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75. A focalização isoeétrica foi realizada em “IPG strip” pH 4-7 de 17 cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12%. O triângulo vermelho identifica a imagem selecionada como referência. Os valores posicionados à esquerda dos géis representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão. (b) “Scatter plot” representando, por meio da dependência linear, a relação entre os valores (% volume) dos “spots” de um gel (eixo X) com os valores (% volume) correspondentes no gel de referência (eixo Y). Corr = coeficiente de correlação. Count = número de “match” entre as imagens analisadas.

4.3. ANÁLISE COMPARATIVA DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *L. (L.) chagasi* SENSÍVEIS E RESISTENTES À MILTEFOSINA

Para obtenção do perfil protéico dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis (S1 e S2) e resistentes (R1 e R2) à miltefosina, massas celulares de formas promastigotas, obtidas sob as mesmas condições de cultura, foram submetidas à extração protéica, a qual apresentou rendimento médio de 2,01 mg de proteínas solúveis por 10^9 células. Amostras de 800 µg de cada extrato protéico solúvel, obtidos de culturas independentes dos isolados, foram eletrofocalizados em “IPG strip” de faixa de pH 4-7 e subsequentemente resolvidos em sistema SDS-PAGE 12%, resultando em 3 géis para cada isolado. A análise das imagens, pelo software Image Master 2D Platinun v 7.05, mostrou que o número de “spots” detectados por gel variou de 418 a 549 e 347 a 488 para as amostras correspondentes aos isolados sensíveis e resistentes, respectivamente (Figura 12). O número de “spots” detectados nos grupos de isolados sensíveis e resistentes representaram em média, 6,2% e 5,3%, respectivamente, do total estimado de proteínas expressadas na espécie *Leishmania* spp. (8000 genes).

Dentro de cada grupo de isolado, também foram realizadas análises de correlação, por meio do “scatter plot”, as quais mostraram elevada reprodutibilidade em termos do número total, intensidade e posição relativa dos “spots” protéicos, como indicado na tabela 2.

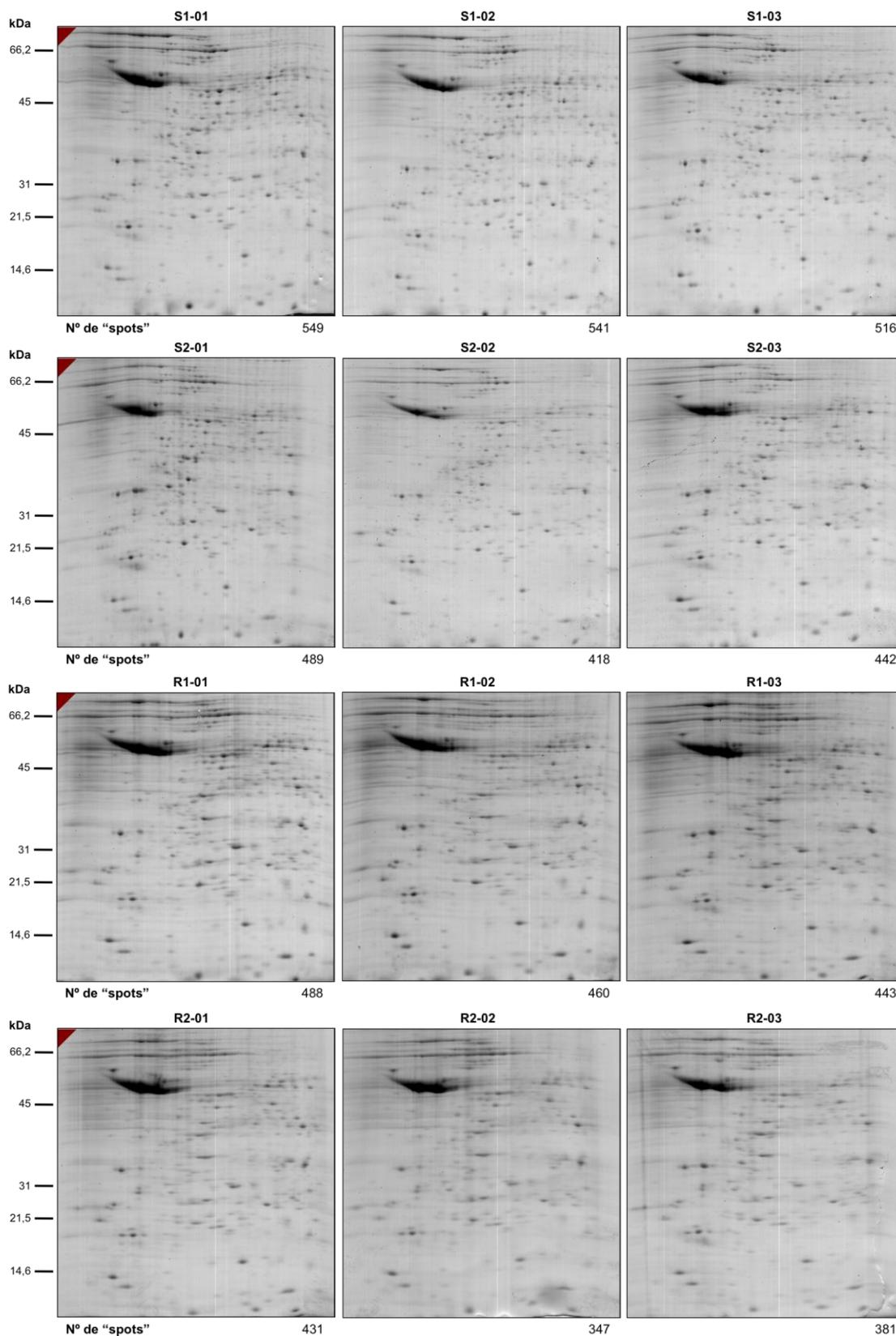


Figura 12 - Perfil protéico dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina. Aliquotas de 800 µg de proteínas solúveis foram focalizadas em "IPG strip" pH 4-7 de 17 cm. As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando SDS-PAGE 12%. O triângulo vermelho identifica a imagem selecionada como referência. Os valores posicionados à esquerda dos géis representam a massa molecular de proteínas utilizadas como padrão.

Tabela 2 - Análise de reprodutibilidade dentro dos grupos dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* analisados. As imagens foram relacionadas com a respectiva imagem de referência de cada grupo.

Relação entre os isolados	Equação	Coefficiente de correlação	Número de "Match"
S1-01 x S1-02	$y = 0,95x + 0,00679$	0,9959	484
S1-01 x S1-03	$y = 0,985x - 0,00282$	0,9929	462
S2-01 x S2-02	$y = 1,12x - 0,0411$	0,9936	377
S2-01 x S2-03	$y = 0,841x + 0,0276$	0,9968	402
R1-01 x R1-02	$y = 0,911x + 0,0163$	0,9952	421
R1-01 x R1-03	$y = 0,939x + 0,00618$	0,9979	397
R2-01 x R2-02	$y = 1,07x - 0,0289$	0,9983	345
R2-01 x R2-03	$y = 1,1x - 0,0385$	0,9978	346

A análise comparativa entre os proteomas dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes revelou um total de 80 "spots" diferencialmente expressos. Desses, 48 estavam presentes em todos isolados analisados, apresentando apenas diferença quantitativa de expressão protéica entre o grupo sensível e resistente ($p < 0,05$). Um "spot" estava presente em três isolados, sendo que a porcentagem de volume exibida no isolado R1 era estatisticamente menor que as porcentagens dos isolados S1 e S2, sugerindo que a redução ou ausência na expressão desse "spot" pode estar relacionada com o fenótipo observado. Dezoito "spots" eram exclusivos dos isolados sensíveis e um era exclusivo dos isolados resistentes. Os demais "spots" selecionados eram exclusivos de um único isolado (S1, S2, R1 ou R2) (Figura 13).

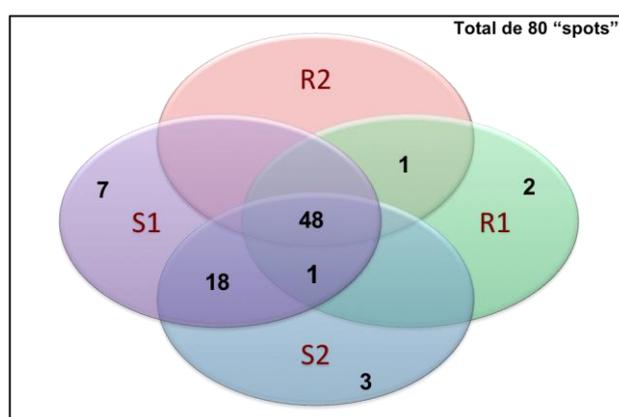


Figura 13 - Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos "spots" diferencialmente expressos entre os isolados analisados.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os “spots” protéicos com expressão diferenciada entre os isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina, foram extraídos dos géis e processados para a análise por espectrometria de massas em sistema MALDI/TOF-TOF. A combinação dos espectros de massas resultantes (MS e MS/MS) foi utilizada na identificação das proteínas, por meio de busca no banco de dados do NCBI nr pelo software MASCOT[®]. Como o genoma da espécie *L. (L.) chagasi* ainda não foi seqüenciado, a validade dessa estratégia de identificação das proteínas foi baseada no alto grau de seqüências conservadas entre as espécies de *Leishmania* spp. (PEACOCK *et al.*, 2007). A interpretação automática dos espectros de massas combinados permitiu a identificação de 49 dos 80 “spots” analisados. Desses, apenas um “spot” continha uma mistura de duas proteínas, totalizando 50 proteínas identificadas, as quais correspondiam a 32 proteínas distintas e sete proteínas hipotéticas.

Os dados obtidos das proteínas identificadas, com expressão quantitativa diferenciada e com expressão exclusiva em um dos grupos de isolados estão listados nas tabelas 3 e 4 respectivamente. Das 50 proteínas identificadas, 40 apresentaram diferença de expressão quantitativa entre os grupos sensível e resistente, sendo que 24 apresentaram expressão aumentada no grupo de isolados sensíveis e 16 no grupo de isolados resistentes, respectivamente. Das proteínas identificadas que apresentaram expressão exclusiva, sete estavam presentes no grupo de isolados sensíveis (S1 e S2), enquanto apenas uma proteína estava presente em um dos grupos de isolados resistentes (R1). Duas das proteínas identificadas faziam parte de um mesmo “spot”, dessa forma não é possível fazer inferências sobre qual grupo de isolados apresentou expressão protéica aumentada ou reduzida.

Tabela 3 - Identificação dos “spots” protéicos, com diferença quantitativa de expressão ($p < 0,05$) entre os isolados de *L. (L.) chagasi* resistentes e sensíveis à miltefosina, por MS e MS/MS.

