



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURAIS**



**PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS EM ISOLADOS DE**  
***Leishmania* spp. COM RESISTÊNCIA NATURAL AO**  
**ÓXIDO NÍTRICO E AO TRIVALENTE**

**ALANA FREIRE DE AZEVEDO**

**2013**

**ALANA FREIRE DE AZEVEDO**

**PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS EM ISOLADOS DE  
*Leishmania* spp. COM RESISTÊNCIA NATURAL AO  
ÓXIDO NÍTRICO E AO TRIVALENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta P. M. Fernandes. Coorientador: Ricardo Scher

**São Cristóvão - SE**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

A994p

Azevedo, Alana Freire de

Perfis de ácidos graxos em isolados de *Leishmania* spp. Com resistência natural ao óxido nítrico e ao trivalente / Alana Freire de Azevedo / orientadora Roberta P. M. Fernandes. – São Cristóvão, 2013.

82 f. ; il.

Dissertação (mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) –Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

1. *Leishmania chagasi*. 2. *L. amazonensis*. 3. Ácidos graxos.  
4. Ésteres. I. Fernandes, Roberta P. M. I. Título

CDU: 606:616.928.5

**ALANA FREIRE DE AZEVEDO**

**PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS EM ISOLADOS DE *Leishmania* spp.  
COM RESISTÊNCIA NATURAL AO ÓXIDO NÍTRICO E AO  
TRIVALENTE**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2013

Profa. Amélia Ribeiro de Jesus – UFS

Prof. Camila Indiani de Oliveira – Fiocruz, BA

Profa. Dra. Roberta P. M. Fernandes  
UFS  
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio incondicional, sobretudo, minha mãe e meu noivo, Alice Azevedo e Lucas Macêdo.

.

Aos amigos por todo afeto e solidariedade, especialmente, Mayra Moura, Marília Pupo, Bruna Mayara, Micheli Luize, Camila Santana, Marcelinho Vilas Boas, Eduardo Nascimento e Kátia Soares.

À minha orientadora Dra. Roberta P. M. Fernandes pelo incansável encorajamento e simpatia.

A todas as equipes dos Laboratórios de Enzimologia (DFS, UFS), Biologia Celular e Molecular (DMO, UFS), Laboratório de Microbiologia do Solo (Embrapa) e Biologia Molecular (DME, UFS). Em especial, ao Dr. Ricardo Scher, ao Dr. Roque Pacheco e ao Dr. Marcelo Fernandes, pelo estímulo e pelas parcerias.

À Deus por tudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
Leishmanias e Leishmanioses.....	2
Aspectos imunológicos das Leishmanioses.....	6
Tratamento das Leishmanioses.....	7
Resistência ao Óxido Nítrico e ao Antimônio.....	10
Lipídeos e Ácidos Graxos como Biomarcadores.....	14
Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO I.....	26
Introdução.....	26
Métodos.....	28
Resultados.....	33
Discussão.....	41
Referências.....	43
CAPÍTULO II.....	48
Abstract.....	49
Introduction.....	50
Methods.....	52
Results.....	56
Discussion.....	64
References.....	65

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ATP</b> .....	Trifosfato de adenosina
<b>BAME</b> .....	Mix de éster metílicos de ácidos bacterianos
<b>B.O.D.</b> .....	Demanda bioquímica de oxigênio
<b>CD4+</b> .....	Linfócitos auxiliares ( <i>T helper</i> )
<b>CD8+</b> .....	Lnfócitos citotóxicos ( <i>célula killer</i> )
<b>CD25+</b> .....	Subtipo de células T regulatórias (CD4+)
<b>CG</b> .....	Cromatografia gasosa
<b>ELFA</b> .....	Ácidos graxos com ligação éster
<b>FAME</b> .....	Estéres metílicos de ácidos graxos
<b>FID</b> .....	Detector de ionização de chama
<b>GAPDH</b> .....	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GIPLS</b> .....	Glicosil inositol fosfolípido
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> .....	Interferon gama
<b>IgE</b> .....	Imunoglobulina E
<b>IL</b> .....	Interleucina
<b>iNOS</b> .....	Óxido nítrico sintase
<b>IV</b> .....	Valor indicador
<b>LTA</b> .....	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LV</b> .....	Leishmaniose Visceral

<b>MCS</b> .....	Estrutura da comunidade microbial
<b>MIDI/ MIDIFA</b> .....	Análise de ácidos graxos celulares totais
<b>MRPP</b> .....	Procedimento de permutação de resposta múltipla
<b>MS</b> .....	Espectrometria de massa
<b>MTT</b> .....	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
<b>NADPH</b> .....	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<b>NMS</b> .....	Escalonamento multidimensional não métrico
<b>NNN</b> .....	Meio Novy-MacNeal-Nicolle
<b>NO</b> .....	Óxido Nítrico
<b>PBS</b> .....	Tampão fostato-salina
<b>PL</b> .....	Fosfolipídios
<b>PLFA</b> .....	Ácidos graxos de fosfolipídios
<b>PUFA</b> .....	Ácidos graxos poliinsaturados
<b>SBF</b> .....	Soro fetal bovino
<b>SL</b> .....	Esfingolipídeo
<b>Th1</b> .....	Linfócito T auxiliar TH1
<b>Th2</b> .....	Linfócito T auxiliar TH2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> .....	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Tyr</b> .....	Tirosina

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Ciclo Biológico.....	3
Figura 2. Classificação dos subgêneros de <i>Leishmania</i> .....	4
Figura 3. Antimoniais trivalentes.....	8
Figura 4. Tratamentos de primeira linha para Leishmaniose Visceral.....	9
Figura 5. Medicamentos em ensaios clínicos para o tratamento de Leishmaniose Visceral.....	9
Figura 6. Formação do óxido nítrico a partir da arginina pela ação da iNOS.....	11
Figura 7. Representação dos prováveis sistemas responsáveis pela nitração dos resíduos de tirosina in vivo.....	14
Figura 8. Modelos genéricos de lipídeos.....	17

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Cromatograma GC-MS das amostras MIDI .....	35
Figura 2. Representação do NMS da distância das amostras de acordo com a composição MIDIFA separando os isolados resistentes ao antimônio/NO dos sensíveis.....	37
Figura 3. Representação gráfica do NMS da distância das amostras de acordo com a composição de MIDIFA agrupando os isolados quanto às espécies.....	38
Figura 4. Representação gráfica do NMS da distância das amostras de acordo com a composição MIDIFA agrupando os isolados quanto às espécies e também quanto à sensibilidade ao antimônio/ NO.....	39

### CAPÍTULO 2

Figure 1. GC-MS Chromatogram from the MIDI samples.....	58
Figure 2. NMS representation of sample distance according the MIDIFA composition separating the antimony resistant isolates and the sensitive ones .....	60

Figure 3. NMS graphic representation of sample distance according the MIDIFA composition grouping the isolates according to species .....61

Figure 4. NMS graphic representation of sample distance according the MIDIFA composition grouping the isolates according to species also NO/antimony susceptibility .....62

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. FAMEs Biomarcadores para alguns grupos microbianos específicos.....19

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Identificação de isolados de *L. chagasi* e *L. amazonensis* quanto aos fatores de resistência, NO e antimônio.....28

Tabela 2. Lista dos ésteres metílicos identificados resultantes da análise GC-MS de MIDI .....34

Tabela 3. Valores indicadores do MIDI quanto a susceptibilidade ao NO/ antimônio, bem como e como quanto as espécies .....40

Tabela 4. Resultados do MRPP das análises ELFA e PLFA de isolados de *L. chagasi* e *L. amazonensis* quanto à sensibilidade ao NO/ antimônio, quanto as espécies e ambos fatores.....41

### CAPÍTULO 2

Table 1. Identification of the *L. chagasi* e *L. amazonensis* isolates for resistance to factors, NO and antimony.....52

Table 2. List of identified methyl esters resulting from the GC-MS MIDI analysis.....57

Table 3. MIDI Indicator values as the NO susceptibility and as the species.....63

Table 4. MRPP results of ELFA and PLFA analysis of the *L. chagasi* and *L. amazonensis* isolates relating the sensibility to NO, the species and both characteristic.....63

## RESUMO

Ácidos graxos, especialmente aqueles de fosfolípidos (PLFA), são componentes essenciais das membranas biológicas que estão em proporção relativamente constante em condições naturais. No entanto, sob condições adversas de crescimento, como doenças, mudanças ambientais e exposição a substâncias químicas, pode ocorrer uma variação na proporção dos lípidos. A identificação destas modificações específicas pode revelar um biomarcador. Assim, os biomarcadores podem ajudar, por exemplo, na identificação de um mecanismo de virulência e de resistência a um agente quimioterápico particular. Portanto, um biomarcador específico pode levar a uma melhor decisão terapêutica, a respeito da indicação e escolha de drogas, tornando o tratamento mais eficaz. O objetivo deste estudo foi comparar os perfis de ácidos graxos de *L. chagasi* e *L. amazonensis* em isolados resistentes e sensíveis a antimônio (Glucantime®) e óxido nítrico (NO). Os lípidos totais foram extraídos a partir de formas promastigotas liofilizadas em fase tardia de crescimento logarítmico (50 mL células  $5 \times 10^8$ /mL). Foram estudados 2 isolados de *L. amazonensis* e 8 de *L. chagasi*. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram obtidos a partir de lípidos totais, lípidos e fosfolípidos éster ligados, respectivamente, pelas técnicas MIDI, ELFA e PLFA. Os FAMES foram analisados por espectrometria de massa e cromatografia gasosa. Diferenças nos perfis de ácidos graxos associadas a espécies ou resistência foram avaliadas por escalonamento multidimensional não métrico, procedimentos de permutação de respostas múltiplas e análises indicadoras de espécies, usando o PC-ORD 6.0. Anteriormente a essas análises, as massas molares individuais dos FAMES foram relativizadas por FAMES totais dentro de cada amostra. Os isolados resistentes e sensíveis ao NO e ao antimônio apresentaram diferentes perfis FAME-MIDI, independentemente da espécie. No entanto, os perfis de ELFA e PLFA não diferiram entre os isolados sensíveis e resistentes. O ácido graxo 18:1  $\delta 9c$  foi aumentado em isolados sensíveis ( $p < 0,001$ ), ao passo que um pico ainda não identificado mostrou a tendência oposta ( $p < 0,01$ ). Assim, podemos concluir que esses dois ácidos graxos são potenciais biomarcadores para sensibilidade e resistência ao NO e ao antimônio em *L. chagasi* e *L. amazonensis* e podem ajudar no diagnóstico terapêutico.

**Palavras chave:** *Leishmania chagasi*; *L. amazonensis*; FAMES.

## ABSTRACT

Fatty acids, especially those from phospholipids (PLFA), are essential membrane components, present in a relatively constant proportion in the biological membranes under natural conditions. However, under harmful growth conditions such as diseases, environmental changes and chemical exposure, the proportion of lipids may vary. Once these changes could be identified and reveal to be specific for such adverse situation, it could be used as a biomarker. Thus, the biomarkers can help, for example, to identify a virulence and resistance mechanism to a particular chemotherapeutic agent. Therefore, to make treatment more effective, a specific biomarker could lead to a better therapeutic decision, regarding candidate drugs and their indications. The objective of this study was to compare the fatty acid profiles of *L. chagasi* and *L. amazonensis* isolates resistant and sensitive to antimony (Glucantime®) and to nitric oxide (NO). We studied 2 isolates of *L. amazonensis* and 8 of *L. chagasi*. Total lipids were extracted from lyophilized promastigotes forms in late logarithmic growth phase (50 mL;  $5 \times 10^8$ /mL cells). Fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained from total lipids, ester-linked lipids and ester-linked phospholipids by MIDI, ELFA and PLFA techniques respectively. FAMES were analyzed by chromatography and mass spectrometry. Differences in FAME profiles associated with species or resistance were assessed by non-metric multidimensional scaling, multiresponse permutation procedures and indicator species analyses using PC-ORD 6.0. Previously to these analyses, molar masses of individual FAMES were relativized by FAMES totals within each sample. Isolates resistant and sensitive to NO and antimony had different MIDI-FAME profiles, regardless the species. However, neither ELFA nor PLFA profiles differed between sensitive and resistant isolates. The fatty acid 18:1  $\delta$ 9c was increased in sensitive isolates ( $p < 0,001$ ), whereas an yet unidentified peak showed the opposite trend ( $p < 0,01$ ). We can conclude that these two fatty acids are potential biomarkers for NO and antimony resistance in *L. chagasi* and *L. amazonensis* and they can be helpful for therapeutical diagnosis.

**Keywords:** *Leishmania chagasi*; *L. amazonensis*; FAMES.

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses afetam milhões de pessoas mundialmente em 88 países, dentre eles o Brasil. Elas são consideradas a segunda maior causa de morte por parasita no mundo, logo depois da malária. Além disso, as leishmanias, seus agentes etiológicos, vêm apresentando resistência aos medicamentos disponíveis para o seu tratamento, o que consiste em um grave problema para o controle da endemia.

Recentemente, observa-se a importância de uma classe de moléculas no estudo das leishmanias: os lipídeos. Eles estão presentes em grande proporção nestes parasitas e são importantes para a viabilidade e virulências destes organismos. Foi demonstrado que os isolados de *Leishmania* spp. resistentes e sensíveis ao estibogluconato de sódio apresentam diferenças nos fosfolipídeos e nos esfingolipídeos, com diferenças nos ácidos graxos da primeira classe. Os ácidos graxos são normalmente utilizados para determinar o *fingerprinting* de bactérias, e devido a seu papel importante na manutenção de células saudáveis, podem ser moléculas biomarcadoras.