I.D. ^a	Nome da proteína	A.R. ^b	Número de acesso ^c	Seqüência de peptídeos identificados	% cobertura	Mascot – score protéico ^d	pI (exp/teor)	MM kDa (exp/teor)
1	Profilin [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,53	gi 146096265	KFFGLQCGTDGDCKY	8	57	5,27 / 5,43	7,5 / 16,42
4	Trypanothione-dependent glyoxylase I [<i>L. infantum</i>]	-1,51	gi 146101409	KHDEAYGHIAIGVEDVKE	11	121	5,12 / 4,69	7,9 / 15,72
5	Ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor, putative [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-2,10	gi 146081834	K.VKPNEESWTWVLK.E KEHPSTLAQQQSLFDIKI	15	57	5,96 / 6,74	11,1 / 21,62
6	Hypothetical protein [<i>L. infantum</i>]	+1,43	gi 146099283	RISGLHQVTELGSELVRD KSNPGYQEPIPDSEVTEQERR KTYPLPAGALKK	17	123	6,18 / 9,59	13,3 / 22,04
7	Eukaryotic initiation factor 5a [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,19	gi 146088631	RLEDQAPSTHNVVFPVKT KEVLVVVVSAMGTEQVLQTKN + Oxidation (M)	27	168	4,90 / 4,83	17,8 / 17,98
8	Peroxidoxin [<i>L. infantum</i> JPCM5]	+2,26	gi 146086967	R.DYGVLIIEESGIALR.G R.HSTINDLPVGR.N	11	166	5,66 / 6,43	20,0 / 25,58
9	14-3-3 protein-like protein [<i>L. infantum</i>]	+1,63	gi 146104107	RYYAEIDSGDGQRQ KATDVANSSLAPTHPIRL	10	149	4,95 / 4,79	28,6 / 29,83
11	14-3-3 protein-like protein [<i>L. infantum</i>]	-2,16	gi 146104107	RYYAEIDSGDGQRQ KATDVANSSLAPTHPIRL	10	138	5,02 / 4,79	31 / 29,83
12	Biotin/lipoate protein ligase-like protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,16	gi 146094843	KEELVPVLPVICGLACRL RLPGGRDPEELTAVSLNSWGHLKV RHTDGTLEDLSAEYLF	20	169	6,65 / 6,07	31,2 / 28,95
13	Hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]	+1,22	gi 146089123	RFELVIPDVEVLGQRR	4	98	5,62 / 5,36	32,8 / 33,33
14	Serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit [<i>L. infantum</i>]	+3,32	gi 146091731	KICGDIHQYYDLIRL KVKFPENFFILRG KHQFELICRA RINVYFDESAGGRY	10	108	5,76 / 5,51	36,1 / 35,11
17	Beta-tubulin [<i>L. infantum</i>]	-1,72	gi 146097634	KGHYTEGAELIDSVLDVCRK RFPGQLNSDLRK KLAVNLVPPFRL	11	199	5,32 / 4,71	37,2 / 50,34
18	Hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,49	gi 146096921	RSGDYAGAQQIYDHLARE REYDSICPLDDLRE	9	62	5,33 / 5,06	40,1 / 32,98

I.D. ^a	Nome da proteína	A.R. ^b	Número de acesso ^c	Seqüência de peptídeos identificados	% cobertura	Mascot – score protéico ^d	pl (exp/teor)	MM kDa (exp/teor)
19	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,61	gi 146093990	RVPTPDVSVVDLTFRA KIVSWYDNEWGYSHRV	7	116	5,30 / 9,06	41 / 39,33
	Adenine aminohydrolase, putative [<i>L. infantum</i> JPCM5]		gi 146084767	RVTHAEPFFDPQGHLCRG RHLSEEECFALVRD	7	68	5,30 / 5,15	41 / 41,33
20	Glutamine synthetase, putative [<i>L. infantum</i>]	-2,85	gi 146070878	KIPWILVLAECYLPSGEPTRD RAENGLVVIHQYIDRL KDIVFYGSENNERL RRPAGDADPYLVTSRL	12	214	5,88 / 6,45	42,8 / 55,50
22	Hypothetical protein [<i>L. infantum</i>]	+1,31	gi 146105064	KAFTDALAASGARD RDWKDEAANEVARS KLQSQVFPDVSTFFRF RWFTGVGSPIRH RHPEWVDMVVFRE	10	177	5,34 / 5,17	43,2 / 41,31
23	Isocitrate dehydrogenase [<i>L. infantum</i>]	-1,51	gi 146098081	RHPEWVDMVVFRE + Oxidation (M) RFPETSAYGVKPVSLGERSL KWGYALAERE	11	179	5,62 / 5,43	44 / 46,58
24	Protein disulfide isomerase [<i>L. infantum</i>]	+1,26	gi 146102742	KGFPPTYIFRN KFPFVVDVFERR	3	80	5,66 / 5,42	47,3 / 52,77
25	Protein disulfide isomerase [<i>L. infantum</i>]	+1,26	gi 146102742	KGFPPTYIFRN KFPFVVDVFERR	3	98	5,58 / 5,42	47,5 / 52,77
26	Eukaryotic initiation factor 4a [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,85	gi 146075141	R.HNLIQGLVLSPTR.E	3	76	6,14 / 5,83	46,5 / 45,37
27	Elongation factor 1-alpha [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-2,13	gi 146083153	KSVFTIIDAPGHRD KIGGIGTVPVGRV	5	76	6,22 / 9,03	51 / 49,50
28	Carboxypeptidase, putative (metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32) [<i>L. infantum</i>]	-2,55	gi 146098078	KSLQQVKPGYIRV RVDADVCYPLHVILRY RATGETLNPEYLRR	7	75	5,75 / 5,44	53 / 57,45
29	Elongation factor 1-alpha [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-2,10	gi 146083153	RGITIDIALWKF KSVFTIIDAPGHRD REHALLAFTLGVKQ RFIPIGWQGDNMIER.S + Oxidation (M) KIGGIGTVPVGRV	13	231	6,50 / 9,03	51 / 49,50

I.D. ^a	Nome da proteína	A.R. ^b	Número de acesso ^c	Seqüência de peptídeos identificados	% cobertura	Mascot – score protéico ^d	pl (exp/teor)	MM kDa (exp/teor)
30	Beta tubulin [<i>L. infantum</i> JPCM5]	+1,29	gi 146078079	RINVYFDESAGGRY RFPGQLNSDLRK RKLAVNLVPPFRL KLAVNLVPPFRL RLHFFMMGFAPLTSRG RYLTASALFRG RVGEQFTGMFRR RIFNVLGDAIDQRG	14	352	4,93 / 4,74	53 / 50,33
31	ATPase beta subunit, putative [<i>L. infantum</i> JPCM5]	+1,32	gi 146088806	KGHGGFSVFAGVGERT RDVEGQNVLLFIDNIFRF	8	315	5,27 / 5,14	55 / 56,49
33	Calreticulin, putative [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,51	gi 146095452	KDLHGESAYWLMFGPDTCGSSTRL	5	85	4,71 / 4,58	59,4 / 45,15
34	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [<i>L. major</i>]	-1,33	gi 157877932	KEGSTLHLIGLLSDGGVHSRD RVHVLYDGRD RYDADWSIVERG KGNVLPPLTSHLSPVPVFIGGAGLDPRV	11	161	5,52 / 5,21	62,5 / 60,90
35	Chaperonin containing t-complex protein, putative [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,77	gi 146096377	RELHEQEQEYFRS RAFADALESHIPINLALNSGLDPIRA	6	84	5,21 / 5,04	64,8 / 59,99
36	Glucose-regulated protein 78, putative [<i>Leishmania infantum</i>]	+1,85	gi 146091930	KNAVVTVPAYFNDAQRQ KSQIFSTYQDNQPSVLIQVFEGERG	5	133	5,26 / 5,08	68,9 / 71,99
37	Paraflagellar rod protein 1 [<i>L. infantum</i>]	+1,88	gi 51704749	RSQLDATQLAQVPTRT KEHLEYFRM	3	113	5,56 / 5,30	71,4 / 69,60
38	Guanylate kinase, putative [<i>L. infantum</i>]	-1,44	gi 146097711	R.NDNALNAVYFFITAPR.E	7	101	6,37 / 6,00	22 / 23,17
40	Alpha tubulin [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-3,63	gi 146080653	RCIFLDLEPTVVDEVRT	4	57	5,30 / 6,78	32,2 / 36,93
41	Prostaglandin f2-alpha synthase [<i>L. infantum</i>]	-2,11	gi 112383456	KLGVYIDLYLIHWPRG	5	69	6,25 / 6,78	34,8 / 30,74
42	Elongation factor 2 [<i>L. infantum</i>]	+3,49	gi 146103554	RKIWCYGPDNRG RGUIIGEENRPGTPIYNVRA KSKLEPFTFQRR	3	66	6,29 / 5,77	34,2 / 94,94
43	NADP-dependent alcohol dehydrogenase, putative [<i>L. infantum</i> JPCM5]	+1,46	gi 146087070	KTPTFGGYS DHVVVRE KLALVGMPEHAHPPLDPRR KISIECINEAYERM	15	151	6,42 / 5,96	41,8 / 39,12

I.D. ^a	Nome da proteína	A.R. ^b	Número de acesso ^c	Seqüência de peptídeos identificados	% cobertura	Mascot – score protéico ^d	pl (exp/teor)	MM kDa (exp/teor)
44	Eukaryotic initiation factor 4a [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,48	gi 146075141	RGIYSYGFEKPSSIQQRA RHNLIQGLVLSPTRE KFCETFVGGTRV	9	211	6,26 / 5,83	46,4 / 45,36
45	Glutamine synthetase [<i>L. infantum</i>]	-1,72	gi 146070878	RAENGLEVIHQYIDRL KDIVFYGSENNERL	5	74	5,99 / 6,45	42,8 / 55,50
47	Glucose-regulated protein 78 [<i>L. infantum</i>]	+1,75	gi 146091930	RITPSVVAFTDAERL KNAVVTVPAYFNDAQRQ KFDLSGIPPAPRG	5	127	5,31 / 5,08	68,7 / 71,99
48	Glucose-regulated protein 78 [<i>L. infantum</i>]	+2,52	gi 146091930	RITPSVVAFTDAERL KNAVVTVPAYFNDAQRQ KFDLSGIPPAPRG	5	232	5,35 / 5,08	68,7 / 71,99
49	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative [<i>L. infantum</i> JPCM5]	-1,43	gi 146093964	KVSNNAVVTCPAYFNDAQRQ KDAAGTIAGLNIVRV RGVNPDEAVALGAATLGGVLRG	7	156	5,69 / 6,00	65,9 / 69,32
50	Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor [<i>L. infantum</i>]	-1,68	gi 146104321	KIQSIHSLLPALNHVVRS RAAVQEGIVAGGGTALLRA RYVNMFEAGIIDPTRV	8	120	5,53 / 5,33	61,3 / 59,66

^a I.D. = identificação do “spot protéicos”. ^b A.R. = abundância relativa (razão entre a %Vol dos “spots” com expressão protéica aumentada pela %Vol dos “spots” com expressão protéica reduzida – os sinais (+ ou -) indicam a relação entre o grupo de isolados com fenótipo resistente versus o grupo de isolados com fenótipo sensível). ^c Os Números de acesso correspondem ao código identificador obtido no NCBI GenInfo. ^d Mascot score protéico com significância estatística ($p < 0,05$) na homologia e identidade da proteína. As proteínas com $p < 0,05$ e razão de abundância > 2 foram destacadas de cinza.

Tabela 4 - Identificação dos “spots” protéicos, presentes exclusivamente nos isolados de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina, por MS e MS/MS.

I.D. ^a	Nome da proteína	F ^b	Número de acesso ^c	Seqüência de peptídeos identificados	% cobertura	Mascot – score protéico ^d	pI (exp/teor)	MM kDa (exp/teor)
55	Calpain-like cysteine peptidase, putative [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	S [†]	gi 146081508	KWAFYNDTTNYQMLVKV + Oxidation (M)	13	63	4,82 / 7,70	10,4 / 13,04
57	Hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]	S [†]	gi 146081233	KIYVLYFFNTFYRG RVLAGEELESNGPRPKV	13	99	4,78 / 4,63	26,5 / 22,56
60	Hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]	S [†]	gi 146076237	KKPISEGYALWDRE RQIGVVQQLVRA RSIEVHPLANTFRE	9	133	4,89 / 4,72	42,8 / 39,31
62	Alpha-tubulin [<i>L. (L.) chagasi</i>]	S [†]	gi 71840353	RSLDIERPSYTNVNRL RLIGQVVSSLTASLRF RFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRI	10	77	5,53 / 4,89	52,2 / 50,56
69	Alpha tubulin [<i>L. (L.) chagasi</i>]	S [†]	gi 71840353	RLIGQVVSSLTASLRF	3	70	5,47 / 4,89	34 / 50,56
72	Hypothetical protein [<i>L. infantum</i> JPCM5]	S [†]	gi 146086976	KISPESLAELNALGDALRL	4	76	5,53 / 5,17	60,2 / 48,70
74	Mannose-1-phosphate guanyltransferase [<i>L. infantum</i> JPCM5]	S [†]	gi 146086987	KYGVVVYSPQNYQIERF KFIPSLVHGNRE	6	79	6,00 / 5,70	42,2 / 42,10
76	Beta-tubulin [<i>L. infantum</i>]	R [‡]	gi 146097634	RINVYFDESAGGRY RFPGQLNSDLRK KLAVNLVFPFRL RYLTASALFRG	9	137	5,21 / 4,71	53 / 50,34

^a I.D. = identificação do “spot” protéicos. ^b F = fenótipo do isolado. R = resistente à miltefosina. S = sensível à miltefosina. [†] “spot” protéico presente nos dois isolados do grupo resistente (R1 e R2) ou sensível (S1 e S2) à miltefosina. [‡] “spot” presente em apenas um dos isolados do grupo resistente (R1 ou R2) ou sensível (S1 ou S2) à miltefosina. ^c Os Números de acesso correspondem ao código identificador obtido no NCBI GenInfo. ^d Mascot score protéico com significância estatística (p<0,05) na homologia e identidade da proteína.

As tabelas 3 e 4 também mostram o número de acesso do NCBI GenInfo e os valores de massa molecular e ponto isoelétrico experimental (calculado pelo software ImageMaster) e teórico (obtido do NCBI nr) para as proteínas identificadas. Os valores de MM e pI estimados pelo gel bidimensional mostram uma boa correlação com os valores preditos (índice de correlação de Spearman de $r=0,86$ / $p<0,0001$ e $r=0,68$ e $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 14), embora algumas discrepâncias tenham sido observadas. Essas discrepâncias podem ser explicadas pela ocorrência de fragmentação protéica e/ou pela presença de isoformas, como pode ser observado pela presença do mesmo produto gênico de tubulinas em “spots” distintos (“spots” 17 / 76 e 62 / 69).

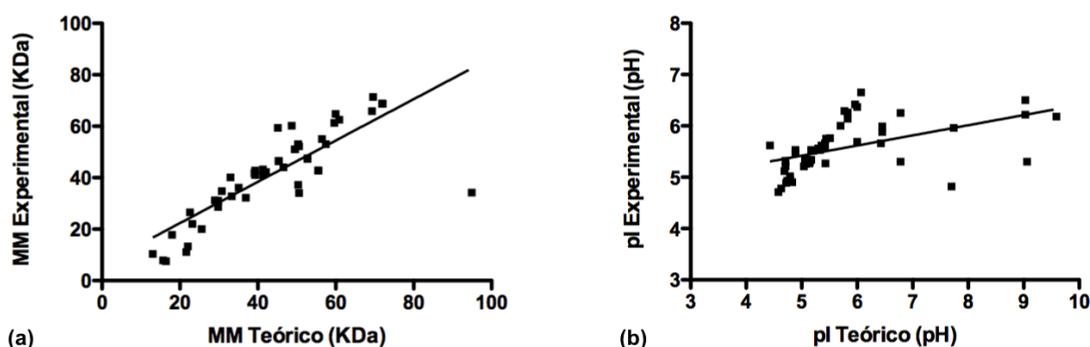


Figura 14 - Análise de correlação entre os valores experimentais e teóricos de massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas identificadas dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi*. (a) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de MM (Spearman $r = 0,86$, $p<0,0001$). (b) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de pI (Spearman $r = 0,68$, $p<0,0001$).

Para facilitar a análise funcional, as proteínas identificadas foram agrupadas em categorias funcionais de acordo com as anotações dos processos biológicos obtidas dos bancos de dados do Gene Ontology e KEGG Orthology (tabela 5). Pode-se observar que 18,4% e 20,9% das proteínas identificadas nos grupos de isolados sensíveis e resistentes, respectivamente, integram a classe de proteínas com atividade chaperona e/ou de dobramento protéico, sendo esta categoria a mais freqüente. A proporção das demais categorias funcionais para os grupos de isolados sensíveis e resistentes foram, respectivamente: (1) proteínas associadas ao citoesqueleto (14,3% e 14%), (2) metabolismo de carboidratos (12,2% e 11,6%), (3)

síntese protéica (12,2% e 14%), (4) metabolismo de aminoácidos (4,1% e 4,7%), (5) metabolismo de nucleosídeos, nucleotídeos ou ácido nucléico (4,1% e 4,7%), (6) processos de detoxificação/antioxidação (4,1 e 4,7%), (7) crescimento e morte celular (4,1% e 4,7), (8) proteólise (4,1% e 2,3%), (9) processos de modificações protéicas (2% e 2,3%), (10) síntese de ATP (2% e 2,3%), e (11) desfosforilação (2% e 2,3%). As proteínas com função desconhecida nos processos biológicos representaram 16,3% e 11,6% do total de proteínas identificadas nos grupos de isolados sensíveis e resistentes, respectivamente.

Tabela 5 – Classificação funcional das proteínas identificadas por MS. As categorias funcionais foram definidas de acordo com as anotações dos processos biológicos dos bancos de dados do Gene Ontology e KEGG Orthology.

Categorias	Número de proteínas identificadas (%) ^a	
	Isolados sensíveis	Isolados resistentes
<i>Protein folding/chaperons</i>	9 (18,4%)	9 (20,9%)
Protein disulfide isomerase	2	2 (+)
Calreticulin, putative	1 (+)	1
Chaperonin containing t-complex protein, putative	1 (+)	1
Glucose-regulated protein 78, putative	3	3 (+)
Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative	1 (+)	1
Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor	1 (+)	1
<i>Protein modification process</i>	1 (2%)	1 (2,3%)
Biotin/lipoate protein ligase-like protein	1 (+)	1
<i>Protein synthesis</i>	6 (12,2%)	6 (14%)
Eukaryotic initiation factor 5a	1 (+)	1
Eukaryotic initiation factor 4a	2 (+)	2
Elongation factor 1-alpha	2 (+)	2
Elongation factor 2	1	1 (+)
<i>Proteolysis</i>	2 (4,1%)	1 (2,3%)
Carboxypeptidase, putative (metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32)	1 (+)	1
Calpain-like cysteine peptidase, putative	1	---
<i>Carbohydrate metabolism</i>	6 (12,2%)	5 (11,6%)
Trypanothione-dependent glyoxylase I	1 (+)	1
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	1 (+)	1
Isocitrate dehydrogenase	1 (+)	1
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	1 (+)	1

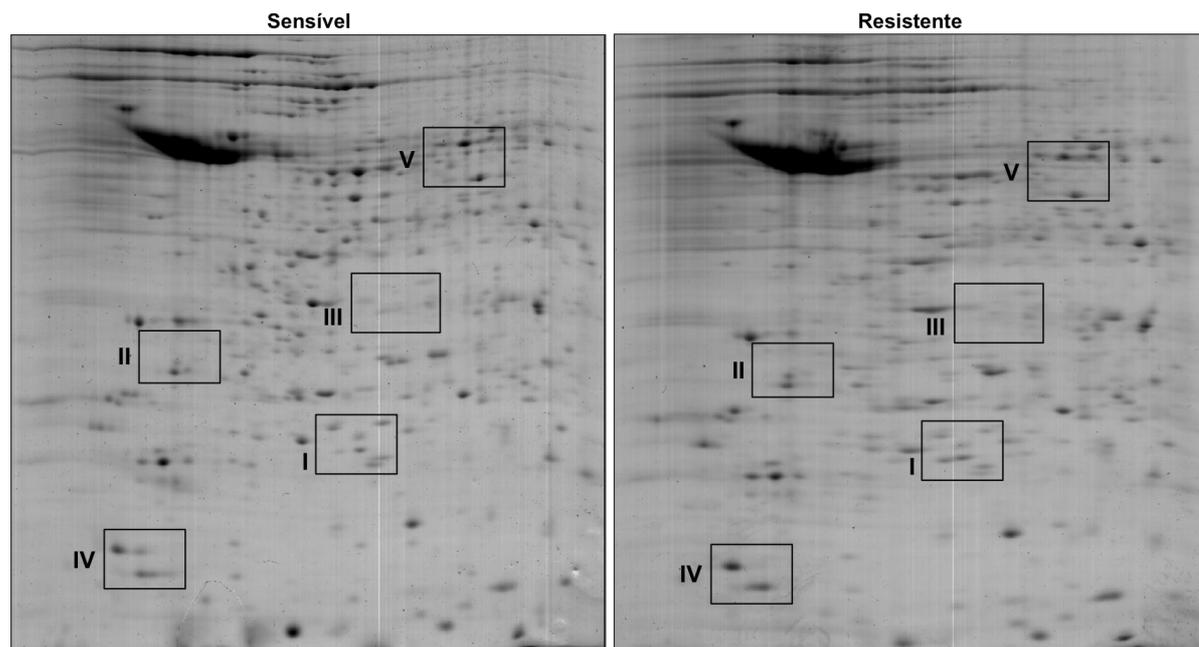
Categorias	Número de proteínas identificadas (%) ^a	
	Isolados sensíveis	Isolados resistentes
NADP-dependent alcohol dehydrogenase, putative	1	1 (+)
Mannose-1-phosphate guanyltransferase	1	---
Amino acid metabolism	2 (4,1%)	2 (4,7%)
Glutamine synthetase, putative	2 (+)	2
Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	2 (4,1%)	2 (4,7%)
Adenine aminohydrolase, putative	1 (+)	1
Guanylate kinase, putative	1 (+)	1
Antioxidant/detoxification	2 (4,1%)	2 (4,7%)
Peroxidoxin	1	1 (+)
Prostaglandin f2-alpha synthase	1 (+)	1
Cytoskeleton associated	7 (14,3%)	6 (14%)
Profilin	1 (+)	1
Beta-tubulin	2 (±)	3 (±)
Paraflagellar rod protein 1	1	1 (+)
Alpha tubulin	3 (+)	1
ATP synthesis	1 (2%)	1 (2,3%)
ATPase beta subunit, putative	1	1 (+)
Dephosphorylation	1 (2%)	1 (2,3%)
Serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit	1	1 (+)
Cell Growth and Death	2 (4,1%)	2 (4,7%)
14-3-3 protein-like protein	2 (±)	2 (±)
Unknown biological process	8 (16,3%)	5 (11,6%)
Ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor, putative	1 (+)	1
Hypothetical protein	7 (±)	4 (±)
Total de proteínas	49	43

^a A porcentagem para cada categoria funcional, foi calculada considerando apenas às proteínas identificadas. (+) indica expressão protéica aumentada no grupo de isolados assinalado. (±) indica que a proteína (presente em mais de um "spot") apresentou expressão aumentada em um dos grupos de isolados (S ou R) e aumento de expressão no outro grupo.

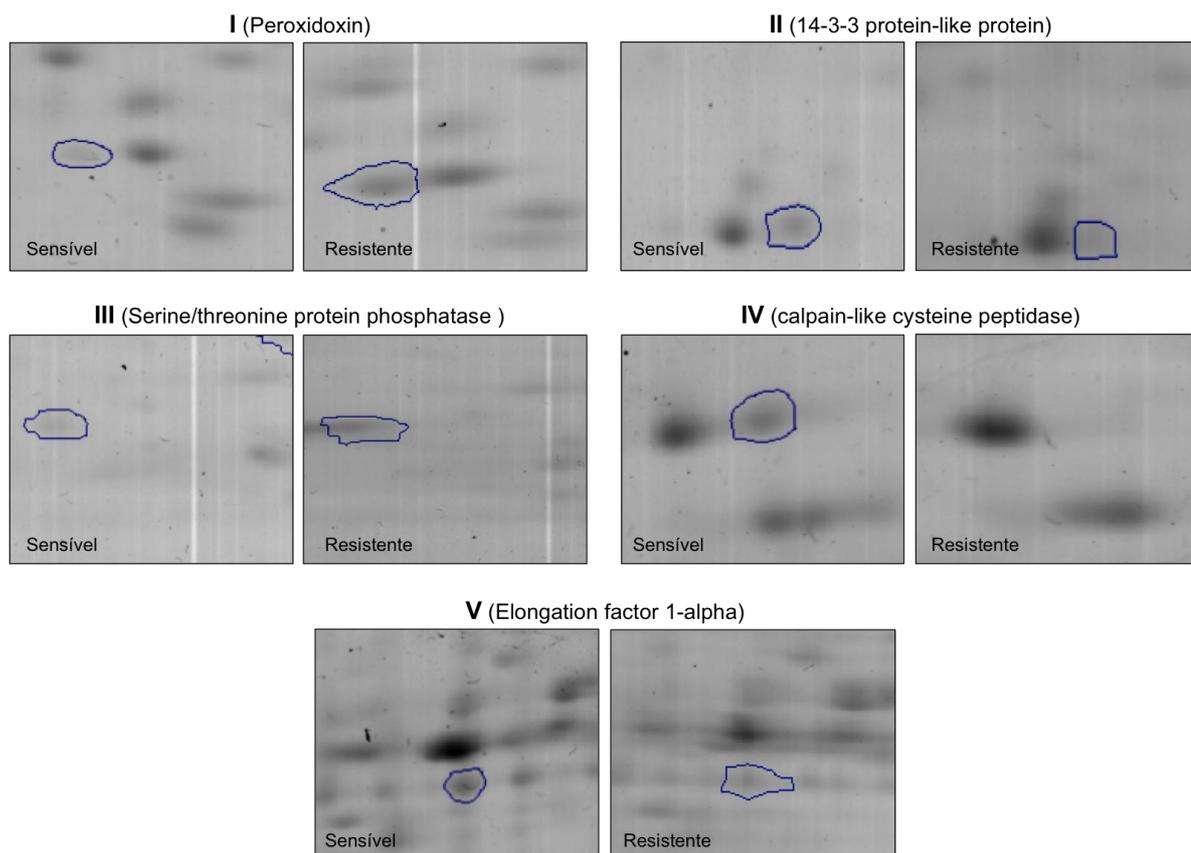
Das proteínas identificadas, apenas aquelas que apresentaram diferença de expressão quantitativa com abundância relativa maior que 2 (proteínas destacadas na Tabela 3) e aquelas que apresentaram diferença qualitativa na expressão protéica (Tabela 4), foram selecionadas para busca (PubMed) do seu provável envolvimento no mecanismo de resistência à drogas. A utilização do critério de abundância relativa maior que 2 foi baseada em trabalhos da mesma área de