Então, a análise dos perfis de ácidos graxos pode levar a identificação de um marcador de resistência ao antimônio, assim como, ajudar na identificação de moléculas alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais dos que existem atualmente na indústria farmacêutica. Desta forma o objetivo geral deste trabalho foi identificar e comparar os perfis de ácidos graxos em isolados de *L. chagasi* e *L. amazonensis* resistentes e sensíveis ao antimoniato de meglumina e ao óxido nítrico. Especificamente através da identificação e caracterização dos perfis de ácidos graxos de lipídeos totais, de ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios e de ácidos graxos constituintes dos lipídeos com ligações éster.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Leishmanias e Leishmanioses

As leishmanias são protozoários parasitas que causam as leishmanioses. Estes parasitas pertencem ao gênero *Leishmania*, a Ordem Kinetoplastida e a Família Tripanossomatidae por possuírem cinetoplasto e utilizarem insetos como vetor da doença para alguns vertebrados, respectivamente. O cinetoplasto é um subcompartimento especializado da única e grande mitocôndria dos tripanossomatídeos, contendo uma rede de DNA característica. Este material genético, denominado kDNA é o DNA mitocondrial mais complexo dentre os seres vivos e contém vários maxicírculos que codificam produtos mitocondriais típicos e centenas de minicírculos com DNA que transcrevem RNAs guias (gRNAs) que ajudam a editar os mRNAs dos maxicírculos (LUKES, et al., 2002).

As leishmanias possuem também o glicossoma. Esta é uma estrutura evolutivamente adaptada ao ciclo biológico do parasita, considerando que quando presente na corrente sanguínea do hospedeiro os tripanossomatídeos se encontram num ambiente rico em glicose, conseqüentemente, ficam com altas taxas de glicólise. O glicossoma contém diversas enzimas glicolíticas compartimentalizadas, pois as sequestra como forma de proteção ao organismo (BAKKER et al., 2000). Além disso, é essencial para a síntese de ATP (MICHELS et al. 2006).

O ciclo biológico de *Leishmania* é complexo e digenético, uma fase ocorre no mamífero hospedeiro, principalmente homem e cachorro, e outra no inseto vetor. Os organismos transmissores são fêmeas pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Américas ou Novo Mundo) e *Phlebotomus* (África, Ásia e Europa – Velho Mundo). Primeiramente o flebotomíneo alimenta-se do sangue do hospedeiro e a leishmania passa de amastigota para promastigota procíclico em seu intestino médio. Em seguida, os promastigotas procíclicos migram para a probóscide do vetor e se convertem em promastigotas. Posteriormente, o flebotomíneo se alimenta do sangue do hospedeiro e os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos. Após a infecção, dentro das células, as leishmanias se transformam em amastigotas e se multiplicam. Desta forma, juntamente com a picada do vetor, o ciclo se perpetua. O ciclo é apresentado de forma simplificada na figura 1.

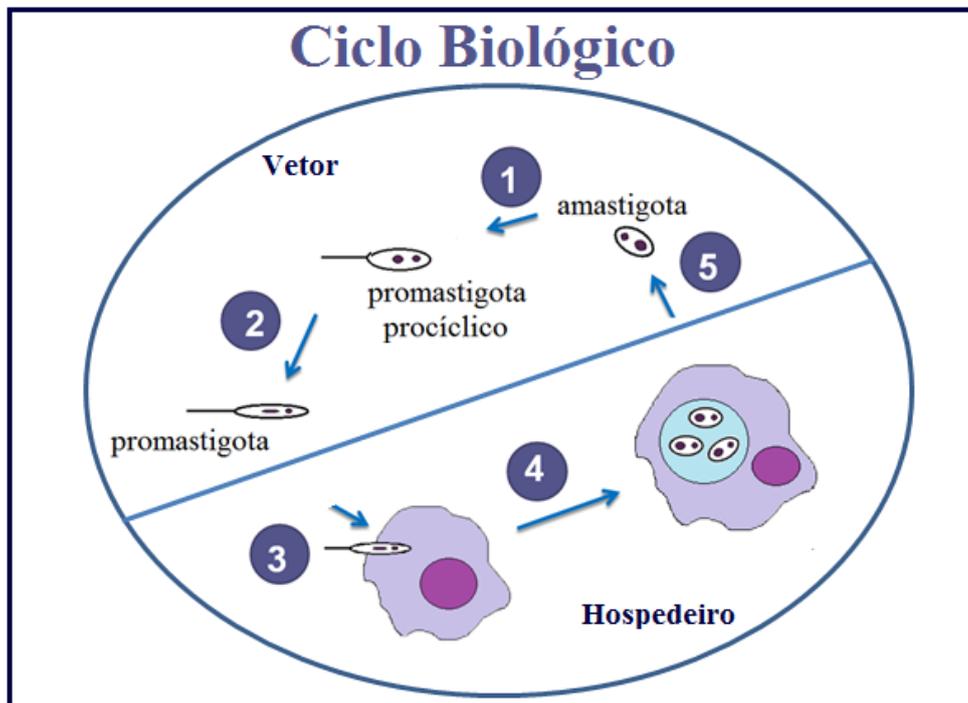


Figura 1. Ciclo biológico digenético de *Leishmania* spp. Os parasitas apresentam-se sob duas formas principais: a promastigota no intestino de mosquitos flebotomíneos e a amastigota em células mononucleares fagocíticas do sangue de vertebrados (adaptada de Azevedo, 2010).

As leishmanioses são protozoonoses que afetam mais de 20 milhões de pessoas em todo mundo (MCCONVILLE e NADERER, 2008) e atingem aproximadamente um milhão de pessoas a cada ano. Elas estão presentes na África, América do Sul, Ásia e Europa. Contudo, o número de casos é provavelmente subestimado já que as leishmanioses são confirmadas em apenas 40 dos 88 países reportados (CROFT et al., 2006). No Brasil, segundo dados do Portal da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012) estima-se que ocorreram em torno de 150 mil casos destas doenças, no período entre 2006 e 2010, sendo são ressaltadas como endemias de interesse prioritário (COSTA, 2005). Fatores agravantes para a alta incidência das Leishmanioses é a urbanização – áreas urbanas que invadem os ambientes “rurais” – e o desmatamento. Estes contribuem para a invasão do vetor nas áreas de vivência humana, o que provavelmente aumenta a incidência da enfermidade (DESJEUX, 2001). Assim, devido à grande importância das Leishmanioses, estão sendo desenvolvidas novas técnicas para diagnóstico, vacinas, controle de vetores e reservatórios, bem como novas drogas para seu tratamento (CROFT et al., 2006).

Segundo Bates (2007), já foram relatadas mais de 30 espécies do gênero *Leishmania*, sendo que aproximadamente 10 possuem importância médica e veterinária, e são subdivididas em 3 subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* (Fig. 2). No grupo *Leishmania*, a fase de estabelecimento da infecção ocorre na extremidade anterior do intestino do vetor (os promastigotas procíclicos vão para a região da cárdia); em *Viannia*, a fase de estabelecimento da infecção ocorre no intestino posterior do vetor (promastigotas procíclicos localizados na região do piloro); e *Sauroleishmania*, um grupo ainda pouco conhecido que infecta lagartos, mas não é patogênico para homens. Porém, ainda existem outras diferenças moleculares e bioquímicas quanto ao agrupamento dos subgêneros, por exemplo, genes específicos, como o da proteína de choque térmico 70, que mantem-se altamente conservada através de procaríotos e eucariotos (FRAGA et al., 2010).

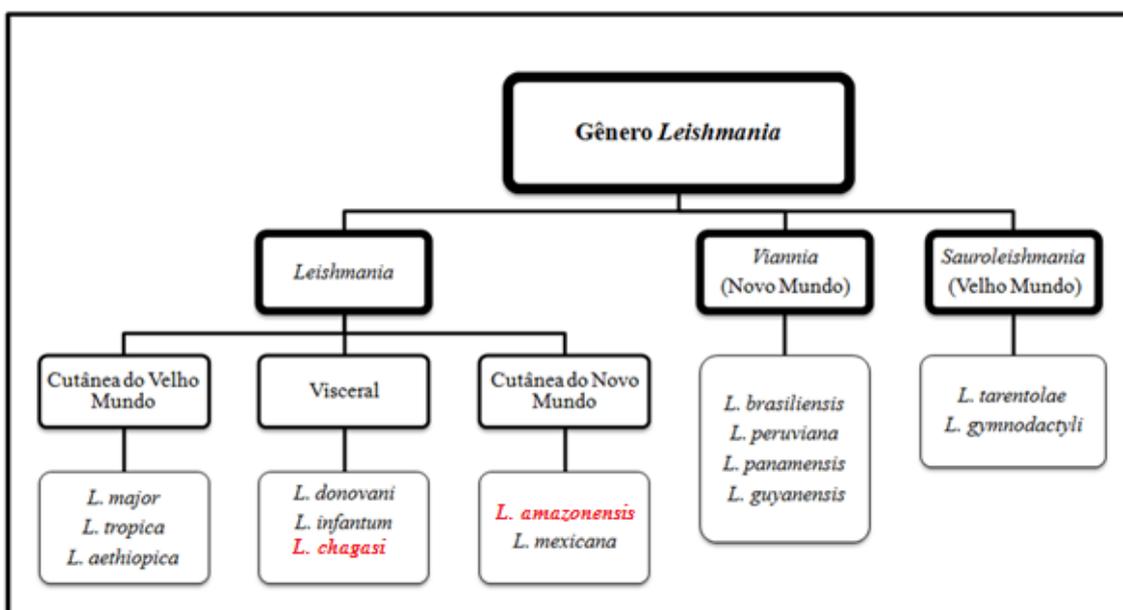


Figura 2. Classificação dos subgêneros de *Leishmania*. Expõe exemplos das espécies mais conhecidas de importância biomédica. Destaca os agentes etiológicos das Leishmanioses, Visceral e Tegumentar no Brasil, estudados neste trabalho (adaptada de Bates, 2007).

Clinicamente, as leishmanioses apresentam-se em duas formas principais: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. Esta última é dividida em três subformas: cutânea, cutânea difusa e monocutânea. No Brasil, a forma tegumentar, denominada especificamente de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é

causada pelos parasitas *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. brasiliensis*. Segundo o Ministério da Saúde (BRASÍLIA, 2010), a forma cutânea é classicamente representada por pápulas indolores, únicas ou múltiplas, localizadas ou difusas, que podem evoluir para úlceras com fundo granuloso, bem como placas verrucosas, enquanto, a forma mucosa que geralmente é secundária a esta, pode ocorrer concomitantemente ou após o desaparecimento da lesão cutânea. Porém, há relatos de casos de lesões mucosas isoladas e caracterizadas por infiltração, destruição e ulceração de tecidos da faringe, laringe ou cavidade nasal.

Para o Ministério da Saúde (2012), no período de 1991 a 2010, a incidência de LTA no Brasil apresentou-se elevada atingindo uma média anual de 27.374 casos registrados. Além disso, observou-se também uma expansão geográfica da doença que atinge as 5 regiões do país, mais expressiva na região Norte, com aproximadamente 36% do total de casos registrados no período em destaque.

A forma visceral – também conhecida como calazar, febre negra ou febre dum dum (JAMES et al., 2006) – é a mais grave e se não tratada, pode levar a morte em poucos anos (2 a 3 anos). Conforme Murray et al. (2005), a maioria dos casos de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Sudão, Nepal, Bangladesh e Brasil. Sabe-se que a leishmaniose visceral é causada por espécies do gênero *Leishmania* pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania)* (GONTIJO e MELO, 2004). No Velho Mundo, é causada por *L. donovani* e *L. infantum*, enquanto no Novo Mundo por *L. chagasi* (Herwaldt et al., 1999). Sinais e sintomas desta doença incluem aumento expressivo de baço e fígado (hepatoesplenomegalia), anemia, fadiga (astenia e adinamia), palidez, anorexia, linfadenopatia, úlceras mucosas, perda de peso, hemorragia digestiva, caquexia e febre de longa duração (BRASÍLIA, 2010; TAHER et al., 2010; RAMOS-E-SILVA, CASTRO, 2009).

A *Leishmania (Leishmania) chagasi* é o agente etiológico da Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil. Neste país, foram registrados 40883 casos de LV entre 2001 e 2012. A LV apresenta representatividade no Nordeste deste país (47,1% dos casos em 2010) e, também, em Sergipe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Neste estado, segundo o DATASUS, de 2001 a 2012, foram relatados e confirmados 593 de LV e 266 de LTA.

## Aspectos imunológicos das Leishmanioses

Com relação à resposta imune do hospedeiro aos tripanossomatídeos em geral, sabe-se que *Leishmanias*, bem como *Trypanossoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e as formas viventes no fígado e no sangue da malária - agentes intracelulares - conseguem evadir os efeitos da imunidade humoral (por anticorpos e complemento) e, também dos mecanismos microbicidas dos fagócitos, adaptando-se a vida intracelular (SACKS e SHER, 2002).

A resposta celular primária contra as leishmanias envolve a atração de mecanismos microbicidas dos macrófagos por citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com indução de reativos intermediários do oxigênio (ROS) e nitrogênio (óxido nítrico ou NO). Tais protozoários ao infectarem o hospedeiro ativam o sistema imune celular, através da produção de IL-12, havendo indução da diferenciação de linfócitos T, para Th1. Estas produzem citocinas, especialmente o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que ativam os macrófagos. Estes fagócitos por sua vez liberam o NO, o qual é tóxico ao parasita e controlam a sua multiplicação. Alguns estudos demonstram efeitos antiparasíticos do óxido nítrico sob estes parasitas (MAUEL e RANSIJN, 1997; BOCEDI et al., 2004).

O modelo experimental de infecção por *L. major* foi amplamente estudado para compreender a resposta imune protetora e susceptibilidade na leishmaniose tegumentar. Camundongos resistentes C57Bl/6 desenvolveram uma resposta protetora tipo TH1 que libera as citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , causando a morte do parasita (COSTA et al., 2011). Em contraste, camundongos BALB/c apresentaram a resposta tipo Th2, caracterizadas pela produção de IL-4, IL-13 e IL-10, resultam na susceptibilidade à infecção, pois, segundo McConville e Naderer (2008) e Holzmuller et al. (2006), estas interleucinas inibem os efeitos do óxido nítrico e, conseqüentemente, tornam o hospedeiro mais susceptível. Para Murray et al. (2005) algumas interleucinas como IL-4, IL-10 e IL-13 são capazes de modificar as respostas tipo Th1 e, conseqüentemente, desativar os macrófagos para diminuir a injúria tecidual – o que promove a proliferação do parasita (infecção) (MURRAY et al., 2005). Posteriormente, foram discutidas as células T regulatórias (CD4+) do tipo CD25+ as quais também suprimem a resposta imune e perpetuam a infecção por serem fontes importantes de IL-10 (SACKS e SHER, 2002).