pesquisa na literatura (DRUMMELSMITH *et al.*, 2004; VERGNES *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008).

Foram pesquisadas 20 proteínas, das quais cinco foram destacadas com funções que poderiam estar relacionadas com fenótipo de susceptibilidade à miltefosina dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* analisados. Destas, uma proteína foi exclusiva do grupo de isolados sensíveis (calpain-like cysteine peptidase) e as outras quatro apresentaram expressão protéica quantitativa diferenciada entre os isolados (14-3-3 protein-like protein, serine/threonine protein phosphatase, peroxidoxin, e elongation factor 1-alpha). A figura 15 mostra em detalhes a expressão diferenciada destas proteínas nos grupos de isolados.



(a)



(b)

Figura 15 - Comparação entre os perfis protéicos dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina. (a) Géis representativos do grupo de isolados sensíveis e resistentes, destacando as regiões com os “spots” possivelmente relacionados com o mecanismo de resistência à miltefosina. (b) “Zoom” das regiões destacadas na parte “a” da figura, mostrando a diferença na expressão protéica entre os isolados dos grupos sensíveis e resistentes.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Devido às dificuldades relacionadas ao controle do vetor e à falta de uma vacina efetiva, o controle das leishmanioses baseia-se principalmente na quimioterapia. Entretanto, o tratamento da leishmaniose visceral conta com poucas opções terapêuticas, que incluem os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e mais recentemente a miltefosina. A miltefosina é uma droga de administração oral com ação anti-*leishmania*, que tem apresentado elevada taxa de cura em áreas endêmicas de LV na Índia (SUNDAR *et al.*, 2002a). Contudo, os resultados obtidos de um estudo clínico realizado no Brasil pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou que apenas cerca de 50% dos pacientes portadores de leishmaniose visceral evoluíram para cura após o tratamento com miltefosina. Estudos posteriores revelaram que a maioria dos isolados dos pacientes que apresentaram falha terapêutica eram resistentes *in vitro* à miltefosina, sugerindo que a falha ao tratamento poderia ser devido à resistência do parasita a droga (comunicação pessoal – Lemos, E.M.).

Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na resistência de *Leishmania (L.) chagasi* à miltefosina este estudo comparou o perfil de expressão protéica de isolados de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes *in vitro* à miltefosina, obtidos de pacientes portadores de LV antes do tratamento com miltefosina, que apresentaram ou não falha terapêutica.

Para identificar proteínas diferencialmente expressas entre as formas promastigotas dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina foi utilizada a abordagem proteômica por eletroforese bidimensional. Embora o estágio evolutivo de amastigota seja o responsável pela infecção nos hospedeiros mamíferos, estudos proteômicos comparativos entre as duas formas evolutivas do parasita revelaram que somente uma pequena quantidade de proteínas, variando de 3 a 10%, são expressas especificamente no estágio amastigota. (EL FAKHRY *et al.*, 2002; BENTE *et al.*, 2003; NUGENT *et al.*, 2004; MCNICOLL *et al.*, 2006; WALKER *et al.*, 2006). Considerando a observação acima e devido à facilidade de cultivo para obtenção de material protéico em quantidade suficiente para as análises, e à dificuldade de obter formas amastigotas livres de contaminação com proteínas da

célula hospedeira (macrófagos), o estágio evolutivo promastigota foi selecionado para a realização desse estudo.

As proteínas obtidas de formas promastigotas dos isolados de *L. (L.) chagasi*, em fase logarítmica tardia de crescimento, foram separadas por eletroforese bidimensional. Os géis obtidos apresentaram alta resolução na faixa de pH 4 a 7, resolvendo em média 414, 425 e 493 “spots” protéicos no grupo de isolados da cepa padrão (MHOM/BR/74/PP75), e nos grupos de isolados clínicos resistentes e sensíveis, representando 5,2%, 5,3% e 6,2% das proteínas preditas no genoma de *Leishmania* spp., respectivamente. Esses valores foram menores do que aqueles obtidos por alguns estudos proteômicos prévios que detectaram cerca de 25% a 46% dos ORFs preditos para *Leishmania* spp. Essa diferença no número de “spots” detectados pode ser justificada pelo fato de que nestes estudos foram utilizados, diferentes gradientes de pH em “IPG strips” de faixa estreita para cobrir uma ampla faixa de pH (EL FAKHRY *et al.*, 2002; BENTE *et al.*, 2003; DRUMMELSMITH *et al.*, 2003; NUGENT *et al.*, 2004) ou realizado um método de pré-fracionamento da amostra antes da focalização isoeletrica para reduzir a complexidade do extrato protéico bruto (FOUCHER, PAPADOPOULOU e OUELLETTE, 2006; MCNICOLL *et al.*, 2006; BROBEY e SOONG, 2007). Outro fator que pode ter contribuído para o menor número de “spots” detectados neste trabalho foi a técnica de coloração empregada, uma vez que os trabalhos citados acima utilizaram corantes fluorescentes (sypro ruby ou sypro orange) ou coraram pelo método da prata, que apresentam sensibilidade 10 vezes maior (1 ng) que o método do Coomassie Coloidal (10 ng), utilizado em nosso trabalho. Contudo, os estudos proteômicos de *Leishmania* que utilizaram condições semelhantes à empregada em nosso estudo, detectaram quantidades semelhantes de “spots”, variando de 490 a 641 “spots” (CUERVO *et al.*, 2007; MOJTAHEDI *et al.*, 2008; PAAPE *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que as porcentagens de 5,2%, 5,3% e 6,2% dos ORFs preditos para *Leishmania*, obtidas neste estudo podem estar superestimadas, considerando a ocorrência de modificações pós-traducionais e de processamento protéico, as quais podem ser evidenciadas pela ocorrência de um mesmo produto gênico em diferentes “spots” (observar os números de acesso na tabela 3 e 4 correspondentes às proteínas: disulfide isomerase, glucose-regulated protein 78,

eukaryotic initiation factor 4a, elongation factor 1-alpha, glutamine synthetase, beta e alpha-tubulin e 14-3-3 protein-like protein).

Como já foi descrito nos resultados, dentre os “spots” detectados na análise das imagens dos géis bidimensionais, 80 apresentaram expressão diferenciada entre os isolados clínicos com sensibilidade variada à miltefosina. Desses, 48 “spots” estavam presentes em todos os isolados clínicos, apresentando apenas diferença quantitativa, 18 “spots” estavam presentes exclusivamente no grupo de isolados sensíveis e um “spot” estava presente exclusivamente no grupo de isolados resistentes à miltefosina. Esses dados, portanto, sugerem que o fenótipo resistente à miltefosina é acompanhado de uma menor expressão protéica. A observação de que cinco das seis proteínas identificadas dentro da categoria funcional de síntese protéica apresentaram maior expressão protéica no grupo de isolados sensíveis à miltefosina corrobora esta hipótese. Os demais “spots” selecionados eram exclusivos de cada grupo de isolado (S1 ou S2 ou R1 ou R2), sugerindo uma possível função individual no fenótipo de sensibilidade à miltefosina.

Todos os “spots” com expressão protéica diferenciada foram submetidos a análise por espectrometria de massas para identificação das proteínas. Como a espécie *L. (L.) chagasi* ainda não possui seu genoma seqüenciado, a identificação das proteínas selecionadas baseou-se na busca em banco de dados das espécies de *Leishmania* com genoma seqüenciado (*L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) brasiliensis* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>), priorizando a espécie *L. (L.) infantum*, uma vez que a espécie *L. (L.) chagasi* tem sido considerada por alguns autores como sinonímia da *L. (L.) infantum* (LUKES *et al.*, 2007). A identificação baseada na busca em banco de dados de espécies relacionadas tem sido empregada com sucesso para outras espécies de *Leishmania* spp., que não tinham ou ainda não tem seu genoma completamente seqüenciado (DRUMMELSMITH *et al.*, 2003; NUGENT *et al.*, 2004; DEA-AYUELA, RAMA-INIGUEZ e BOLAS-FERNANDEZ, 2006). Utilizando essa estratégia, dos 80 “spots” selecionados, 49 foram identificados, o que corresponde a 61,3% de sucesso na identificação.

Os 49 “spots” identificados correspondiam a 32 proteínas distintas e sete proteínas hipotéticas, as quais foram distribuídas em 12 categorias funcionais diferentes, de acordo com as anotações dos processos biológicos do GO e KO. As proteínas identificadas foram relacionadas com as categorias de: proteínas com atividade chaperona ou de dobramento; proteínas envolvidas em processos de modificação; síntese de proteínas; proteólise; metabolismo de carboidrato, aminoácido ou de nucleosídeo, nucleotídeo e ácido nucléico; detoxificação / anti-oxidante; associada ao citoesqueleto; síntese de ATP; desfosforilação; e crescimento e morte celular. Apesar de alguns estudos experimentais terem reportado que a miltefosina atua em parasitas *Leishmania* spp. interferindo no metabolismo de lipídios (CHAUDHURI *et al.*, 1982; WASSEF *et al.*, 1985; LUX *et al.*, 1996; LUX *et al.*, 2000; SANTA-RITA *et al.*, 2000; LIRA *et al.*, 2001; ZUFFEREY e MAMOUN, 2002; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006b), neste trabalho não foram identificadas proteínas relacionadas com o metabolismo de lipídios.

Embora a resistência à miltefosina em linhagens experimentais de *Leishmania* spp. tenha sido atribuída principalmente à redução no acúmulo intracelular da droga, por meio da redução do nível do translocador com atividade flipase LdMT/LbMT e da sua subunidade β LdRos3/LbRos3 (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2003a; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2003b; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006a; SANCHEZ-CANETE *et al.*, 2009) ou do aumento na quantidade de transportadores com atividade flopase ABC (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2001), neste estudo também não foi identificada nenhuma proteína relacionada com transportadores de fosfolípidos. Uma possível explicação para não termos detectado essas proteínas de membrana seria o fato de serem altamente hidrofóbicas e não terem sido solubilizadas no tampão de lise utilizado na etapa de extração protéica e conseqüentemente não foram detectadas no gel. Portanto, estudos futuros ainda são necessários para identificação de proteínas de membrana.