No caso da Leishmaniose Visceral, a resposta primária é a mesma. O mecanismo de controle da infecção também é dado pelo NO liberado pelos

macrófagos - uma vez ativados pelo IFN- $\gamma$  produzido como resposta imune das células Th1. Mas um aumento da secreção de IL-10 é característico à sua imunopatogênese (TAHER et al., 2010). Pacientes em fase aguda incluem “storm” de citocinas e respostas de células T regulatórias tipo CD8+ que também vão diminuir a liberação de IFN- $\gamma$  e aumentar a secreção de IL-10 (HOLADAY, 2000). São as células T CD8+ que reproduzem a resposta imune característica da Leishmaniose visceral. Mas a adição de IL-12 e IFN- $\gamma$  não previnem contra a ação destas células. Contudo, vale destacar a importância dos níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) e anticorpos antileishmaniais na resposta imune para LV (SOUZA-ATTA et al., 2002).

### **Tratamento das Leishmanioses**

As drogas de primeira escolha ainda utilizadas para o tratamento das Leishmanioses são os antimoniais. Porém estas drogas causam uma série de efeitos colaterais e estão sendo ameaçadas pelo desenvolvimento de resistência às mesmas pelos parasitas. Os antimoniais pentavalentes (Estibogluconato de sódio, Antimoniato de meglumina e Estibamine) são preferíveis aos trivalentes (Tartarato antimoniais de potássio, Antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico e Tioglicolato de sódio e antimônio; (figura 3), pois estes últimos são cardiotoxicos e geram intolerância gastrointestinal (GIL et al., 2007). Apesar disso, os antimoniais pentavalentes ainda possuem os seguintes efeitos colaterais: febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, nervosismo, choque pirogênico, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, prurido, insônia, edema e insuficiência renal aguda, bem como lesões hepática, pancreática e cardíaca (JAMES et al., 2006; BRASÍLIA, 2010).

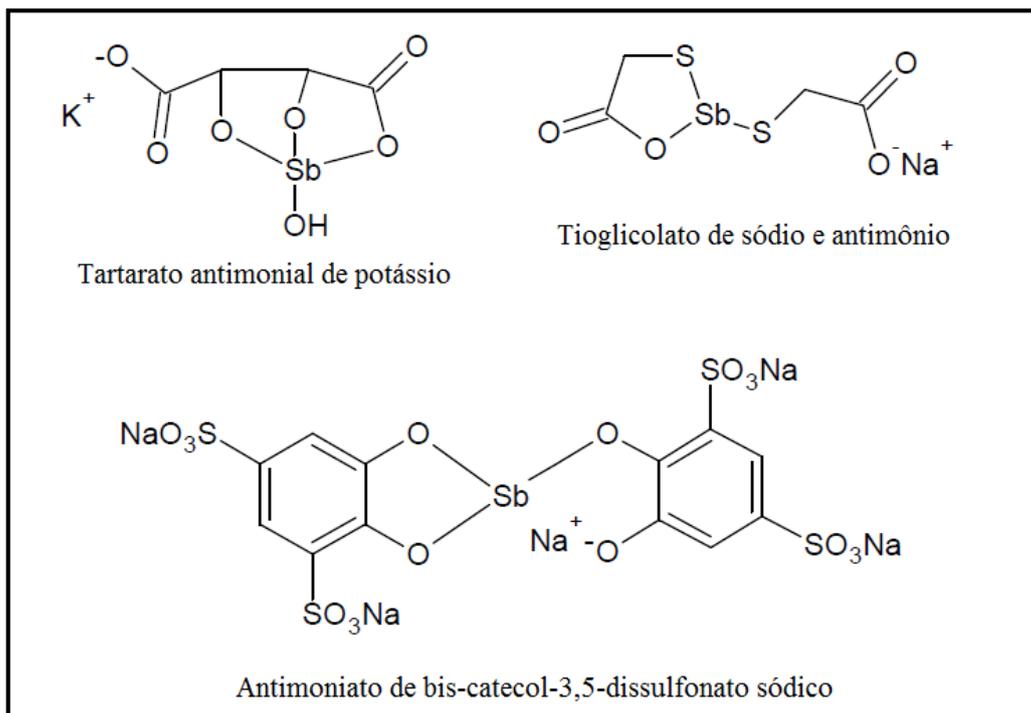


Figura 3. Antimoniais trivalentes. Tartarato antimonial de potássio (Tartarato emético), Antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico (Stibophen, Repodral e Fuadina) e Triglicolato de sódio e antimônio (adaptado de GIL et al., 2007).

Os medicamentos atualmente conhecidos para o tratamento da Leishmaniose Visceral de 1<sup>a</sup> linha são estes: Estibogluconato de sódio (Pentostam®), Antimoniato de meglumina (Glucantime®), Anfotericina B (Fungizone®) e Pentamidina (figura 4). Já as novas terapias introduzidas consistem em anfotericina B lipossomal (AmBisome®), Miltefosina, Paramomicina (Aminosidina® parenteral) e Sitamaquina (figura 5) (CROFT et al., 2006; GIL et al., 2007; BRASÍLIA, 2010). Para o tratamento de Leishmaniose Tegumentar vem sendo testados o Imiquimode (imunomodulador) e alguns antifúngicos azólicos (Fluconazol, Cetoconazol, dentre outros) (CROFT et al., 2006). Contudo, antimoniais, Anfotericina B, Estibamina, Paramomicina (formulações tópicas) e Miltefosina (estando estes dois últimos nas fases finais de testes) também são utilizados nestes casos. Além disso, é importante destacar que muitas vezes os tratamentos orais devem ser combinados com tópicos para as lesões na pele.

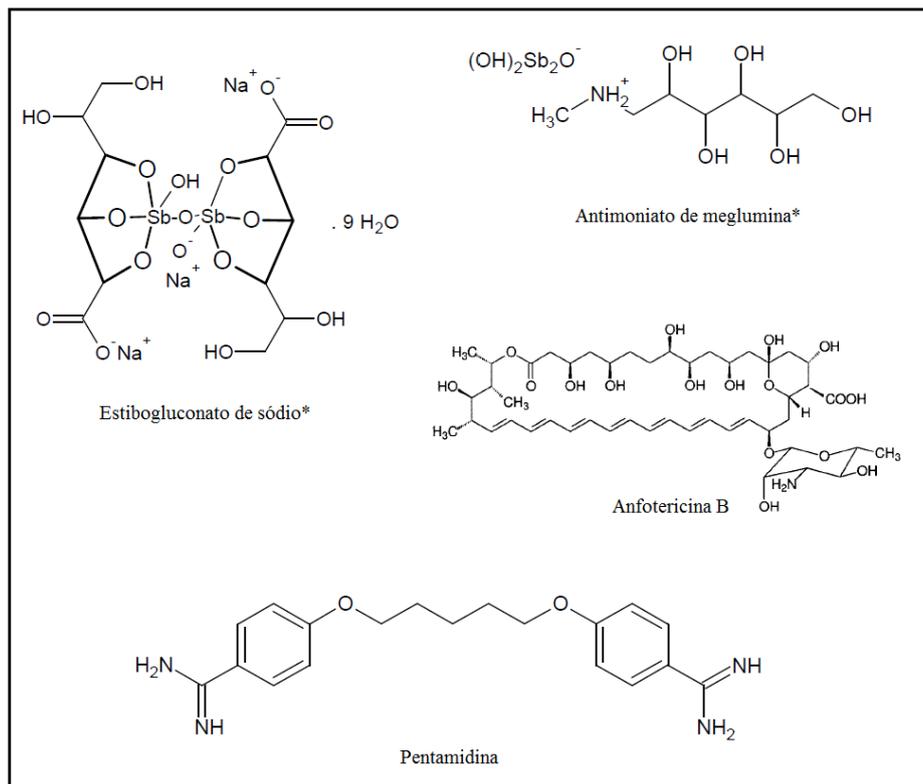


Figura 4. Tratamentos de primeira linha para Leishmaniose Visceral. \*Representam os antimoniais pentavalentes que são as drogas de primeira escolha para o tratamento no Brasil (adaptado de CROFT et al., 2006 e GIL et al., 2007).

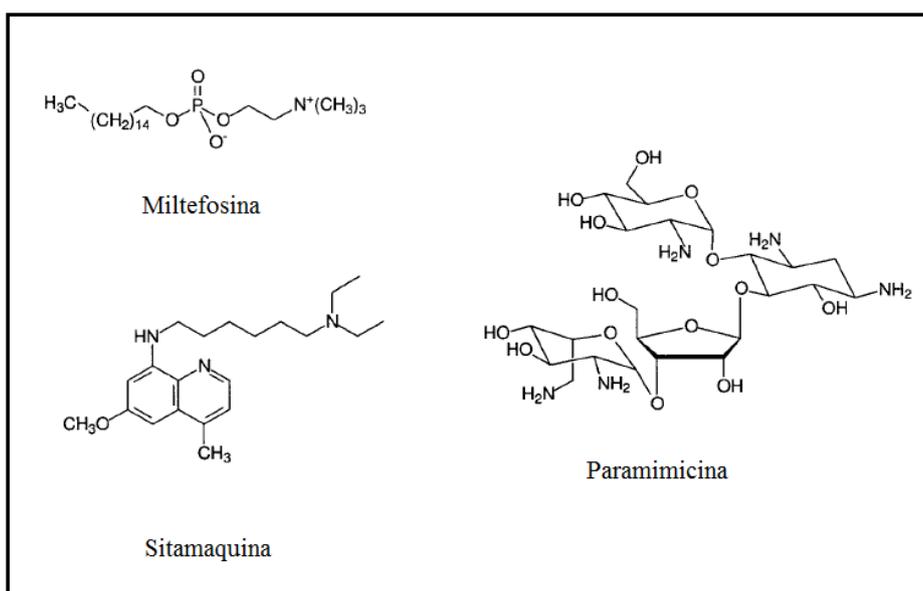


Figura 5. Medicamentos em ensaios clínicos para o tratamento de Leishmaniose Visceral (adaptado de CROFT et al., 2006).

Mesmo com todos estes medicamentos disponíveis e em testes clínicos, a substituição de um medicamento por outro pode não funcionar devido a adaptações moleculares aos tratamentos anteriores (T'KINDT et al., 2010). Assim, é importante o desenvolvimento de terapias alternativas. O estudo das diferenças entre organismos resistentes e sensíveis a estes medicamentos pode revelar alvos mais eficazes no tratamento *das leishmanioses*.

É importante ressaltar, que segundo Croft et al. (2006), o status dos pacientes também é conhecido por afetar a eficácia das drogas. Estes mesmos autores afirmaram que a imunidade intacta do hospedeiro aumenta a habilidade de cura das drogas antileishmaniais. Contudo, nem todos os medicamentos são dependentes das células T como a pentamidina. A miltefosina e a anfotericina B são independentes das mesmas, mas dependentes da resposta imunológica eficiente.

### **Resistência ao Óxido Nítrico e ao Antimônio**

Observa-se que a evolução da infecção para doenças nas leishmanioses em geral está relacionado com o tipo de resposta imunológica do hospedeiro. As manifestações patológicas estão associadas a uma deficiência da resposta mediada por células Th1 e macrófagos. Assim, podemos afirmar que a infecção por *Leishmanias* está diretamente relacionada à resposta celular do sistema imunológico. Para determinar as consequências patológicas das infecções microbianas é necessário um balanço delicado entre hospedeiro e patógeno (ZAKI et al., 2005). Assim, segundo Gantt et al (2001), os mecanismos antimicrobianos do macrófago devem ser evadidos para sobrevivência dos parasitas intracelulares.

Algumas estratégias para supressão da atividade imunológica dos macrófagos foram observadas, muitas vezes relacionadas às inibições da síntese de IFN- $\gamma$  ou do efeito desta citocina sob os macrófagos (GAZZINELLI et al, 1998). Assim, inibindo o INF- $\gamma$ , observou-se que as leishmanias conseguem reduzir a produção do óxido nítrico endógeno (Salvati et al, 2001; BOCEDI et al, 2004). Segundo Linares et al. (2000) e Balestieri et al. (2002), outra forma da modulação da síntese de NO ocorre através da

inibição da óxido nítrico sintase (iNOS) do hospedeiro. Esta enzima gera NO através da transformação do aminoácido semi essencial L-arginina em L-citrulina (RICHARDSON et al., 2008).

A iNOS necessita dos cofatores oxigênio e NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) e a resultante formação de NO (figura 6), a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina, é um dos mecanismos de defesa contra microorganismos patogênicos de maior espectro, já que esta é uma das moléculas sinalizadoras mais importantes por mediar à morte celular seja por necrose celular – através da ação do peroxinitrito – ou por apoptose (HARA et al., 2006).

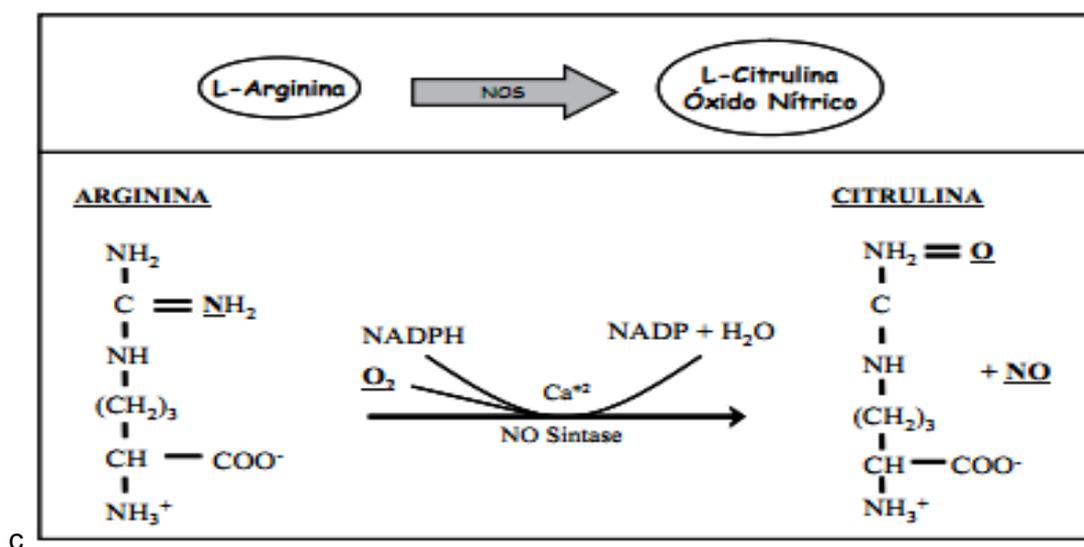


Figura 6. Formação do óxido nítrico a partir da arginina pela ação da iNOS (adaptado de LEHNINGER, 2002). Fonte: ZAGO; ZANESCO, 2006.