As proteínas identificadas que apresentaram diferença de expressão com abundância relativa maior que 2 ou que eram exclusivas de um dos grupos de isolados de *L. (L.) chagasi*, as quais totalizavam 20, foram submetidas à procura, em banco de dados (PubMed), por associações com mecanismos de resistência a drogas. Dessas, cinco proteínas foram selecionadas como potenciais biomarcadores

de resistência à miltefosina (14-3-3 protein-like protein, serine/threonine protein phosphatase, peroxidoxin, calpain-like cisteína peptidase e elongation factor 1-alpha).

Quatro dessas proteínas (14-3-3 protein-like protein, serina/treonina fosfatase, peroxidoxin, calpain-like cisteína peptidase) apresentam funções previamente relatadas no processo de morte celular programada semelhante a apoptose, que tem sido relacionado ao mecanismo de ação anti-*Leishmania* da miltefosina (PARIS *et al.*, 2004; VAN DER SANDEN *et al.*, 2004; VERMA e DEY, 2004).

A proteína 14-3-3 é parte de uma família conservada de proteínas ácidas diméricas com massa molecular relativa de 30 kDa e se apresenta em diferentes isoformas. Essas proteínas ao se ligarem a fosfoproteínas participam do controle de diversos processos celulares como metabolismo, transdução de sinal, controle do ciclo celular, tráfico de proteínas, transcrição, resposta ao stress e apoptose. O controle da morte celular programada ocorre pelo “seqüestro” do agente pró-apoptótico BAD e dos agentes anti-apoptóticos Raf-1 e KSR-1 pela proteína 14-3-3 (para revisão, consultar a referência Dougherty e Morrison (2004)). Contudo, as proteínas Raf-1 e KSR-1 apresentam participação mais efetiva no controle do ciclo celular, fazendo com que a proteína 14-3-3 atue principalmente como um bloqueador da apoptose. Dessa forma, o aumento da expressão dessa proteína sugere um aumento na proteção contra a apoptose. Entretanto, nossos resultados mostram que o grupo de isolados resistentes à miltefosina apresentou uma menor quantidade da proteína 14-3-3 (-2,16) em comparação com o grupo sensível. Resultados semelhantes também foram relatados para a expressão da proteína 14-3-3 em linhagens celulares transformadas de tumores primários de origem epitelial, incluindo câncer de mama e de estômago e carcinoma hepatocelular, os quais apresentaram níveis significativamente reduzidos ou até mesmo negligenciáveis da isoforma 14-3-3 σ (PRASAD *et al.*, 1992; OSTERGAARD *et al.*, 1997; MELIS e WHITE, 1999; NACHT *et al.*, 1999; IWATA *et al.*, 2000; VERCOUTTER-EDOUART *et al.*, 2001).

O estudo proteômico realizado por Vergnes e colaboradores (2007), apesar de observar uma expressão aumentada da proteína 14-3-3 no isolado clínico de *L. (L.) donovani* resistente aos antimoniais (III e V) e à miltefosina, verificou que o isolado

sensível transfectado com 14-3-3 não apresentou qualquer aumento de resistência ao Sb(III) e Sb(V) e ao processo de morte celular programada. Entretanto, esses autores não avaliaram a sensibilidade do isolado sensível transfectado em relação à miltefosina.

É importante ressaltar que uma outra isoforma da proteína 14-3-3 com expressão aumentada no grupo de isolados resistentes foi identificada em nosso estudo, contudo a abundância relativa (+1,63) não atingiu o critério para a selecionarmos como uma proteína relevante.

Como a ligação da proteína 14-3-3 com seus ligantes é dependente de fosforilação, as interações dessa proteína são em sua maior parte reguladas por cinases e fosfatases, que irão modular o estado de fosforilação das proteínas alvos (DOUGHERTY e MORRISON, 2004). A análise proteômica realizada nesse estudo identificou uma fosfatase, a serina/treonina fosfatase, com expressão proteica aumentada no grupo de isolados resistentes à miltefosina (+3,32). A enzima serina/treonina fosfatase pode regular a via da apoptose desfosforilando o sítio de ligação da cinase Raf-1 e da proteína “scaffold” KSR1 com a proteína 14-3-3. Dessa forma as proteínas Raf-1 e KSR1 se desligam da proteína 14-3-3, tornando-se ativas (ORY *et al.*, 2003) e bloqueando a apoptose. Nesse contexto, sugere-se que o grupo de isolados resistentes seria menos susceptível à apoptose, por apresentar maior quantidade dessa fosfatase. Entretanto, a serina/treonina fosfatase também pode desfosforilar o agente pró-apoptótico BAD, liberando-o da proteína 14-3-3 (CHIANG *et al.*, 2003). Uma vez livre, a proteína BAD pode se translocar para a mitocôndria, provocando a liberação do citocromo c, ou se ligar e neutralizar o efeito anti-apoptótico das proteínas Bcl2 e Bcl-XL, induzindo a apoptose (YANG *et al.*, 1995; ZHA *et al.*, 1996). Dessa forma, sugere-se que os isolados com maior expressão da enzima serina/treonina fosfatase seriam mais susceptíveis aos eventos apoptóticos. Essa dualidade na resposta das proteínas 14-3-3 e serina/treonina fosfatase na regulação da apoptose dificulta interpretar o papel dessas proteínas nos fenótipos de sensibilidade à miltefosina dos isolados analisados.

A cisteína peptidase semelhante a calpaína, encontrada apenas no grupo de isolados sensíveis à miltefosina nas análises realizadas neste estudo, é outra

proteína relacionada com a apoptose. A família das calpaínas consiste de proteínas com atividade cisteíno protease, dependente de cálcio, que participam de uma variedade de processos celulares, incluindo o remodelamento do citoesqueleto, via de transdução de sinais e apoptose (para revisão consultar a referência Goll et al. (2003)). A compreensão do papel das calpaínas no processo de apoptose é complexo devido a sua ostensiva habilidade de clivar caspases e outras proteínas que regulam a progressão da apoptose. Alguns estudos demonstraram que a clivagem das caspases 7 e 9 pela calpaína as tornam inativas, regulando negativamente o desencadeamento da apoptose (CHUA, GUO e LI, 2000). Por outro lado, Nakagawa e Yuan (2000) mostraram que a apoptose pode ser positivamente regulada pela atividade da m-calpaína, que converte a pró-caspase-12 em sua forma ativa e converte a proteína anti-apoptótica Bcl-XI em uma molécula pró-apoptótica.

Estudo experimental utilizando inibidores de calpaína demonstrou que a calpaína modula positivamente a progressão da apoptose em *Leishmania (L.) donovani*. (PARIS *et al.*, 2004). Considerando esses resultados e o fato de que nenhum homólogo de caspase foi identificado em eucariotos unicelulares (ARAVIND, DIXIT e KOONIN, 2001), podemos sugerir que a expressão reduzida da calpaína no grupo de isolado resistentes, encontrada neste trabalho, pode estar relacionada com o fenótipo de resistência à apoptose, e conseqüentemente à miltefosina. Vergnes e colaboradores (2007), em um estudo proteômico comparativo entre isolados clínicos de *L. (L.) donovani*, também verificaram uma expressão aumentada da calpaína em um isolado sensível aos antimoniais e à miltefosina. Estes autores também verificaram que o isolado sensível apresentou maior susceptibilidade à apoptose quando comparado com o isolado resistente. Entretanto, a transfecção do constructo da calpaína no isolado resistente provocou um inesperado aumento da resistência à miltefosina.

Outra proteína que pode estar relacionada com o fenótipo de resistência à miltefosina em parasitas *Leishmania* identificado neste estudo é a peroxirredoxina. As proteínas peroxirredoxinas são encontradas em uma grande variedade de organismos e estão envolvidas em processos de detoxificação, transdução de sinais e diferenciação celular (HOFMANN, HECHT e FLOHE, 2002). Na família *Trypanosomatidae* as enzimas peroxirredoxinas atuam como antioxidantes,

consumindo diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (WILKINSON *et al.*, 2000). As espécies reativas de oxigênio reagem prontamente com proteínas, DNA e lipídios, resultando em uma variedade de eventos intracelulares como transdução de sinal, homeostase do sistema de oxidação/redução, apoptose e o controle de infecção por patógenos (NATHAN e SHILOH, 2000; DROGE, 2002; WOOD, POOLE e KARPLUS, 2003). Harder e colaboradores (2006) mostraram que o aumento da expressão de peroxirredoxina mitocondrial em *L. (L.) donovani* foi acompanhado de proteção contra a morte celular programada. Dessa forma, podemos sugerir que a maior expressão protéica da peroxirredoxina, no grupo de isolados clínicos resistentes à miltefosina (+2,26) encontrada neste trabalho, pode ser associada a uma modulação negativa na progressão da apoptose.

Estudos experimentais mostraram que apesar da atividade anti-*Leishmania* da miltefosina ser independente da resposta imune de células T e B para eliminar o parasita (MURRAY e DELPH-ETIENNE, 2000; ESCOBAR *et al.*, 2001) esta droga apresenta atividade co-estimulatória sobre células T e macrófagos, aumenta a síntese de IFN- γ e GM-CSF por células mononucleares do sangue periférico e de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais e reverte a resposta imunológica do tipo Th2 para Th1 por meio da indução de IL-12 (VEHMEYER *et al.*, 1991; HOCHHUTH *et al.*, 1992; EUE *et al.*, 1995; ZEISIG *et al.*, 1995; SAFA *et al.*, 1997; WADHONE *et al.*, 2009). Dessa forma, proteínas do parasita que interferem na modulação da resposta imune podem favorecer a sobrevivência do parasita no hospedeiro.

Neste estudo foi detectada a proteína fator de alongação-1alfa (EF-1 α), a qual atua na comunicação com a célula hospedeira. Nandan e Reiner (2005) reportaram que durante a infecção por *L. (L.) donovani*, a proteína EF-1 α ativa a fosfatase SHP-1, que por sua vez suprime a síntese de óxido nítrico, substância com reconhecida atividade leishmanicida. Entretanto, em nosso estudo o grupo de isolados resistentes à miltefosina apresentou, em dois “spots”, menor expressão dessa proteína (-2,13 e -2,10).

Outra proteína que pode atuar na modulação da resposta imune é a proteína fator eucarioto de iniciação 4A (eIF4A). Essa proteína foi previamente relatada em parasitas *Leishmania* spp. como indutora de resposta celular do tipo Th1 e de IL-12 e como potencializadora da atividade citotóxica de células natural killer (NK) (SKEIKY *et al.*, 1998; BORGES *et al.*, 2001), contribuindo, portanto, para a eliminação do parasita no hospedeiro. Ao contrário dos resultados obtidos no estudo proteômico de Singh e colaboradores (2008), o grupo de isolados sensíveis à miltefosina avaliado nesse estudo, apresentou expressão aumentada da proteína eIF4A (+1,85 e +1,48) em relação aos isolados resistentes. Contudo, em nosso estudo proteômico essa proteína não atingiu o critério de abundância relativa maior que 2 para ser selecionada como uma proteína relevante. Apesar de algumas proteínas identificadas neste trabalho não terem atingido o valor do critério de abundância relativa estipulado para serem consideradas proteínas relevantes, o dado acima demonstra que estas não podem ser descartadas, e é necessário que estas proteínas sejam melhor investigadas em trabalhos futuros.

Neste estudo proteômico comparativo entre isolados de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina 3 proteínas hipotéticas com diferença qualitativa na expressão protéica (presente no grupo de isolados sensíveis) também foram identificadas. Devido ao fato dessas proteínas não apresentarem similaridade significativa com nenhuma proteína conhecida, elas devem ser cuidadosamente estudadas, uma vez que podem possuir função particular em vários processos celulares importantes associados com a resistência a drogas.

Este trabalho, portanto, contribuiu para determinar pela primeira vez o perfil protéico de isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina. A comparação dos proteomas desses isolados possibilitou identificar proteínas com diferença de expressão que podem estar associadas com o fenótipo de resistência a essa droga. Algumas dessas proteínas (14-3-3 protein-like, serine/threonine protein phosphatase, peroxidoxin, calpain-like cisteína peptidase e elongation factor 1-alpha) podem ser consideradas potenciais biomarcadores de resistência à miltefosina. As funções dessas proteínas sugerem que o mecanismo de resistência dos isolados analisados pode estar relacionado com menor susceptibilidade à morte celular

programada. Entretanto, estudos futuros são necessários para avaliar o papel dessas proteínas no mecanismo de resistência do parasita à droga.