Dentro dos macrófagos, o óxido nítrico devido a seu estado gasoso é facilmente difundido e pode reagir com o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>; produto das NADPH oxidases), formando peroxinitrito (ONO<sub>2</sub><sup>-</sup>). A incorporação do grupo nitrito (-NO<sub>2</sub>) nas biomoléculas, denominada nitração, era considerada dependente apenas do peroxinitrito. Entretanto, outros mecanismos possíveis foram observados (figura 7) (LINARES et al., 2001), sendo estes basicamente dependentes do óxido nítrico. Assim, o peroxinitrito oxida e nitra vários alvos biológicos, sendo um mediador potencial dos efeitos citotóxicos do óxido nítrico. Ressalta-se que a nitração de

proteínas dos parasitas é danosa aos mesmos, pois modifica sua função (FANG, 1997), ou ainda leva a dano celular devido à mudança estrutural das mesmas.

Além da nitração de resíduos de tirosina (Tyr), modificação irreversível responsável pelos efeitos tóxicos do óxido nítrico, que origina 3-nitrotirosina, os efeitos da elevada concentração de NO incluem nitrosilação, em que os nitrosotióis de cisteínas são formados (VANNI et al., 2007). Estas reações também apresentam efeitos negativos sobre as funções das proteínas e, conseqüente, enzimas, sendo bastante prejudiciais aos organismos.

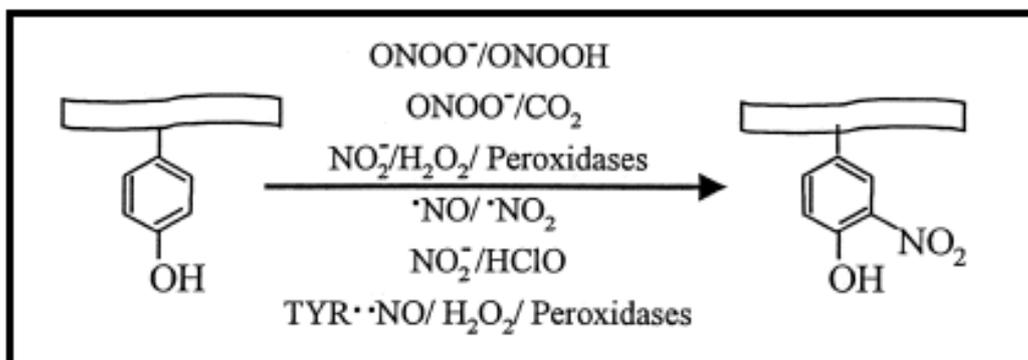


Figura 7. Representação dos prováveis sistemas responsáveis pela nitração dos resíduos de tirosina in vivo. Fonte: LINARES et al., 2001.

Com relação a outros efeitos antiparasíticos do óxido nítrico sob as leishmanias, Lemesre et al. (1997) demonstrou que o ON induzia a inibição metabólica seletiva da cis-aconitase (E.C.4.2.1.3) em *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*, atribuindo a queda da viabilidade dos parasitas a este efeito inibitório. Paralelamente, Mauël e Ransijn (1997) corroboravam estes achados em *L. major* e *L. enriettii* e ainda demonstraram a ação inibitória do ON sobre a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH; E.C.1.2.1.12) nestas espécies. Posteriormente, Holzmüller e colaboradores (2006), demonstraram a ação inibitória do NO sobre a GAPDH em *Leishmania infantum*. Mauël e Ransijn (1997) observaram o aumento da atividade destas enzimas em cepas com resistência induzida artificialmente ao NO, indicando um possível mecanismo de resistência.

Tais estudos foram realizados em isolados com resistência ao NO induzida em laboratório. Contudo, isolados de *Leishmania* spp apresentando resistência natural ao NO foram descritos por Giudice et al. (2007) e Souza et al. (2009). Seus estudos evidenciaram que os isolados resistentes de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania brasiliensis* sobreviviam melhor nos macrófagos e eram responsáveis por lesões maiores que as que as causadas pelos isolados susceptíveis, características que diferenciam o quadro clínico. Uma vez que tal resistência também ocorria na ausência de macrófagos – culturas axênicas das formas promastigotas – supôs-se que outro mecanismo que, não a modulação da iNOS, estaria envolvido.

Dados de Azevedo (2010) e Rios (2011) mostraram que em isolados de *L. amazonensis* com resistência natural ao NO a atividade da GAPDH também se encontra aumentada. Além disso, uma menor nitratação das proteínas totais também foi observada nestas linhagens. Portanto, com base no exposto, considerou-se que a atividade alterada da enzima GAPDH pode estar relacionada à resistência natural apresentada por esses isolados de *Leishmania* descritos por Giudice et al. (2007) e Souza et al. (2009).

Pouco se sabe sobre a ação dos antimoniais sobre as leishmanias, porém, acredita-se que o mesmo age comprometendo o potencial redox através da inibição da ação de algumas enzimas como tripanotona redutase que se liga ao antimônio (EL FADILI et al., 2005; MITTAL et al., 2007); levando a apoptose por fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilserina na superfície da membrana (SERENO et al., 2001; SUNHANDIRAN e SHAHA, 2003), e inibindo glicólise e a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (BERMAN et al., 1987).

Portanto, para compensar a ação da medicação, os isolados sofrem alterações bioquímicas e moleculares, mudando seu metabolismo. Assim, algumas leishmanias são capazes de aumentar o efluxo da droga graças a um aumento no número de transportadores ABC capazes de sequestrar o conjugado tripanotona redutase/antimônio (EL FADILI et al., 2005; MITTAL et al., 2007); reduzir a entrada do antimônio trivalente pela aquagliceroporina (AQP1) (MAHARJAN et al. 2008); dentre outros fatores que favoreçam o desenvolvimento de resistência a essas drogas.

Além disso, atualmente é conhecido que a resistência ao óxido nítrico pode estar relacionada com a resistência aos antimoniais (HOLZMULLER et al., 2005), sugerindo uma via comum de resistência. Isso pode ser observado em Souza et al.

(2009), já que seus isolados de *L. braziliensis* refratários ao tratamento com antimônio, apresentaram maior resistência ao NO e em isolados de *L. chagasi* com as mesmas características cujos dados de Micheli Luize Barbosa Santos ainda não foram publicados.

### **Lipídeos e Ácidos Graxos como Biomarcadores**

As mudanças metabólicas referentes à resistência a medicamentos em parasitas estão normalmente relacionadas à alteração de vias metabólicas responsáveis pela biossíntese de metabólitos específicos destes organismos. Recentes estudos utilizam a metabolômica como ferramenta de análise da diversidade desses organismos visando entender a diversidade de isolados de leishmanias (SCHELTEMA et al., 2010). T'Kindt et al. (2010) caracterizaram isolados clínicos de *Leishmania donovani* com resistência ou não ao medicamento estibogluconato de sódio, através de estudos metabolômicos de cromatografia líquida associada a espectrometria de massa. Devido à forma de extração, eles observaram que a maior classe de metabólitos identificada foi de lipídeos, sendo que a maior diferença encontrada entre os isolados, resistente ou não ao medicamento, estava nos fosfolipídeos e esfingolipídeos. Ainda, segundo Zhang e Beverley (2010), estas duas classes de componentes lipídicos, além de estarem em grande proporção nas *Leishmanias*, têm seu metabolismo como fator crítico para a viabilidade destes organismos.

Dentre os esfingolipídios de importância para as leishmanias podemos citar as inositol fosforil ceramidas que são específicos de *Leishmania* e a presença de esfingolipídeos característicos de mamíferos que podem ter sido transferidos do hospedeiro para estes parasitas (ZHANG et al., 2010). Dentre os fosfolipídios, os glicoconjugados de fosfoinositóis também tem se destacado, pois a capacidade de sobrevivência de *Leishmania* no mosquito ou mamífero depende destes, provavelmente porque esses lipídeos são importantes constituintes da membrana e correspondem ao local de ancoragem glicosídica de diversas proteínas (ZHENG et al., 2010, ADOSRAKU et al., 1993). Além disso, essas moléculas são inibidores da enzima iNOS que representa um dos mecanismos de resistência dos micro-organismos patogênicos ao NO (RICHARDSON et al., 2008). Dentre esses inibidores

da iNOS pode-se citar o Glicosil Inositol Fosfolipídio (GIPLS), que também é um glicolipídio expresso na membrana do parasita (NATHAN e XIE, 1994; CUNNINGHAM, 2002; ZHENG et al., 2010). As fosfatidilserinas, outro lipídio da classe dos fosfolipídios, são relevantes para o processo de infecção, pois durante o estágio metacíclico do parasita, elas são expostas em sua membrana para simular a apoptose e levar a fagocitose pelos macrófagos do hospedeiro (ZHANG e BEVERLEY, 2010; ZHENG et al., 2010).

Outros fosfolipídios como as fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas, são importantes por alterarem a fluidez da membrana e por serem componentes de resistência a drogas (ZHENG et al. 2010). A fluidificação da membrana é correlacionada com uma diminuição na proporção de colesterol e fosfolipídeos e no aumento da proporção de insaturações nos ácidos graxos. Essas alterações podem explicar o aumento da fluidez da membrana em isolados de *Leishmania* spp. resistentes a pentamidina observados por Basselin e Robert-Gero (1998). Esse aumento da fluidez pode também facilitar a expulsão da droga do interior da célula ou diminuir seu influxo, o que foi observado por Mbongo e colaboradores (1998). Alloatti e Uttaro (2011) também ressaltaram o papel dos ácidos graxos insaturados na manutenção a correta viscosidade, permeabilidade, fluidez, flexibilidade e seletividade das membranas de tripanossomatídeos, bem como sua grande proporção nos lipídeos totais destes organismos. Esses ácidos graxos são raros em membranas bacterianas (PIOTROWSKA-SEGET e MROZIK, 2003).

Assim, estudos metabólicos destes patógenos são importantes para revelar diferenças no metabolismo lipídico destes organismos e demonstrar as distinções entre os isolados para que se descubram novos alvos para medicamentos. Mas, além disso, segundo Mohanty e colaboradores (2012), também podem ajudar na identificação de biomarcadores terapêuticos. Estes mesmos autores descrevem os biomarcadores como eventos celulares específicos ou até mesmo moléculas chave capazes de diferenciar uma condição clínica ou exposição ambiental. Assim, eles podem ajudar a tomar uma decisão terapêutica mais direcionada ou até mesmo levar novos medicamentos de maneira mais eficiente aos pacientes, o que pode se aplicar também no contexto da leishmaniose, já que os parasitas muitas vezes criam resistência aos medicamentos usuais (EL FADILI et al., 2005; HOLZMULLER et al., 2005; MITTAL et al., 2007; MAHARJAN et al. 2008; SANTOS et al., 2012) os quais, por sua vez, apresentam uma série de efeitos colaterais (JAMES et al., 2006; BRASÍLIA, 2010).

Uma maneira de estudar os lipídeos é através da análise dos seus ácidos graxos, que são suas unidades básicas. Estas moléculas são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento variando de 4 a 36 carbonos, cuja cadeia pode ser saturada ou insaturada (contendo ligações duplas). Alguns ácidos graxos também podem conter grupos hidroxil, anéis de três carbonos ou ramificações com o grupo metil. Além disso, os ácidos graxos podem atuar como biomarcadores (MOHANTY et al., 2012)

Para estudar os ácidos graxos por cromatografia gasosa é necessário volatilizá-los. Para tanto, é realizada a metanólise alcalina branda, uma reação de transesterificação de etapa única, ou ainda a saponificação seguida por metilação dos mesmos, gerando os metil ésteres de ácidos graxos (FAMES). A metanólise alcalina branda consiste numa reação de transesterificação em uma única etapa, catalisada por uma base composta por um elemento alcalinoterroso na presença de metanol para a formação de FAMES a partir de lipídeos com ligações éster, e estes são abundantes em bactérias e eucariotos (Kates, 1986).

O ELFA foi descrito por Schutter e Dick (2000). Ele consiste no método para extração direta de ácidos graxos do solo mais simples e rápido. Basicamente é feita uma reação de metanólise alcalina branda diretamente das amostras, assim, os FAMES obtidos são derivados de ácidos graxos com ligações do tipo éster (figura 9) em 3 classes de lipídeos: neutros, glicolipídeos e fosfolipídeos. O MIDIFA também é um método de extração direta e consiste em quatro etapas: saponificação, metilação, recuperação dos compostos metilados e lavagem da fase orgânica. Assim, a diferença entre estes dois métodos consiste na geração dos FAMES, o primeiro usa a metanólise alcalina branda, enquanto, o último difere por utilizar a saponificação/metanólise ácida. (SASSER, 1990; CAVIGELLI, ROBERTSON, 1995)

O PLFA ocorre em 3 etapas principais: extração dos lipídeos totais diretamente da amostra (BLIGH, DYER, 1959), o fracionamento do extrato em lipídeos neutros, glicolipídeos e fosfolipídeos, e a produção dos FAMES diretamente da fração de fosfolipídeos (ZELLES, 1999). É importante ressaltar que estas reações descritas, especificamente o MIDIFA, podem resultar na formação de outros compostos voláteis, além dos FAMES, como dimetil acetais, oriundos de ligações éter (figura 8) (KATES, 1986).

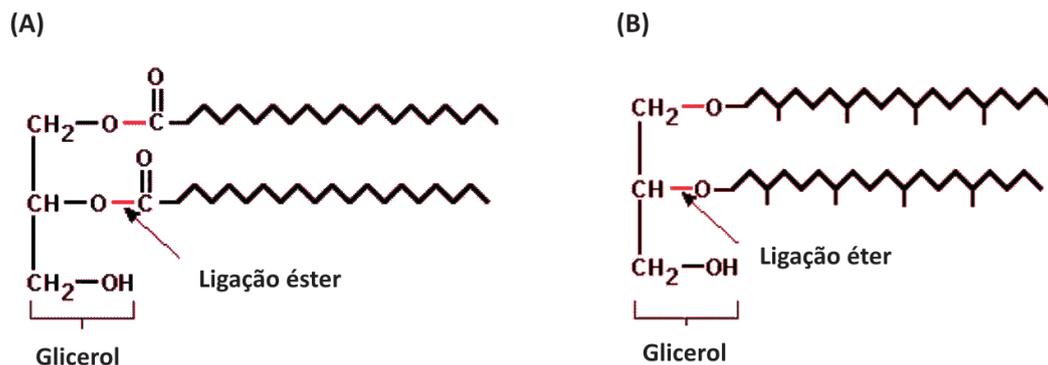


Figura 8. Modelos genéricos de lipídeos. (A) Lipídios com ligação éster, característicos de membrana plasmática de bactérias e eucariotos, e (B) com ligação éter, destacados em arqueobactérias. Fonte: FERNANDES e CHAER, 2010.

Alguns FAMES já são utilizados como biomarcadores de micro-organismos específicos e seus métodos de estudo associados à cromatografia gasosa podem ser utilizados para determinar a estrutura da comunidade microbiana (MCS) (tabela 1). Eles também são capazes de indicar falta de alimento ou crescimento em fase estacionária de alguns microrganismos (GUCKERT et al.; 1986; PIOTROWSKA-SEGET e MROZIK, 2003). Embora não existam relatos de ácidos graxos como biomarcadores em espécies de leishmania, T'Kindt e colaboradores (2010) relataram que os ácidos graxos constituintes dos fosfolipídeos (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) de *L. donovani* são diferentes em isolados sensíveis ou resistentes ao antimônio. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi comparar os perfis de ácidos graxos de *L. chagasi* e *L. amazonensis* em isolados resistentes e sensíveis a antimônio (Glucantime®) e óxido nítrico, visando à identificação de um ou mais ácidos graxos que possam ser usados como biomarcadores de resistência a droga. Um biomarcador específico pode levar a uma melhor decisão terapêutica, a respeito da indicação e escolha de drogas, tornando o tratamento mais eficaz.

Tabela 1. FAMES Biomarcadores para alguns grupos microbianos específicos.

Grupo microbiano, gênero ou espécie	FAMES biomarcadores
Fungos *	18:2 $\omega$ 6c
Bactérias Gram + *	15:0i; 15:0a; 16:0i; 17:0i; 17:0a
Bactérias Gram - *	18:1 $\omega$ 7c; 17:0cy; 19:0cy
Actinomicetos *	10-Me 16:0; 10-Me 17:0; 10-Me 18:0
Microeucariotos * °	20:4 $\omega$ 6c
<i>Pseudomonas</i> **	16:0 e 16:1 em proporções equivalentes, 18:17 $\omega$ c/ $\omega$ 9t/ $\omega$ 12t
<i>Vibrio cholerae</i> ***	11Me19:1; 18:2 $\omega$ 6,9

°Marcador comumente utilizado para protozoários que também ocorre em nematoides, fungos e algas.

\*Fonte: Fernandes e Chaer, 2010. \*\*Fonte: Haack et al., 1994. \*\*\*Fonte: Guckert et al., 1986.

## Referências Bibliográficas

ADOSRAKU, R. K.; ANDERSON, M. M.; ANDERSON, G. J.; CHOI, G.; CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; PHILLIPSON, J. D.; GIBBONS W. A. Proton NMR profile of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 62. P. 251-262. 1993.

ALLOATTI, A.; UTTARO, A. D. Highly specific methyl-end fatty-acid desaturases of trypanosomatids. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V. 175. P. 126-132. 2011.

AZEVEDO, A. F. **Mecanismos Bioquímicos de Resistência Natural ao Óxido Nítrico em Cepas de *Leishmania amazonensis***. Monografia (Curso de Ciências Biológicas Bacharelado). Universidade Federal de Sergipe. 2010.

BAKKER, B. M.; MENSONIDES, F. I. C.; TEUSINK, B.; HOEK, P. V.; MICHELS, P. A. M. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**. V. 97. N. 5. P. 2087-2092. 2000.

BALESTIERI, F.M.; QUEIROZ, A.R.; SCAVONE, C.; COSTA, V.M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN Ide, A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced

inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**. V.4. P. 23–29. 2002.

BASSELIN, M.; ROBERT-GERO, M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Parasitology Research**. V. 84. P. 78-83. 1998.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**. V. 37. P. 1097-1106. 2007.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochemical Pharmacology**. V.36. P. 197–201. 1987.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37. P. 911-917. 1959.

BRASÍLIA. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8ª ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde. 2010.

BOCEDI, A.; GRADONI, L.i; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 315. P. 710-718. 2004.

CAVIGELLI, M. A.; ROBERTSON, G. P. et al. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. **Plant and Soil**. V. 170. P. 99-113. 1995.

COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; SILVA, N. M.; MILANEZI, C. M.; CARDOSO, C. R.; GIUDICE, Â.; JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, J. S. BALB/c Mice Infected with Antimony Treatment Refractory Isolate of *Leishmania braziliensis* Present Severe Lesions due to IL-4 Production. **Plos Neglected Tropical Diseases**. V. 5. E. 965. Fev. 2011.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. V. 75. N. 1. P. 3-17. 2005.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 19. N. 1. P. 111-126. Jan. 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**. V. 72. P. 132–141. 2002.

DATASUS. SinanWeb. < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> >  
Acessado em Novembro de 2012.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**. V. 95. P. 239-243. 2001.

EL FADILI, K.; MESSIER, N.; LEPROHON, P.; ROY, G.; GUIMOND, C.; TRUDEL, N.; SARAVIA, N. G.; PAPADOPOULOU, B.; LÉGARÉ, D.; OUELLETTE, M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 49. P.1988-1993. 2005.

FANG, F. C. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. **Journal of Clinical Investigation**. V 99. N. 12. P. 2818-2825. 1997.

FERNANDES, M. P.; CHAER, G. M. Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo. Aracaju, SE: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. 2010.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DONCKER, S. D.; DUJARDIN, J.; AWERA, G. V. D. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat –shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**. V. 10. I. 2. P. 238-245. March 2010.

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S. M. B.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**. V. 167. P. 893-901. 2001.

GAZZINELLI, R. T.; TALVANI, A.; CAMARGO, M. M.; SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; VIEIRA, L. Q.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; SILVA, J. S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 31. P. 89-104. 1998.

GIL, E. S.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; BEZERRA, J. C. B.; AGUIAR, F. A. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita et Sanitas**. V. 1. N. 01. P. 90-115. 2007.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. T.; PEREIRA, J. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M.E.; HO, J. L.; JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**. V.7. N.7. 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo. V. 7. P. 338-349. 2004.

GUCKERT B., HOOD M. A., WHITE D. C. Phospholipid, ester-linked fatty acid profile changes in nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increase in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. of cyclopropyl fatty acids. **Applied Environmental Microbiology**. V. 52. P. 794-801. 1986.

HAACK, S. K.; GARCHOW, H.; ODELSON, D. A.; FORNEY, L .J.; KLUG, M. J. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. **Applied Environmental Microbiology**. V. 60. P. 2483-2493. 1994.

HARA, M. R.; CASCIO, M. B.; SAWA; A. GAPDH as a sensor of NO stress. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1762. P. 502-509. 2006.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**. V. 354. P. 1191-1199. 1999.

HOLADAY, B. J. Role of CD8+ T Cells in Endogenous Interleukin-10 Secretion Associated with Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 95. N. 2. P. 217-220. 2000.

HOLZMULLER, P.; HIDE, M.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. **Infection, Genetics and Evolution**. V.6. P. 187-97. 2006.

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Lower Nitric Oxide Susceptibility of Trivalent Antimony-Resistant Amastigotes of *Leishmania infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 49. P. 4406-4409. 2005.

JAMES, W. D.; BERGER, T. G.; ELSTON, D. **Andrews' Diseases of the Skin: clinical Dermatology**. 9<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro. Saunders Elsevier. 2006.

KATES, M. **Techniques of Lipidology**. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. 1986.

LEMESRE, J. L.; SERENO, D.; DAULOUE`DE, S.; VEYRET, B.; BRAJON, N.; VINCENDEAU, P. *Leishmania* spp.: Nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. **Experimental Parasitology**. V. 86. P. 58–68. 1997.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X. C.; YAMADA, A. T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 30. P. 1234-1242. 2001.

LINARES, E.; AUGUSTO, O.; BARAO, S. C.; GIORGIO, S. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. **Journal of Parasitology**. V. 86. P. 78–82. 2000.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOLTYPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. **Eukaryotic Cell**. V.1. N. 4. P. 495-502. 2002.

MAHARJAN, M.; SINGH, S.; CHATTERJEE, M.; MADHUBALA, R. Role of aquaglyceroporin (AQP1) gene and drug uptake in antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol. 79. P. 69-75. 2008.

MAUEL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Experimental Parasitology**. V. 87. P. 98–111. 1997.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**. V. 10. N. 2. P. 301-308. 2008.

MICHELS, P. A. M.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochemica et Biophysica Acta**. V. 1763. P. 1463-1477. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde. < <http://www.saude.gov.br> > Acessado em Novembro de 2012.

MITTAL, M. K.; RAI, S.; ASHUTOSH; RAVINDER; GUPTA, S.; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 76. N. 4. P. 681-688. 2007.

MBONGO, N.; LOISEAU, P. M.; BILLION, M. A.; ROBERT-GERO, M. Mechanism of Amphotericin B Resistance in *Leishmania donovani* Pormastigotes. **Microbial Agents and Chemotheraphy**. V. 42. N. 2. P. 352-57. 1998.

MONHANTY, B. P.; BHATTACHARJEE, S.; PARIA, P.; MAHANTY, A.; SHARMA, A. P. Lipids Biomarkers of Lens Aging. **Applied Biochemical Biotechnology**. V. 169. I. 1. P. 192-200. 2012.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**. V. 366. P. 1561-1577. 2005.

NATHAN, C; XIE, Q. Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide. **The Journal of Biological Chemistry** V. 269. N. 1. P. 13725-13728. 1994.

PIOTROWSKA-SEGET, Z.; MROSZIK, A. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community of Soil Microorganisms. **Polish Journal of Environmental Studies**. V. 12. N. 6. P. 669-675. 2003.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M. C. R. **Fundamentos de Dermatologia**. Vol 1. Rio de Janeiro: Editora Atheneu. 2009.

RICHARDSON, A. R.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C. A Nitric Oxide-Inducible Lactate Dehydrogenase Enables *Staphylococcus aureus* to Resist Innate Immunity. **Science**. V. 319. 2008.

RIOS, M. C. **Avaliação da Atividade da Enzima Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase em Isolados de *Leishmania amazonensis* Resistentes ao Óxido Nítrico**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais). Universidade Federal de Sergipe. 2011.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**. V. 3. N. 11. Nov. 2002.

SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A.; VENTURINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1545. P. 357-366. 2001.

SANTOS, P. L.; COSTA, R. V.; BRAZ, J. M.; SANTOS, L. F.; BATISTA, A. C.; VASCONCELOS, C. R.; RANGEL, M. R.; JESUS, A. R.; MOURA, T. R.; LEOPOLDO, P. T.; ALMEIDA, R. P. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide**. V. 27. P. 67-71. Jun. 2012.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Tech. Note #101**. Newark, DE: Microbial ID. 1990.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 45. P. 2064–2069. 2001.

SCHELTEMA, R. A.; DECUYPERE, S.; T'KINDT, R.; DUJARDIN, J.; COOMBS, G.H.; BREITLING, R. The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. **Parasitology**. V. 137. 2010.

SCHUTTER, M. E.; DICK, R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. **Soil Science Society of America Journal**. Madison. V. 64. P. 1659-1668. 2000.

SOUZA-ATTA, M. L.; SALAMÉ, G. S.; JR. A. D.; ALMEIDA, R. P.; ATTA, A. M.; CARVALHO, E. M. Immunoglobulin and Antileishmanial Antibody Response in Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**. V. 9. N. 1. P. 101-104. 2002.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**. V 278. P. 25120–25132. 2013.

TAHER, J. H.; HUMMADI, Y. M. K. A.; AL-BASHIR, N. M. T. Evaluation of some cytokines in Iraqi patients with kala-azar. **Journal of Parasitology and Vector Biology**. V. 2. N. 2. P. 022-028. 2010.

T'KINDT, R.; SCHELTEMA, R. A.; JANKEVICS, A.; BRUNKER, K.; RIJAL, S.; DUJARDIN, J.; BREITLING, R.; WATSON, D.G.; COOMBS, G. H.; DECUYPERE, S. Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. V. 4. I. 11. 2010.

VANNI, D. S.; HOSTMANN, B.; BENJO, A. M.I; DAHER, J .P. L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V.3. N.3. P. 181-289. 2007.

ZAGO, A. S. e ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. V. 87. N. 6. 2006.

ZAKI, M. H.; AKUTA, T.; AKAIKE, T.. Nitric Oxide-Induced Nitritative Stress Involved in Microbial Pathogenesis. **Journal of Pharmacological Sciences**. V. 98. P. 117-129. 2005.

ZHANG, K.; BANGS, J. D.; BEVERLEY, S. M. Sphingolipids in parasitic protozoa. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 688. 2010.

ZHANG, K; BEVERLEY, S. M. Phospholipid and sphingolip metabolism in *Leishmania*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V. 170. 2010.

ZHENG, L.; T'KINDT, R.; DECUYPERE, S.; FREYEND, S. J.; COOMBS, G. H.; WATSON, D. G. Profiling lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. V. 24. P. 2074-2082. 2010.