***CONSIDERAÇÕES FINAIS E
CONCLUSÕES***

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Por meio da abordagem proteômica comparativa entre os isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina foi possível:

- Localizar 80 “spots” diferencialmente expressos entre os isolados analisados;
- Identificar por análise de espectrometria de massas 49 “spots” diferencialmente expressos entre os isolados analisados;
- Destacar proteínas (peroxidoxin, calpain-like cisteína peptidase) provavelmente relacionadas com o fenótipo de resistência à miltefosina;
- Sugerir que o fenótipo de resistência à miltefosina está associado com a menor susceptibilidade à morte celular programada.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

Comparar o proteoma dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina usando técnica quantitativa de melhor linearidade, como, por exemplo, DIGE (Differential Gel Electrophoresis).

Analisar a susceptibilidade dos isolados clínicos sensíveis e resistentes à miltefosina quanto à morte celular programada.

Investigar, por meio de análise de transfecção, a influência das proteínas destacadas nesse estudo (14-3-3 protein-like protein, serina/treonina fosfatase, peroxidoxin, calpain-like cisteína peptidase e elongation factor 1-alpha) sobre a resistência à miltefosina.

Analisar um número maior de isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina.

Analisar proteínas altamente hidrofóbicas nos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* como, por exemplo, translocadores de fosfolipídios em membrana.

Comparar o fosfoproteoma dos isolados clínicos de *L. (L.) chagasi* sensíveis e resistentes à miltefosina, com o objetivo de compreender as possíveis vias de sinalização envolvidas nos mecanismos de resistência a essa droga.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ADLER-MOORE, J. e PROFFITT, R. T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **J Antimicrob Chemother**, v.49 Suppl 1, Feb, p.21-30. 2002.

ADLER-MOORE, J. e PROFFITT, R. T. Effect of tissue penetration on AmBisome efficacy. **Curr Opin Investig Drugs**, v.4, n.2, Feb, p.179-185. 2003.

ANDERSON, L. e SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v.18, n.3-4, Mar-Apr, p.533-537. 1997.

ANDRADE, H. M., MURTA, S. M., CHAPEAUROUGE, A., PERALES, J., NIRDE, P. e ROMANHA, A. J. Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi resistance to Benznidazole. **J Proteome Res**, v.7, n.6, Jun, p.2357-2367. 2008.

ARAVIND, L., DIXIT, V. M. e KOONIN, E. V. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. **Science**, v.291, n.5507, Feb 16, p.1279-1284. 2001.

AZZOUZ, S., MAACHE, M., GARCIA, R. G. e OSUNA, A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.96, n.1, Jan, p.60-65. 2005.

BENTE, M., HARDER, S., WIESGIGL, M., HEUKESHOVEN, J., GELHAUS, C., KRAUSE, E., CLOS, J. e BRUCHHAUS, I. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite Leishmania donovani. **Proteomics**, v.3, n.9, Sep, p.1811-1829. 2003.

BERMAN, J. Miltefosine to treat leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, v.6, n.8, Jul, p.1381-1388. 2005.

BERN, C., MAGUIRE, J. H. e ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.10, p.e313. 2008.

BESTEIRO, S., WILLIAMS, R. A., COOMBS, G. H. e MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **Int J Parasitol**, v.37, n.10, Aug, p.1063-1075. 2007.

BHATTACHARYA, S. K., SINHA, P. K., SUNDAR, S., THAKUR, C. P., JHA, T. K., PANDEY, K., DAS, V. R., KUMAR, N., LAL, C., VERMA, N., SINGH, V. P., RANJAN, A., VERMA, R. B., ANDERS, G., SINDERMANN, H. e GANGULY, N. K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.196, n.4, Aug 15, p.591-598. 2007.

BIO-RAD. **2-D electrophoresis for proteômics. Bulletin 2651**. 64. Disponível em <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2651.pdf>. Acesso em: 15 de nov. 2010.

- BORGES, M. M., CAMPOS-NETO, A., SLEATH, P., GRABSTEIN, K. H., MORRISSEY, P. J., SKEIKY, Y. A. e REED, S. G. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. **Infect Immun**, v.69, n.9, Sep, p.5270-5277. 2001.
- BORST, P., ZELCER, N. e VAN HELVOORT, A. ABC transporters in lipid transport. **Biochim Biophys Acta**, v.1486, n.1, Jun 26, p.128-144. 2000.
- BOSCH, I., DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., WU, R. L., FURLONG, S. T. e CROOP, J. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. **Biochemistry**, v.36, n.19, May 13, p.5685-5694. 1997.
- BOYD-KIMBALL, D., POON, H. F., LYNN, B. C., CAI, J., PIERCE, W. M., JR., KLEIN, J. B., FERGUSON, J., LINK, C. D. e BUTTERFIELD, D. A. Proteomic identification of proteins specifically oxidized in *Caenorhabditis elegans* expressing human A β (1-42): implications for Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v.27, n.9, Sep, p.1239-1249. 2006.
- BRACHWITZ, H. e VOLLGRAF, C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. **Pharmacol Ther**, v.66, n.1, Apr, p.39-82. 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2007.
- BREISER, A., KIM, D. J., FLEER, E. A., DAMENZ, W., DRUBE, A., BERGER, M., NAGEL, G. A., EIBL, H. e UNGER, C. Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice. **Lipids**, v.22, n.11, Nov, p.925-926. 1987.
- BROBEY, R. K. e SOONG, L. Establishing a liquid-phase IEF in combination with 2-DE for the analysis of *Leishmania* proteins. **Proteomics**, v.7, n.1, Jan, p.116-120. 2007.
- BURK, K., DAVID, M., JUNGE, K. e SINDERMANN, H. Overview on the clinical development of miltefosine solution (Miltex) for the treatment of cutaneous breast cancer. **Drug Today**, v.30, p.59-72. 1994.
- CARTER, K. C., HUTCHISON, S., HENRIQUEZ, F. L., LEGARE, D., OUELLETTE, M., ROBERTS, C. W. e MULLEN, A. B. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.1, Jan, p.88-95. 2006.
- CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., ALVAR, J. e BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11, Nov, p.873-882. 2007.

- CHAUDHURI, G., CHATTERJEE, T. K. e BANERJEE, A. B. Growth factor requirements for in vitro growth of *Leishmania donovani*. **Indian J Med Res**, v.76, Jul, p.157-163. 1982.
- CHIANG, C. W., KANIES, C., KIM, K. W., FANG, W. B., PARKHURST, C., XIE, M., HENRY, T. e YANG, E. Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. **Mol Cell Biol**, v.23, n.18, Sep, p.6350-6362. 2003.
- CHUA, B. T., GUO, K. e LI, P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. **J Biol Chem**, v.275, n.7, Feb 18, p.5131-5135. 2000.
- CORDWELL, S. J., NOUWENS, A. S. e WALSH, B. J. Comparative proteomics of bacterial pathogens. **Proteomics**, v.1, n.4, Apr, p.461-472. 2001.
- CROFT, S. L. e COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v.19, n.11, Nov, p.502-508. 2003.
- CROFT, S. L. e ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100 Suppl 1, Dec, p.S4-S8. 2006.
- CROFT, S. L., NEAL, R. A., PENDERGAST, W. e CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem Pharmacol**, v.36, n.16, Aug 15, p.2633-2636. 1987.
- CROFT, S. L., SNOWDON, D. e YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkylsophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J Antimicrob Chemother**, v.38, n.6, Dec, p.1041-1047. 1996.
- CROFT, S. L., SUNDAR, S. e FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.1, Jan, p.111-126. 2006.
- CUERVO, P., DE JESUS, J. B., JUNQUEIRA, M., MENDONCA-LIMA, L., GONZALEZ, L. J., BETANCOURT, L., GRIMALDI, G., JR., DOMONT, G. B., FERNANDES, O. e CUPOLILLO, E. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Mol Biochem Parasitol**, v.154, n.1, Jul, p.6-21. 2007.
- CUNHA, A. M. e CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem, *Leishmania chagasi*. **O Hospital**, v.11, p.3-9. 1937.
- DEA-AYUELA, M. A., RAMA-INIGUEZ, S. e BOLAS-FERNANDEZ, F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. **Proteomics**, v.6, n.14, Jul, p.4187-4194. 2006.

- DI GIORGIO, C., FARAUT-GAMBARELLI, F., IMBERT, A., MINODIER, P., GASQUET, M. e DUMON, H. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v.44, n.1, Jul, p.71-76. 1999.
- DOUGHERTY, M. K. e MORRISON, D. K. Unlocking the code of 14-3-3. **J Cell Sci**, v.117, n.Pt 10, Apr 15, p.1875-1884. 2004.
- DROGE, W. The plasma redox state and ageing. **Ageing Res Rev**, v.1, n.2, Apr, p.257-278. 2002.
- DRUMMELSMITH, J., BROCHU, V., GIRARD, I., MESSIER, N. e OUELLETTE, M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Mol Cell Proteomics**, v.2, n.3, Mar, p.146-155. 2003.
- DRUMMELSMITH, J., GIRARD, I., TRUDEL, N. e OUELLETTE, M. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. **J Biol Chem**, v.279, n.32, Aug 6, p.33273-33280. 2004.
- DURAND, R., PAUL, M., PRATLONG, F., RIVOLLET, D., DUBREUIL-LEMAIRE, M. L., HOUIN, R., ASTIER, A. e DENIAU, M. *Leishmania infantum*: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.8, Aug, p.2141-2143. 1998.
- DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C. e CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol Int**, v.54, n.2, Jun, p.119-122. 2005.
- EIBL, H. e UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. **Cancer Treat Rev**, v.17, n.2-3, Sep, p.233-242. 1990.
- EL FADILI, K., DRUMMELSMITH, J., ROY, G., JARDIM, A. e OUELLETTE, M. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. **Exp Parasitol**, v.123, n.1, Sep, p.51-57. 2009.
- EL FAKHRY, Y., OUELLETTE, M. e PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v.2, n.8, Aug, p.1007-1017. 2002.
- ENGEL, J. Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country - TDR - pharmaceutical industry (Zentaris). **TDR News**, v.68, p.5. 2002.
- ESCOBAR, P., MATU, S., MARQUES, C. e CROFT, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop**, v.81, n.2, Feb, p.151-157. 2002.

- ESCOBAR, P., YARDLEY, V. e CROFT, S. L. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.6, Jun, p.1872-1875. 2001.
- EUE, I., ZEISIG, R. e ARNDT, D. Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U 937 cells. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.121, n.6, p.350-356. 1995.
- FOUCHER, A. L., PAPADOPOULOU, B. e OUELLETTE, M. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. **J Proteome Res**, v.5, n.7, Jul, p.1741-1750. 2006.
- GANGULY, N. K. Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. **TDR News**, n.68, p.2. 2002.
- GOAD, L. J., HOLZ, G. G., JR. e BEACH, D. H. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. **Mol Biochem Parasitol**, v.10, n.2, Feb, p.161-170. 1984.
- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W. e CONG, J. The calpain system. **Physiol Rev**, v.83, n.3, Jul, p.731-801. 2003.
- GORG, A., WEISS, W. e DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, n.12, Dec, p.3665-3685. 2004.
- GRADONI, L., SOTERIADOU, K., LOUZIR, H., DAKKAK, A., TOZ, S. O., JAFFE, C., DEDET, J. P., CAMPINO, L., CANAVATE, C. e DUJARDIN, J. C. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. **Trop Med Int Health**, v.13, n.10, Oct, p.1272-1276. 2008.
- GUINA, T., WU, M., MILLER, S. I., PURVINE, S. O., YI, E. C., ENG, J., GOODLETT, D. R., AEBERSOLD, R., ERNST, R. K. e LEE, K. A. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. **J Am Soc Mass Spectrom**, v.14, n.7, Jul, p.742-751. 2003.
- GYGI, S. P., ROCHON, Y., FRANZA, B. R. e AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol**, v.19, n.3, Mar, p.1720-1730. 1999.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, Apr, p.229-243. 2001.
- HARDER, S., BENTE, M., ISERMANN, K. e BRUCHHAUS, I. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryot Cell**, v.5, n.5, May, p.861-870. 2006.

- HOCHHUTH, C. H., VEHMEYER, K., EIBL, H. e UNGER, C. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. **Cell Immunol**, v.141, n.1, Apr 15, p.161-168. 1992.
- HOFMANN, B., HECHT, H. J. e FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biol Chem**, v.383, n.3-4, Mar-Apr, p.347-364. 2002.
- HOWARD, M. K., PHAROAH, M. M., ASHALL, F. e MILES, M. A. Human urine stimulates growth of Leishmania in vitro. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.85, n.4, Jul-Aug, p.477-479. 1991.
- IWATA, N., YAMAMOTO, H., SASAKI, S., ITOH, F., SUZUKI, H., KIKUCHI, T., KANETO, H., IKU, S., OZEKI, I., KARINO, Y., SATOH, T., TOYOTA, J., SATOH, M., ENDO, T. e IMAI, K. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v.19, n.46, Nov 2, p.5298-5302. 2000.
- JENSEN, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Curr Opin Chem Biol**, v.8, n.1, Feb, p.33-41. 2004.
- JHA, T. K., SUNDAR, S., THAKUR, C. P., BACHMANN, P., KARBWANG, J., FISCHER, C., VOSS, A. e BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.341, n.24, Dec 9, p.1795-1800. 1999.
- KAN, B., HABIBI, H., SCHMID, M., LIANG, W., WANG, R., WANG, D. e JUNGBLUT, P. R. Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. **Proteomics**, v.4, n.10, Oct, p.3061-3067. 2004.
- KOTHARI, H., KUMAR, P., SUNDAR, S. e SINGH, N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. **Parasitol Int**, v.56, n.1, Mar, p.77-80. 2007.
- KUHLENCORD, A., MANIERA, T., EIBL, H. e UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, n.8, Aug, p.1630-1634. 1992.
- LACHAUD, L., BOURGEOIS, N., PLOURDE, M., LEPROHON, P., BASTIEN, P. e OUELLETTE, M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. **Clin Infect Dis**, v.48, n.2, Jan 15, p.e16-22. 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-685. 1970.
- LAISON, R. e SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London. v.1. p.1-120. 1987.

- LAVERAN, A. e MESNIL, F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani*). Parasite d'une fièvre de l'Inde. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences**, v.137, p.957-961. 1903.
- LE FICHOUX, Y., ROUSSEAU, D., FERRUA, B., RUETTE, S., LELIEVRE, A., GROUSSON, D. e KUBAR, J. Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.3, Mar, p.654-658. 1998.
- LEE, N., BERTHOLET, S., DEBRABANT, A., MULLER, J., DUNCAN, R. e NAKHASI, H. L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death Differ**, v.9, n.1, Jan, p.53-64. 2002.
- LIRA, R., CONTRERAS, L. M., RITA, R. M. e URBINA, J. A. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **J Antimicrob Chemother**, v.47, n.5, May, p.537-546. 2001.
- LUKES, J., MAURICIO, I. L., SCHONIAN, G., DUJARDIN, J. C., SOTERIADOU, K., DEDET, J. P., KUHL, K., TINTAYA, K. W., JIRKU, M., CHOCHOLOVA, E., HARALAMBOUS, C., PRATLONG, F., OBORNIK, M., HORAK, A., AYALA, F. J. e MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.22, May 29, p.9375-9380. 2007.
- LUQUE-ORTEGA, J. R. e RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.4, Apr, p.1327-1332. 2007.
- LUX, H., HART, D. T., PARKER, P. J. e KLENNER, T. Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipid analogues. **Adv Exp Med Biol**, v.416, p.201-211. 1996.
- LUX, H., HEISE, N., KLENNER, T., HART, D. e OPPERDOES, F. R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v.111, n.1, Nov, p.1-14. 2000.
- MAIR, G., SHI, H., LI, H., DJIKENG, A., AVILES, H. O., BISHOP, J. R., FALCONE, F. H., GAVRILESCU, C., MONTGOMERY, J. L., SANTORI, M. I., STERN, L. S., WANG, Z., ULLU, E. e TSCHUDI, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v.6, n.2, Feb, p.163-169. 2000.
- MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**, v.2010, p.617521. 2010.
- MALTEZOU, H. C., SIAFAS, C., MAVRIKOU, M., SPYRIDIS, P., STAVRINADIS, C., KARPATIOS, T. e KAFETZIS, D. A. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. **Clin Infect Dis**, v.31, n.5, Nov, p.1139-1143. 2000.

- MCATEE, C. P., HOFFMAN, P. S. e BERG, D. E. Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques. **Proteomics**, v.1, n.4, Apr, p.516-521. 2001.
- MCCONVILLE, M. J., MULLIN, K. A., ILGOUTZ, S. C. e TEASDALE, R. D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, n.1, Mar, p.122-154; table of contents. 2002.
- MCNICOLL, F., DRUMMELSMITH, J., MULLER, M., MADORE, E., BOILARD, N., OUELLETTE, M. e PAPADOPOULOU, B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v.6, n.12, Jun, p.3567-3581. 2006.
- MELIS, R. e WHITE, R. Characterization of colonic polyps by two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v.20, n.4-5, Apr-May, p.1055-1064. 1999.
- MINODIER, P., PIARROUX, R., GARNIER, J. M., UNAL, D., PERRIMOND, H. e DUMON, H. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. **Pediatr Infect Dis J**, v.17, n.8, Aug, p.701-704. 1998.
- MOJTAHEDI, Z., CLOS, J. e KAMALI-SARVESTANI, E. *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Exp Parasitol**, v.119, n.3, Jul, p.422-429. 2008.
- MOORE, E. M. e LOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v.2, n.2, May, p.151-158. 2010.
- MURRAY, H. W. e DELPH-ETIENNE, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. **J Infect Dis**, v.181, n.2, Feb, p.795-799. 2000.
- NACHT, M., FERGUSON, A. T., ZHANG, W., PETROZIELLO, J. M., COOK, B. P., GAO, Y. H., MAGUIRE, S., RILEY, D., COPPOLA, G., LANDES, G. M., MADDEN, S. L. e SUKUMAR, S. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. **Cancer Res**, v.59, n.21, Nov 1, p.5464-5470. 1999.
- NAKAGAWA, T. e YUAN, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. **J Cell Biol**, v.150, n.4, Aug 21, p.887-894. 2000.
- NANDAN, D. e REINER, N. E. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. **Clin Immunol**, v.114, n.3, Mar, p.266-277. 2005.
- NATHAN, C. e SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.16, Aug 1, p.8841-8848. 2000.

- NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D. e EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, n.6, Jun, p.255-262. 1988.
- NICOLLE, C. Nouvelles acquisitions sur le Kala-azar : cultures, inoculations auchien, étiologie. **C R Acad Sci Paris**, v.146, p.498-499. 1908.
- NICOLLE, C. e COMTE, C. Origine Canine du Kala-azar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, p.299-301. 1908.
- NOVY, FREDERICK G. e MCNEAL, WARD J. THE CULTIVATION OF TRYPANOSOMA BRUCEI. A PRELIMINARY NOTE. **J Am Med Assoc**, v.XLI, n.21, November 21, 1903, p.1266-1268. 1903.
- NUGENT, P. G., KARSANI, S. A., WAIT, R., TEMPERO, J. e SMITH, D. F. Proteomic analysis of Leishmania mexicana differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v.136, n.1, Jul, p.51-62. 2004.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v.250, n.10, May 25, p.4007-4021. 1975.
- ORY, S., ZHOU, M., CONRADS, T. P., VEENSTRA, T. D. e MORRISON, D. K. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. **Curr Biol**, v.13, n.16, Aug 19, p.1356-1364. 2003.
- OSTERGAARD, M., RASMUSSEN, H. H., NIELSEN, H. V., VORUM, H., ORNTOFT, T. F., WOLF, H. e CELIS, J. E. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. **Cancer Res**, v.57, n.18, Sep 15, p.4111-4117. 1997.
- OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J. e PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat**, v.7, n.4-5, Aug-Oct, p.257-266. 2004.
- PAAPE, D., LIPPUNER, C., SCHMID, M., ACKERMANN, R., BARRIOS-LLERENA, M. E., ZIMNY-ARNDT, U., BRINKMANN, V., ARNDT, B., PLEISSNER, K. P., JUNGBLUT, P. R. e AEBISCHER, T. Transgenic, fluorescent Leishmania mexicana allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. **Mol Cell Proteomics**, v.7, n.9, Sep, p.1688-1701. 2008.
- PAGLIANO, P., CARANNANTE, N., ROSSI, M., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., FAELLA, F. S. e GAETA, G. B. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.2, Feb, p.229-233. 2005.

PARIS, C., LOISEAU, P. M., BORIES, C. e BREARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.3, Mar, p.852-859. 2004.

PEACOCK, C. S., SEEGER, K., HARRIS, D., MURPHY, L., RUIZ, J. C., QUAIL, M. A., PETERS, N., ADLEM, E., TIVEY, A., ASLETT, M., KERHORNOU, A., IVENS, A., FRASER, A., RAJANDREAM, M. A., CARVER, T., NORBERTCZAK, H., CHILLINGWORTH, T., HANCE, Z., JAGELS, K., MOULE, S., ORMOND, D., RUTTER, S., SQUARES, R., WHITEHEAD, S., RABBINOWITSCH, E., ARROWSMITH, C., WHITE, B., THURSTON, S., BRINGAUD, F., BALDAUF, S. L., FAULCONBRIDGE, A., JEFFARES, D., DEPLEDGE, D. P., OYOLA, S. O., HILLEY, J. D., BRITO, L. O., TOSI, L. R., BARRELL, B., CRUZ, A. K., MOTTRAM, J. C., SMITH, D. F. e BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet**, v.39, n.7, Jul, p.839-847. 2007.

PEREZ-VICTORIA, F. J., CASTANYS, S. e GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.8, Aug, p.2397-2403. 2003a.

PEREZ-VICTORIA, F. J., GAMARRO, F., OUELLETTE, M. e CASTANYS, S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **J Biol Chem**, v.278, n.50, Dec 12, p.49965-49971. 2003b.

PEREZ-VICTORIA, F. J., SANCHEZ-CANETE, M. P., CASTANYS, S. e GAMARRO, F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **J Biol Chem**, v.281, n.33, Aug 18, p.23766-23775. 2006a.

PEREZ-VICTORIA, F. J., SANCHEZ-CANETE, M. P., SEIFERT, K., CROFT, S. L., SUNDAR, S., CASTANYS, S. e GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist Updat**, v.9, n.1-2, Feb-Apr, p.26-39. 2006b.

PEREZ-VICTORIA, J. M., PEREZ-VICTORIA, F. J., PARODI-TALICE, A., JIMENEZ, I. A., RAVELO, A. G., CASTANYS, S. e GAMARRO, F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.9, Sep, p.2468-2474. 2001.

PHILLIPS, C. I. e BOGYO, M. Proteomics meets microbiology: technical advances in the global mapping of protein expression and function. **Cell Microbiol**, v.7, n.8, Aug, p.1061-1076. 2005.

POMORSKI, T., LOMBARDI, R., RIEZMAN, H., DEVAUX, P. F., VAN MEER, G. e HOLTHUIS, J. C. Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. **Mol Biol Cell**, v.14, n.3, Mar, p.1240-1254. 2003.