ZELLES, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. **Biology and Fertility of Soils**. V. 29. P. 111-129. 1999.

## CAPÍTULO I

### Introdução

A leishmaniose é um espectro de doenças que afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Ela tem grandes impactos sobre a saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. Estas são doenças negligenciadas, e embora afetem milhares de pessoas em todo o mundo, ainda carecem de tratamentos eficazes (ROMÃO et al., 2007). Além disso, as drogas de escolha - os antimoniais pentavalentes - requerem administração cautelosa sob monitorização clínica e laboratorial, devido a problemas como a toxicidade (nefrotoxicidade cardiotoxicidade e hepatotoxicidade) e são descritas arritmias fatais ou mortes súbitas (AMATO et al, 2003;. OLIVEIRA et al, 2005;. SILVA, 2001).

A leishmaniose é causada por *Leishmania* spp. Um protozoário cinetoplastídeo que vive como uma forma flagelada (promastigota) no intestino médio do vetor flebotomíneo. Depois da transmissão para um hospedeiro vertebrado, principalmente seres humanos e cães, são convertidas para a forma amastigota. Dependendo das espécies de *Leishmania*, a doença pode ser apresentada em diferentes formas clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral.

O óxido nítrico (NO), que é um radical livre gerado pela enzima óxido nítrico-sintetase (iNOS) por macrófagos, é uma molécula microbicida produzida para controlar a infecção (Richardson et al., 2008). Vários estudos demonstraram os efeitos antiparasíticos do NO nas leishmanias (Mauel e RANSJIN, 1997; BOCEDI et al, 2004). No entanto, observou-se que elas podem reduzir a produção de óxido nítrico endógeno (SALVATI et al, 2001; BOCEDI et al, 2004) e que alguns isolados são naturalmente resistentes a óxido nítrico (GIUDICE et al, 2007;. SANTOS et um., 2012). Também tem sido relatada a presença de isolados resistentes a drogas disponíveis para o tratamento da leishmaniose, tais como antimônio (CROFT et al., 2006). Além disso, são isolados resistentes a antinomias e NO, ao mesmo tempo, o que sugere uma via de resistência comum (HOLZMULLER et al., 2005).

Estudos utilizando uma abordagem metabolômica como ferramenta para analisar a diversidade de isolados de *Leishmania* estão emergindo (Scheltema et al., 2010). T'Kindt et al. (2010) caracterizou os isolados clínicos de *Leishmania donovani*

resistente ou não à estibogluconato de sódio. Eles constataram que a maior classe de metabolitos identificados foi a de lípidos e que as diferenças no conteúdo de fosfolípidos e esfingolípidos eram as principais observadas entre os fenótipos. De acordo com Zhang e Beverley (2010), essas duas classes de lípidios, além de ser abundante, são essenciais para a virulência e viabilidade das leishmanias.

A análise de ácidos graxos é um meio de estudar os lipídeos. Piotrowska-Seget e Mrozik (2003) relataram que os ácidos graxos poli-insaturados são raros em membranas bacterianas e pode ser comum em eucariotos. De acordo com Adosraku et al. (1993), eles representam uma grande proporção dos lipídeos totais de leishmania. Além disso, Alloatti e Uttaro (2011) enfatizaram o papel dos ácidos graxos poli-insaturados na manutenção celular, especialmente em relação as membranas dos tripanossomatídeos.

Interessantemente, foi demonstrado que em *L. donovani* os ácidos graxos derivados de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina eram diferentes em estirpes resistentes a drogas quando comparados aos sensíveis. Além disso, demonstrou-se que os ácidos graxos poli-insaturados gerados a partir de fosfatidilcolina estão presentes em maiores quantidades nos isolados resistentes ao antimonial do que nos sensíveis (TKDINT et al., 2010).

Atualmente, os ácidos graxos têm sido utilizados como biomarcadores de diferentes grupos de microrganismos, tais como fungos, bactérias, actinomicetos e outros. Os ácidos graxos 11Me19: 1 e 18:2  $\omega$ 6, 9 podem ser utilizados como biomarcadores para *Vibrio cholera* (GUCKERTET al, 1986.). Os ácidos graxos são também capazes de indicar biomarcadores para insuficiência de alimentos ou fase estacionária de crescimento em bactérias (GUCKERT et al., 1986; Piotrowska-Seget e Mrozik, 2003). Além disso, são moléculas-chave capazes de diferenciar uma condição clínica como resistência a drogas nos parasitas infecciosos (Mohanty et al., 2012).

Portanto, clinicamente, os biomarcadores podem ajudar a identificar um organismo patogênico carregando resistência a determinado agente quimioterápico. Portanto, para tornar o tratamento mais eficaz, um biomarcador específico pode levar a uma melhor decisão terapêutica, a respeito das drogas candidatas e as suas indicações. Assim, a nossa hipótese é a de que os isolados de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* resistentes ao antimônio e ao NO ou sensíveis podem apresentar diferentes perfis de ácidos graxos que podem conduzir à identificação de um biomarcador de resistência nestes organismos. Neste estudo, os perfis de ácidos

graxos de isolados resistentes e sensíveis a antimônio (Glucantime®) e óxido nítrico (NO) de *L. chagasi* e *L. amazonensis* foram realizados utilizandoos procedimentos ELFAME, PLFA e MIDI.

## Métodos

### 1) Parasitas

Os isolados de *Leishmania chagasi* (n = 10) e *Leishmania amazonensis* (n = 2) sensíveis e resistentes ao óxido nítrico e antimônio pentavalente (Glucantime®) foram selecionados a partir do banco leishmania do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe (UFS) (Tabela 1). *L. chagasi* foram isolados a partir de pacientes com leishmaniose visceral do hospital UFS. Os isolados de *L. amazonensis* foram obtidos a partir de um banco de leishmania do Laboratório de Imunologia do HUPES, Universidade Federal da Bahia. Todos os parasitas foram adquiridos através da colaboração com o Professor Roque Almeida, da Universidade Federal de Sergipe, Brasil. A viabilidade de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* foi previamente determinada por Giudice et al. (2007) e Santos et al. (2012), respectivamente. A viabilidade de *L. chagasi* ao antimônio foi caracterizada por Micheli Luize Barbosa Santos (dados não publicados).

Tabela 1. Caracterização de isolados de *L. chagasi* e *L. amazonensis* quanto a resistência /sensibilidade ao NO e antimonial.

Isolados		NO	Antimonial
<b><i>L. chagasi</i></b>	HU UFS 02	-	-
	HU UFS 07	-	-
	HU UFS 09	+	+
	HU UFS 14	+	+
	HU UFS 15	+	+
	HU UFS 17	-	-
	HU UFS 23	+	+
	HU UFS 49	+	+
<b><i>L. amazonensis</i></b>	LTCP 9667	-	+
	LTCP 10432	+	+

(+) Resistente; (-) sensível.

## 2) Condições de crescimento do parasita e preparo das amostras

Promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* foram descongelados e cultivados em ágar sangue bifásico NNN (Novy-MacNeal-Nicolle). Em seguida, as culturas foram iniciadas com um inóculo de  $1 \times 10^5$  promastigotas em meio Schneider suplementado com soro fetal bovino FBS (20%) inativado pelo calor e penicilina (1%). Eles foram mantidos numa incubadora a  $24 \pm 1$  °C até a fase estacionária de crescimento.

## 3) Extração de ácidos graxos

As formas promastigotas em fase estacionária de crescimento ( $5 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup> em 50 mL) foram centrifugadas a 2608 x g/ 4 °C/ 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com PBS (tampão salina fosfato). Subsequentemente, as amostras foram liofilizadas e as células utilizadas na extração de ácidos graxos. Todas as análises foram realizadas em triplicata para o crescimento e analítica.

### 3.1.) MIDI procedimento de extração comercial dos ácidos graxos totais (MIDIFA)

O procedimento MIDI seguiu os passos descritos por Sasser (1990). Resumidamente, as amostras liofilizadas foram tratadas com uma solução de NaOH M 3,75 (água: metanol, 1:1), agitada em vórtex e aquecida durante 30 min em banho maria. Após a incubação, uma mistura de 6 M de ácido acético e metanol (1:0.85) (2 mL) e hexano (3 mL) foi adicionada aos tubos, seguida de homogeneização e centrifugação (2608 xg/10 min/10 ° C). A fase orgânica foi aspirada e foi adicionado NaOH 0,3 M (1 mL) com subsequente agitação em vórtex. As amostras foram secas em atmosfera de nitrogênio ultrapuro e ressuspensas em hexano (270 mL).

### 3.2.) Ester ligados ácidos graxos (ELFA)

Este método seguiu os passos de Schutter e Dick (2000) e resulta na formação de FAMES de todos os ácidos graxos éster ligados presentes nas células. Para este procedimento, células foram adicionado 3,3 mL de uma solução metanólica de KOH (0,2 M) no pellet de células. As amostras foram incubadas em banho maria (37 °C) por 60 minutos, e submetidas ao vórtex durante 15 s a cada 15 min durante todo o período de incubação. Subsequentemente, 2ml de ácido acético (1M) foram adicionados em cada

amostra, e o conteúdo homogeneizado utilizando um vórtex durante 5 min. Após a adição de 2,2 ml de hexano, a homogeneização foi repetida, seguida por um intervalo de 10 minutos para separação das fases. As amostras foram centrifugadas (480 xg/10 min/10 °C) e a fração de lipídeos removida e seca sob atmosfera de nitrogênio ultrapuro. Mais hexano (250µL) foi adicionado e as amostras foram novamente homogeneizadas.

### 3.3.) Fosfolípidos ácidos graxos (PLFA)

Este procedimento seguiu a extração de lipídios totais de Bligh e Dyer (1959). Por este método, as amostras foram primeiramente preparadas para a extração de lipídeos totais. Inicialmente, os pellets de células foram dissolvidos com tampão fosfato 100 mM (2 mL), metanol (5 mL) e clorofórmio (2,5 mL), agitados em incubadora durante 2 horas e centrifugados (805 xg / 12 min/10 ° C). Em seguida, eles foram filtrados em papel Whatman # 1 sobre funis de vidro. Metanol (5 mL) e clorofórmio (2,5 mL) foram adicionados mais uma vez, e as amostras foram homogeneizadas em vórtex - este passo foi repetido mais uma vez. NaCl 2 M (7,5 mL) foi adicionado e a fase de clorofórmio foi transferida e seca em nitrogênio ultrapuro.

Em segundo lugar, foi feita a separação de lipídios com colunas de sílica seguindo os passos de Butler et al. (2003). Os lipídeos secos foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio e carregado nas colunas. A fase neutra foi removida com clorofórmio, os glicolípidos com acetona e os fosfolípidos, a fração de interesse, com metanol. O processo de secagem foi repetido.

Por último, os fosfolípidos secos foram dissolvidos em metanol: tolueno 1:1 (1 mL) com o vórtice. A adição de KOH a 0,2 M (1 mL) ocorreu e as amostras foram aquecidas em banho maria (38-48 ° C) durante 15 min. Em seguida, adicionou-se água deionizada (2 mL), ácido acético 1 M (0,3 mL) e hexano (0,5 mL) com homogeneização em vórtex. Após a separação das fases, a fração de hexano foi removida e a mesma quantidade de hexano foi adicionada e removida por duas vezes. O extrato em hexano foi seco sob atmosfera de nitrogênio ultrapuro e os ésteres metílicos foram redissolvidos em hexano (270 mL).

#### 4) *Análise dos FAMES*

As análises dos FAMES foram realizadas num Cromatógrafo Gasoso Perkin Elmer Clarus 500 e foram programadas nas seguintes condições para todos os experimentos: corrida com temperatura de 120-270 ° C com um aumento de 4 ° C por minuto; temperatura do injector de 220 ° C e temperatura do detector de 280 ° C. Além disso, utilizou-se a coluna Perkin Elmer Elite-5 (Crossbond difenil 5% - 95% de dimetil-polissiloxano, Cat # N9316076; Serial # 862923).

#### 5) *Processamento de dados e análise estatística*

A análise de ácidos graxos foi realizada pelo programa disponível no cromatógrafo a gás, o navegador TotalChrom - Clarus 500. O perfil de ácidos graxos de cada amostra foi inferido a partir de técnica de ordenação multivariada. Antes da ordenação das massas molares de cada ácido graxo (FAMES) de uma amostra (representada como cromatograma pico), elas foram relativizadas pela soma dos pesos de todos os ácidos graxos presentes na mesma amostra. Assim, os FAMES foram convertidos em percentagem molar de picos totais (% mol). Os perfis de ácidos graxos de isolados de *Leishmania* foram então analisados por escalonamento multidimensional não métrico de (NMS) (MCCUNE e GRACE, 2002) usando o programa PC-ORD (MJM Software Design, Gleneden Beach, OR, EUA). O teste T verifica a hipótese de que a composição de ácidos graxos difere entre as espécies e os isolados de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao NO e ao antimónio e um teste multivariado de hipóteses para a não diferença entre tratamentos (procedimento de permutação multirrespostas, MRPP) (Mielke e BERRY, 2000) foi usado. Por fim, a Análise de Indicadoras de Espécies (ISA) foi utilizada na identificação de um ácido graxo específico a ser usado como um biomarcador para isolados resistentes ou sensíveis ou para identificar um biomarcador de espécies (Dufrene, M.; Legendre, P., 1997). A ISA fornece um valor indicador (IV) variando de 0-100, que exprime o grau de relação entre o pico (ácido graxo) para cada grupo (espécie ou resistência/sensibilidade). Este valor é o produto da abundância relativa de FAMES (quantidade de FAME num grupo dada a sua quantidade em todos os grupos) e relativa (número de amostras em que o FAME foi detectado em relação ao número total de amostras dentro de um dado grupo). IVs foram testados para a significância estatística utilizando um procedimento de aleatorização (Teste de Monte Carlo).

## 6) *Espectrometria de Massa*

A análises de GC/MS foram realizadas utilizando um GC-MS/FID (GC-2010 Plus; GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx ®-5MS Restek (5% de poli-siloxano-difenil-dimetil-95%) de 30 mx 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.), de 0,25 µm de espessura de filme a um fluxo constante de hélio (99,999%), com uma taxa de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. Foi usado um volume de injeção de 0,5 µL (5 mg.mL<sup>-1</sup>), com uma razão de divisão de 1:10. A programação da temperatura do forno utilizada foi de 50 °C (isotérmica durante 1,5 min), com um aumento de 4 °C / min até 200 °C, em seguida a 10 °C /min até 250 °C, terminando com 5min de isoterma a 250 ° C.

Os dados de MS e FID foram adquiridos simultaneamente usando um sistema de separação de detector, a taxa de divisão de fluxo foi de 4:1 (MS: FID). Um tubo restritor de 0,62 m x 0,15 milímetros d.i. (coluna capilar) foi utilizado para conectar o divisor ao detector de massa; um tubo restritor de 0,74 mx 0,22 milímetros d.i. foi utilizado para conectar o divisor ao detector FID. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura da fonte iônica foi de 200 °C. Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV, com uma taxa de varredura de 0,3 s, e os fragmentos foram detectados no intervalo de 40-350 Da. A temperatura do FID foi ajustada para 250 °C, e os fornecimentos de gás ao FID foram: ar sintético, hidrogênio, fluxo de hélio com taxas de 30, 300 e 30 ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente. A quantificação de cada componente foi calculada por normalização da área de pico gerada no FID (%). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos de GC e foram dispostas por ordem de eluição a partir da GC.

A identificação dos componentes foi feita com base na comparação com padrões de Bame, SUP 37 da Supelco ® e PUFA a partir de Sigma ®. Também foram usadas as três bibliotecas do equipamento, WILEY8, NIST107 e NIST21 que permitiu a comparação de dados espectrais com as contidas nas bibliotecas, utilizando um índice de similaridade de 80%.

## Resultados

Os experimentos foram realizados com oito isolados de *Leishmania chagasi* e dois de *L. amazonensis*, classificados de acordo com a Tabela 1. A viabilidade dos isolados foi realizada para o NO e antimônio, confirmando o exposto por Holzmuller et al. (2005) de que existe uma alta correlação entre a resistência do NO e de antimônio. Outros estudos também mostraram que existem isolados resistentes ao NO e drogas antimoniais ao mesmo tempo (Croft et al, 2006,.. Giudice et al, 2007; HOLZMULLER et al, 2006,.. Santos et al, 2012 e T ' Kindt et al., 2010). Santos et al. (2012) também observaram que os isolados de *L. chagasi* refratários ao tratamento com antimônio apresentaram maior resistência ao NO. Há relatos de vias comuns às ações do NO e dos antimoniais. Sudhandiran e Shaha (2003) sugeriram que a atividade dos antimoniais pode estar diretamente relacionada com a indução de compostos tais como o NO. Holzmuller et al. (2005) afirmam que alguns alvos bioquímicos, tais como grupos tiol, são comuns aos mecanismos de resistência ao antimônio e ao NO.

Os isolados foram cultivados até a fase estacionária de crescimento para determinar o perfil de ácidos graxos. Os três métodos utilizados para produzir os FAMES diferem na extração. Os ELFAs com base em uma metanólise alcalina branda direta das amostras (SCHUTTER e DICK, 2000). No tocante do PLFA, os lipídeos totais são extraídos em primeiro lugar, em seguida, o extrato é fraccionado nas três porções lipídicas e os FAMES são produzidos diretamente forma a fracção fosfolipídica. Já o MIDIFA difere porque usa saponificação /metanólise ácida (SASSER, 1990; CAVIGELLI, ROBERTSON, 1995). Nos dois primeiros métodos, os FAMES obtidos são derivados de ácidos graxos com ligações do tipo éster de três classes de lipídeos, já no MIDIFA outros tipos de ácidos graxos podem ser extraídos como por exemplo aqueles unidos por ligações éter (SASSER, 1990; CAVIGELLI e ROBERTSON, 1995).

A conversão de ácidos graxos em FAMES - formas mais volátil - é necessária para a identificação de ácidos graxos em cromatografia em fase gasosa. Antes da ordenação do NMS, a análise dos picos no cromatograma foi realizada pela relativização da área de cada pico pela área do pico do ácido graxo 16:00 (ácido palmítico). O ácido palmítico foi identificado utilizando padrões como PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) e BAME (mistura de ésteres metílicos bacterianos). Os picos analisados tinham valores mínimos de integração equivalente a 4% da área de 16:0.

Apenas os picos eluidos entre os tempos de retenção de 10,6 e 33 minutos foram incluídos na análise multivariada.

Para a identificação dos outros picos, foi realizada uma espectroscopia de massa (MS), já que ainda não há nenhum padrão comercial específico para identificação de ácidos graxos de leishmania. A Figura 1 mostra o cromatograma de ésteres metílicos de ácidos graxos resultantes da cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS) a partir de todas as amostras de MIDI. A Tabela 2 segue com a identificação dos picos.

Tabela 2. Metil ésteres de ácidos graxos resultates da análise MIDI por GC-MS da biomassa de todos os isolados.

Pico	Tempo de Retenção	Composto – Ácido Graxo	(%) GC-MS	(%)GC/FID
1	11.515	Metil dodecanoato (C12: 0) - ácido láurico	0.08	0.0792
2	13.175	Metil tridecanoate (C13: 0)	0.07	0.0638
3	16.880	Metil tetradecanoato (C14: 0) - ácido mirístico	2.41	2.3182
4	18.570	Metil pentadecanoato (C15: 0) - ácido pentadecilo	3.92	3.7191
7	21.570	Cis-9-metil-hexadecanoato (C16: 1 δ9c) - ácido palmitoleico	0.11	0,1607
10	22.115	Metil hexadecanoato (C16: 0) - ácido palmítico	2.56	2.3601
11	23.680	15-metil-metil hexadecanoato (C16: 0i)	1.83	1.7519
13	24.595	Metil heptadecanoato (C17: 0) - ácido margárico	0.87	0,7812
14	26.005	6,9,12-metil octadecatrienoato (C18: δ6c 3, 9c, 12c) -	20.34	21.4975
15	26.370	γ linolênico-ácido	12.44	12.4524
16	26.525	Cis-9,12-metilo octadecatrienoato (C18: 2 δ9c, 12c) - O ácido linoleico	15.14	16.1968
17	26.605	Cis-9-metil octadecatrienoato (C18: 1 δ9c) - ácido oléico	0.62	-----
18	27.075	Trans-9-metil octadecatrienoato (C18: 3 δ9t12t15t)	10.51	10.3550
22	29.000	Octadecanoato de metila (C18: 0) - ácido esteárico	12.94	11.5237
23	28.460	Cis-9, 10-metileno-metil octadienoato (C19: 0 cy9c)	0.09	0.0319
24	30.145	Metil nonadecanoato (C19: 0)	0.10	0.0733
27	31.895	Cis-5,8,11,14-metil eicosatetranoato (C20: 4 δ5c, 8c, 11c, 14c) - ácido araquidónico	0.15	0.1377
31	36.425	Metil eicosanoato (C20: 0) - ácido araquídico	1.66	1.8845

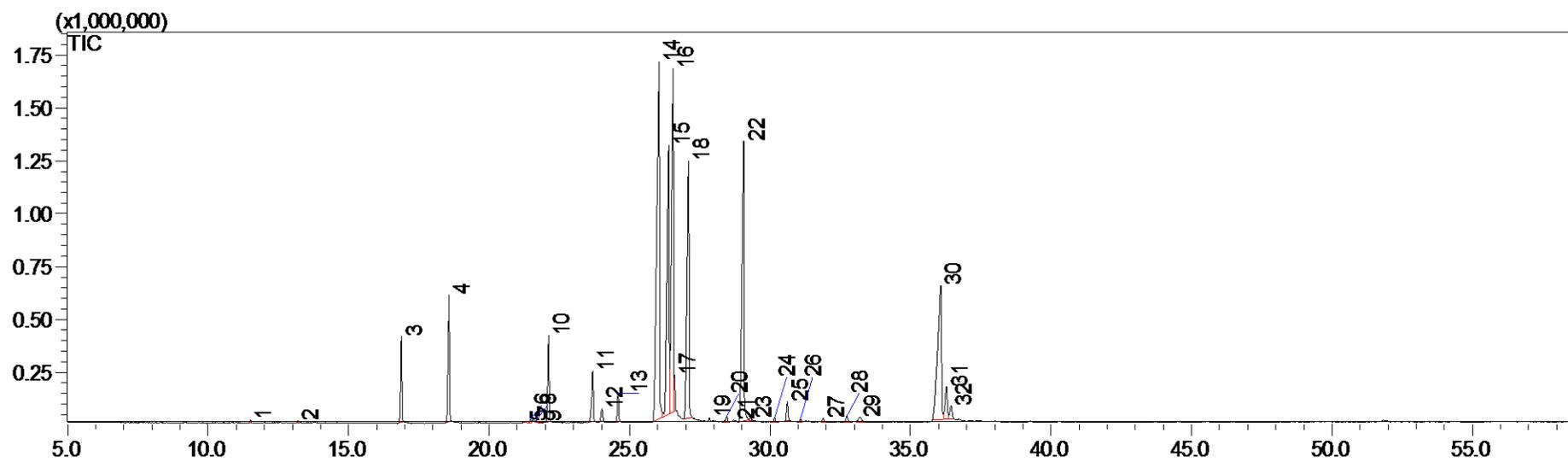


Figura 1. Cromatograma GC-MS de todas as amostras do MIDI.

## MIDIFA

Para estas análises, cada isolado estava em quadruplicata (amostras A, B, C e D). Exceto o isolado HVE SE 17, cuja amostra A foi perdida durante os procedimentos, e o isolado LTCP 9667, cuja amostra A foi um outlier. Assim, as análises foram realizadas com 38 amostras no total e foram obtidos 44 ésteres metílicos de ácidos graxos.

A análise de perfil de NMS MIDIFA foi realizada. Cada ponto (score) na ordenação representa todos os ácidos graxos de cada isolado. Correlações de Pearson entre os valores das variáveis e os escores dos isolados (determinado por análise multivariada) foram utilizadas para caracterizar as principais variações ao longo dos eixos. Os scores das variáveis expressam a tendência central e o intervalo de valores para estas variáveis entre as amostras.

A Figura 2 mostra o gráfico resultante da Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMS) da análise MIDI agrupando os isolados de acordo com a sensibilidade ao NO/ antimonial. Embora os isolados pareçam estar sobrepostos, há diferenças estatisticamente significativas na composição de ácidos graxos entre isolados sensíveis e resistentes ao NO/ antimônio quando *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram analisados em conjunto. Isso pode ser claramente observado através dos (Procedimento de Permutação Multi Resposta) MRPP cujas estatísticas mostraram significância inferior a 0,04%. Da variabilidade total dos dados, 86% foi explicada por ordenação, sendo 38,8% e 47,2% da diversidade de ácidos graxos representados ao longo dos eixos 1 e 2, respectivamente.

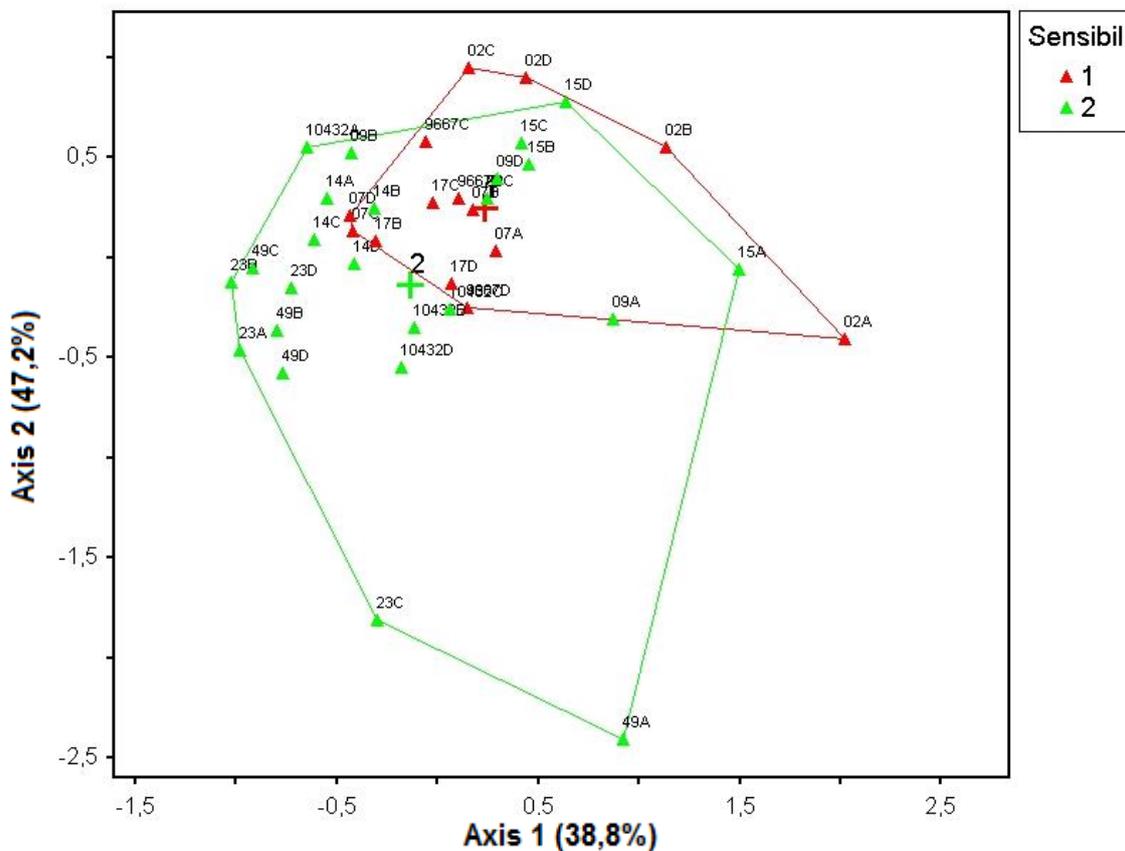


Figura 2. Representação NMS da distância entre as amostras de acordo com a composição MIDIFA separando os isolados de resistentes e os sensíveis ao NO/ antimônio. As linhas contínuas abrangem os grupos de estudo: Fenótipos de *L. chagasi* e *L. amazonensis* resistentes ao NO/ antimônio estão representados por símbolos verdes, enquanto os sensíveis estão por triângulos vermelhos. A proporção da variância explicada por cada eixo é baseada na correlação (R entre a distância no espaço reduzido do NMS e do espaço original, que é relatada após a designação cada eixo). Teste MRPP:  $p = 0.00036787$ ;  $A = 0,05103330$ .