- PRASAD, G. L., VALVERIUS, E. M., MCDUFFIE, E. e COOPER, H. L. Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. **Cell Growth Differ**, v.3, n.8, Aug, p.507-513. 1992.
- RAGUENAUD, M. E., JANSSON, A., VANLERBERGHE, V., DEBORGGRAEVE, S., DUJARDIN, J. C., ORFANOS, G., REID, T. e BOELAERT, M. Epidemiology and clinical features of patients with visceral leishmaniasis treated by an MSF clinic in Bakool region, Somalia, 2004-2006. **PLoS Negl Trop Dis**, v.1, n.1, p.e85. 2007.
- RAKOTOMANGA, M., SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. e LOISEAU, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.7, Jul, p.2677-2686. 2005.
- RITTIG, M. G. e BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**, v.16, n.7, Jul, p.292-297. 2000.
- RYBCZYNSKA, M., LIU, R., LU, P., SHAROM, F. J., STEINFELS, E., PIETRO, A. D., SPITALER, M., GRUNICKE, H. e HOFMANN, J. MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. **Br J Cancer**, v.84, n.10, May 18, p.1405-1411. 2001.
- SAFA, O., PARKIN, S. M., MATTHEW, A. M. e BIBBY, M. C. Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocholine (HPC) in nude mice bearing MT-1 breast cancer xenografts. **Anticancer Res**, v.17, n.1A, Jan-Feb, p.37-43. 1997.
- SANCHEZ-CANETE, M. P., CARVALHO, L., PEREZ-VICTORIA, F. J., GAMARRO, F. e CASTANYS, S. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.4, Apr, p.1305-1313. 2009.
- SANTA-RITA, R. M., BARBOSA, H. S. e DE CASTRO, S. L. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v.100, n.1, Dec, p.187-190. 2006.
- SANTA-RITA, R. M., HENRIQUES-PONS, A., BARBOSA, H. S. e DE CASTRO, S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob Chemother**, v.54, n.4, Oct, p.704-710. 2004.
- SANTA-RITA, R. M., LIRA, R., BARBOSA, H. S., URBINA, J. A. e DE CASTRO, S. L. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.5, May, p.780-784. 2005.
- SANTA-RITA, R. M., SANTOS BARBOSA, H., MEIRELLES, M. N. e DE CASTRO, S. L. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v.75, n.2, Mar 25, p.219-228. 2000.

SEIFERT, K., MATU, S., JAVIER PEREZ-VICTORIA, F., CASTANYS, S., GAMARRO, F. e CROFT, S. L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int J Antimicrob Agents**, v.22, n.4, Oct, p.380-387. 2003.

SEIFERT, K., PEREZ-VICTORIA, F. J., STETTLER, M., SANCHEZ-CANETE, M. P., CASTANYS, S., GAMARRO, F. e CROFT, S. L. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. **Int J Antimicrob Agents**, v.30, n.3, Sep, p.229-235. 2007.

SERENO, D. e LEMESRE, J. L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. **Parasitol Res**, v.83, n.4, p.401-403. 1997.

SHARMA, S., SINGH, G., CHAVAN, H. D. e DEY, C. S. Proteomic analysis of wild type and arsenite-resistant *Leishmania donovani*. **Exp Parasitol**, v.123, n.4, Dec, p.369-376. 2009.

SINDERMANN, H., ENGEL, K. R., FISCHER, C. e BOMMER, W. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. **Clin Infect Dis**, v.39, n.10, Nov 15, p.1520-1523. 2004.

SINGH, G., CHAVAN, H. D. e DEY, C. S. Proteomic analysis of miltefosine-resistant *Leishmania* reveals the possible involvement of eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). **Int J Antimicrob Agents**, v.31, n.6, Jun, p.584-586. 2008.

SINGH, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Indian J Med Res**, v.123, n.3, Mar, p.411-422. 2006.

SINGH, V. K., JAYASWAL, R. K. e WILKINSON, B. J. Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. **FEMS Microbiol Lett**, v.199, n.1, May 15, p.79-84. 2001.

SKEIKY, Y. A., KENNEDY, M., KAUFMAN, D., BORGES, M. M., GUDERIAN, J. A., SCHOLLER, J. K., OVENDALE, P. J., PICHA, K. S., MORRISSEY, P. J., GRABSTEIN, K. H., CAMPOS-NETO, A. e REED, S. G. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **J Immunol**, v.161, n.11, Dec 1, p.6171-6179. 1998.

SOTO, J., ARANA, B. A., TOLEDO, J., RIZZO, N., VEGA, J. C., DIAZ, A., LUZ, M., GUTIERREZ, P., ARBOLEDA, M., BERMAN, J. D., JUNGE, K., ENGEL, J. e SINDERMANN, H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.38, n.9, May 1, p.1266-1272. 2004.

SOTO, J., REA, J., BALDERRAMA, M., TOLEDO, J., SOTO, P., VALDA, L. e BERMAN, J. D. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.78, n.2, Feb, p.210-211. 2008.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**, v.6, n.11, Nov, p.849-854. 2001.

SUNDAR, S., CHAKRAVARTY, J., RAI, V. K., AGRAWAL, N., SINGH, S. P., CHAUHAN, V. e MURRAY, H. W. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clin Infect Dis**, v.45, n.5, Sep 1, p.556-561. 2007.

SUNDAR, S. e CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**, v.123, n.3, Mar, p.345-352. 2006.

SUNDAR, S., GUPTA, L. B., MAKHARIA, M. K., SINGH, M. K., VOSS, A., ROSENKAIMER, F., ENGEL, J. e MURRAY, H. W. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. **Ann Trop Med Parasitol**, v.93, n.6, Sep, p.589-597. 1999.

SUNDAR, S., JHA, T. K., THAKUR, C. P., ENGEL, J., SINDERMANN, H., FISCHER, C., JUNGE, K., BRYCESON, A. e BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.347, n.22, Nov 28, p.1739-1746. 2002a.

SUNDAR, S., JHA, T. K., THAKUR, C. P., MISHRA, M., SINGH, V. R. e BUFFELS, R. Low-dose liposomal amphotericin B in refractory Indian visceral leishmaniasis: a multicenter study. **Am J Trop Med Hyg**, v.66, n.2, Feb, p.143-146. 2002b.

SUNDAR, S., MEHTA, H., SURESH, A. V., SINGH, S. P., RAI, M. e MURRAY, H. W. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. **Clin Infect Dis**, v.38, n.3, Feb 1, p.377-383. 2004.

SUNDAR, S., MORE, D. K., SINGH, M. K., SINGH, V. P., SHARMA, S., MAKHARIA, A., KUMAR, P. C. e MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, v.31, n.4, Oct, p.1104-1107. 2000.

SUNDAR, S., ROSENKAIMER, F., MAKHARIA, M. K., GOYAL, A. K., MANDAL, A. K., VOSS, A., HILGARD, P. e MURRAY, H. W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **Lancet**, v.352, n.9143, Dec 5, p.1821-1823. 1998.

THAKUR, C. P. e NARAYAN, S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v.98, n.2, Mar, p.129-138. 2004.

THAKUR, C. P., PANDEY, A. K., SINHA, G. P., ROY, S., BEHBEHANI, K. e OLLIARO, P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.90, n.3, May-Jun, p.319-322. 1996.

THAKUR, C. P., SINGH, R. K., HASSAN, S. M., KUMAR, R., NARAIN, S. e KUMAR, A. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer

modes of administration and precautions: a study of 938 cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.93, n.3, May-Jun, p.319-323. 1999.

THAKUR, C. P., SINHA, P. K., SINGH, R. K., HASSAN, S. M. e NARAIN, S. Miltefosine in a case of visceral leishmaniasis with HIV co-infection; and rising incidence of this disease in India. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.94, n.6, Nov-Dec, p.696-697. 2000.

UNGER, C.; MANIERA, T.; KAUFMANN-KOLLE, P.; EIBL, H. In vivo antileishmanial activity of hexadecylphosphocholine and other alkylphosphocholines. **Drugs of Today**, v.34, n.(Suppl. F), p.133. 1998.

VAN DER SANDEN, M. H., HOUWELING, M., DUIJSINGS, D., VAANDRAGER, A. B. e VAN GOLDE, L. M. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis is not the primary pathway in hexadecylphosphocholine-induced apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1636, n.2-3, Mar 22, p.99-107. 2004.

VAN HELLEMOND, J. J. e TIELENS, A. G. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v.85, n.1, Mar, p.135-138. 1997.

VEHMEYER, K., SCHEURICH, P., EIBL, H. e UNGER, C. Hexadecylphosphocholine-mediated enhancement of T-cell responses to interleukin 2. **Cell Immunol**, v.137, n.1, Oct 1, p.232-238. 1991.

VERCAUTEREN, F. G., ARCKENS, L. e QUIRION, R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids**, v.33, n.3, Sep, p.405-414. 2007.

VERCOUTTER-EDOUART, A. S., LEMOINE, J., LE BOURHIS, X., LOUIS, H., BOILLY, B., NURCOMBE, V., REVILLION, F., PEYRAT, J. P. e HONDERMARCK, H. Proteomic analysis reveals that 14-3-3sigma is down-regulated in human breast cancer cells. **Cancer Res**, v.61, n.1, Jan 1, p.76-80. 2001.

VERGNES, B., GOURLAL, B., GIRARD, I., SUNDAR, S., DRUMMELSMITH, J. e OUELLETTE, M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. **Mol Cell Proteomics**, v.6, n.1, Jan, p.88-101. 2007.

VERGOTE, D., BOUCHUT, A., SAUTIERE, P. E., ROGER, E., GALINIER, R., ROGNON, A., COUSTAU, C., SALZET, M. e MITTA, G. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. **Int J Parasitol**, v.35, n.2, Feb, p.215-224. 2005.

VERMA, N. K. e DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.8, Aug, p.3010-3015. 2004.

- VOLPINI, A. C., PASSOS, V. M., OLIVEIRA, G. C. e ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, v.90, n.1, Mar, p.31-37. 2004.
- WADHONE, P., MAITI, M., AGARWAL, R., KAMAT, V., MARTIN, S. e SAHA, B. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. **J Immunol**, v.182, n.11, Jun 1, p.7146-7154. 2009.
- WALKER, J., VASQUEZ, J. J., GOMEZ, M. A., DRUMMELSMITH, J., BURCHMORE, R., GIRARD, I. e OUELLETTE, M. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v.147, n.1, May, p.64-73. 2006.
- WASINGER, V. C., CORDWELL, S. J., CERPA-POLJAK, A., YAN, J. X., GOOLEY, A. A., WILKINS, M. R., DUNCAN, M. W., HARRIS, R., WILLIAMS, K. L. e HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v.16, n.7, Jul, p.1090-1094. 1995.
- WASSEF, M. K., FIORETTI, T. B. e DWYER, D. M. Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. **Lipids**, v.20, n.2, Feb, p.108-115. 1985.
- WHO. World Health Organization. Control of leishmaniasis. **Technical Report Series**, v.793, p.50-52. 2006.
- WHO. **World Health Organization. Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NDT), 2009.** Disponível em <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_visceral_2009.png>. Acesso em: 20 de nov. 2010.
- WIKIPEDIA. **Leishmaniasis.** Disponível em <<http://en.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis>>. Acesso em: 20 de nov. 2010.
- WILKINSON, S. R., TEMPERTON, N. J., MONDRAGON, A. e KELLY, J. M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v.275, n.11, Mar 17, p.8220-8225. 2000.
- WOOD, Z. A., POOLE, L. B. e KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v.300, n.5619, Apr 25, p.650-653. 2003.
- WYLLIE, S., VICKERS, T. J. e FAIRLAMB, A. H. Roles of trypanothione S-transferase and trypanothione peroxidase in resistance to antimonials. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.4, Apr, p.1359-1365. 2008.
- YANG, E., ZHA, J., JOCKEL, J., BOISE, L. H., THOMPSON, C. B. e KORSMEYER, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell**, v.80, n.2, Jan 27, p.285-291. 1995.

YARDLEY, V., CROFT, S. L., DE DONCKER, S., DUJARDIN, J. C., KOIRALA, S., RIJAL, S., MIRANDA, C., LLANOS-CUENTAS, A. e CHAPPUIS, F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, n.2, Aug, p.272-275. 2005.

ZEISIG, R., RUDOLF, M., EUE, I. e ARNDT, D. Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.121, n.2, p.69-75. 1995.

ZHA, J., HARADA, H., YANG, E., JOCKEL, J. e KORSMEYER, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). **Cell**, v.87, n.4, Nov 15, p.619-628. 1996.

ZUFFEREY, R. e MAMOUN, C. B. Choline transport in *Leishmania* major promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. **Mol Biochem Parasitol**, v.125, n.1-2, Nov-Dec, p.127-134. 2002.