Uma comparação do perfil de ácidos graxos mostra ainda que existe uma variabilidade nos perfis de ácidos graxos de espécies de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (Figura 3). Há uma concentração de scores, indicando distinção entre os perfis FAMES.

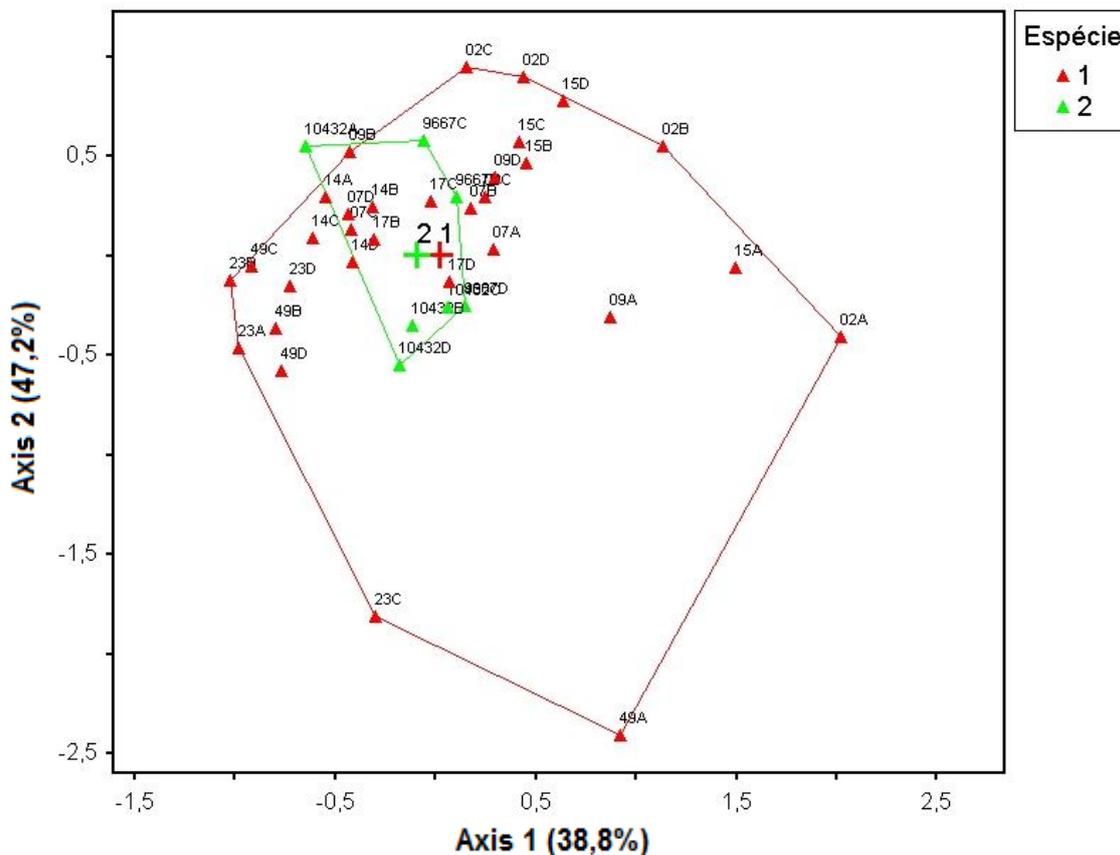


Figura 3. L. Representação gráfica da NMS de *L. amazonensis* vs *L. chagasi* agrupando as espécies de acordo com a composição MIDIFA. As linhas contínuas abrangem os grupos de estudo: *Leishmania chagasi*, símbolos verdes, e *L. amazonensis*, triângulos vermelhos, isolados. A proporção da variância explicada por cada eixo é baseada na correlação (R entre a distância no espaço reduzido do NMS e do espaço original, que é relatada após a designação cada eixo). MRPP teste:  $p = 0.00489206$ ;  $A = 0,03432629$ .

Não obstante, existe uma maior variabilidade na organização dos dados quanto as duas variáveis (sensibilidade ao NO/ antimônio e espécies), como mostrado na Figura 4. Também se pode observar, uma distinção superior dos perfis que foi considerada significativa pelo teste MRPP.

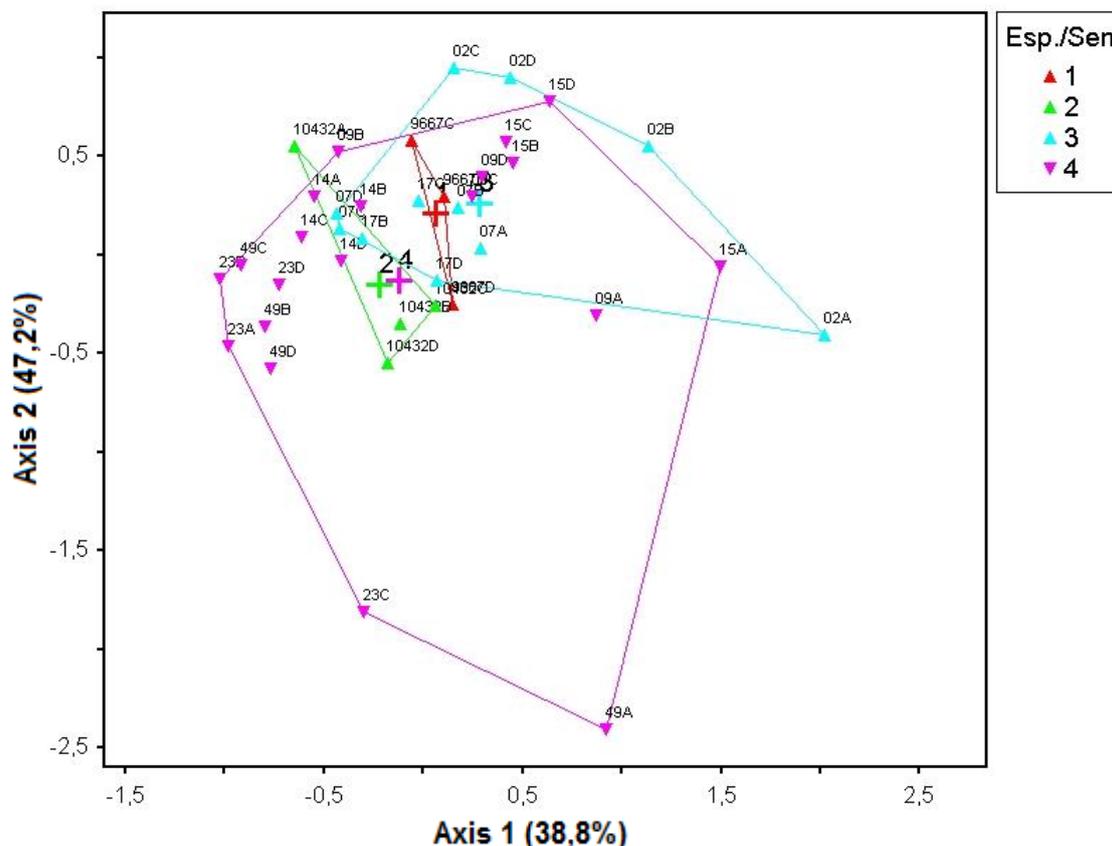


Figura 4. Representação gráfica do NMS da distância entre as amostras de acordo com a composição MIDIFA, agrupando os isolados de acordo com a espécie e também a sensibilidade ao NO / antimônio. Os triângulos representam os isolados: vermelho = sensível *L. amazonensis*; verde = resistente *L. amazonensis*, rosa = resistente *L. chagasi*, azul = sensível *L. chagasi*. A proporção da variância explicada por cada eixo é baseada na correlação (R entre a distância no espaço reduzido do NMS e do espaço original, que é relatada após a designação cada eixo). MRPP teste:  $p = 0.00009271$ ;  $A = 0,07796919$ .

Já que os perfis MIDI de ácidos graxos foram significativamente diferentes entre *L. amazonensis* e *L. chagasi* e entre isolados resistentes ou não ao NO/ Glucantime®, uma análise indicadora de espécies foi realizada para cada variável (sensibilidade ao NO/ antimônio e espécies). Esta análise foi utilizada para identificar os ácidos graxos responsáveis por uma maior variabilidade entre os fenótipos. Na tabela 3, as diferenças mais expressivas de ácidos graxos estão listadas.

Tabela 3. Valores indicadores do MIDI com relação a sensibilidade ao NO/antimônio e as espécies.

Ácido Graxo/ Tempo de Retenção	Valor Indicador (IV)		Grupo Expressivo	p*
18:1 $\delta$ 9c	63	34	NO Sensitive	0.0002
32.88	24	63	NO Resistant	0.0038
20.28	15	71	<i>L. amazonensis</i>	0.0006
20.84	0	74	<i>L. amazonensis</i>	0.0006

\*Teste Monte Carlo de significância.

O ácido graxo 18:01  $\delta$ 9c, ácido oleico, está aumentado em isolados sensíveis (p <0,001), ao passo que um pico ainda não identificado mostrou a tendência oposta (p <0,01). Em relação aos valores indicadores para a diferenciação de espécies, dois ácidos graxos ainda não identificados (20,28 e 20,84) foram aumentados nos isolados de *L. amazonensis* (p <0,001).

#### ELFA e PLFA

Para as análises ELFA 30 amostras (cada isolado estava em triplicata) foram utilizadas e 49 ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos. Para as análises de PLFA foram utilizadas 40 amostras (cada isolado em quadruplicata) e 40 ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos. A análise dos perfis de ácidos graxos, usando estas duas técnicas mostrou que não existe diferença nos perfis de ácidos graxos de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, e também entre os isolados resistentes e sensíveis ao NO/ antimônio. Os resultados de MRPP da ordenação do NMS das análises de ELFA e PLFA não obtiveram resultados estatisticamente significativos, como visto na tabela 4.

Tabela 4. Resultados do MRPP da ordenação NMS das análises ELFA e PLFA de isolados *L. chagasi* e *L. amazonensis* relativas à resistência e sensibilidade para NO/ antimônio, as espécies e ambas características analisadas ao mesmo tempo.

	ELFA		PLFA	
	P	A	P	A
Sensibilidade	0.26007990	0.00482760	0.30770480	0.00172086
Espécie	0.01837509	0.04369502	0.31499664	0.00184066
Sensibilidade/Espécie	0.08801758	0.04781894	0.34227467	0.00637848

## Discussão

Os ácidos graxos são normalmente usados como biomarcadores para os perfis de comunidades microbianas ou para identificação de bactérias (SASSER, 1990; SCHUTTER e DICK, 2000; BUTLER et al, 2003,.. LANOISELET et al, 2005). Os perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de isolados de *L. amazonensis* e *L. chagasi* resistentes e sensíveis ao Glucantime® e óxido nítrico foram produzidos por três métodos diferentes de extração de ácidos graxos: ELFA, PLFA e MIDI. Assim, os resultados apresentados mostram que os perfis de MIDI FAMES são diferentes entre os isolados de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e resistentes ou não a NO/ antimonial. O procedimento MIDI foi desenvolvido originalmente a partir de células bacterianas FAMES visando a identificação de estirpes com base no seu perfil de lipídeos. Este método também parece ser útil para diferenciar espécies de *Leishmania* e isolados com fenótipos diferentes. Diferenças nos perfis de ácidos graxos de fosfolipídios em isolados de *L. donovani* sensíveis e resistentes ao antimonial também foram relatadas por T'Kindt et al. (2010) utilizando uma técnica diferente. Anteriormente, Rakotomanga et al. (2005) já tinha relatado as alterações na composição lipídica de promastigotas de *L. donovani* resistentes ao antimonial quando comparados com os sensíveis.

Interessantemente, não houve diferença estatística entre os perfis de ácidos graxos obtidos por PLFA, que extrai apenas fosfolipídios ácidos graxos e ELFA, que extrai os ácidos graxos formam lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídeos. No entanto, os perfis de ácidos graxos obtidos por cada um dos métodos de extração foram diferentes. Estas diferenças são esperadas, uma vez PLFA dá perfis de FAMES exclusivamente de fosfolipídios. Além do mais, a quantidade dos ácidos graxos

extraídos por MIDIFA e ELFA é diferente. ELFA extrai os FAMES de lipídios das classes: lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídeos (SCHUTTER e DICK, 2000). Por outro lado, o MIDIFA também extrai dimetilacetais (derivados de ligações éter) e outros compostos que podem ser derivados a partir do ácido gordo de esfingolipídeos (KATES, 1986). Isto acontece porque o MIDI usa as reações de saponificação / metanólise ácida, enquanto ELFA baseia-se na metanólise alcalina branda.

É importante salientar que os perfis de ácidos graxos analisados por NMS enfatizam as diferenças na composição relativa de ácidos graxos presentes nas amostras, em vez de diferenças na quantidade sua absoluta.

A técnica MIDIFA utilizada neste estudo pode ter analisado alguns dos esfingolipídeos resíduos de ácidos graxos presentes nas moléculas ainda não identificadas. Os esfingolipídeos são componentes ubíquos de membranas eucarióticas, onde eles têm papéis na fisiologia da membrana, sinalização celular e formação de rafts lipídicos (ZHANG et al., 2009, ZHANG et al., 2010). Estes achados sugerem a importância de SLs como alvos moleculares e eles sugerem que os SLs devem ser estudados cuidadosamente e que possivelmente poderão proporcionar um biomarcador ou alvo de drogas para tratamento da leishmaniose.

Uma vez que os perfis de ácidos graxos MIDI foram capazes de diferenciar as duas espécies de *Leishmania* e os isolados pela sua viabilidade NO/antimônio, realizamos uma análise do ISA para procurar os ácidos graxos que podem ser relevantes quanto as diferenças dos perfis. De fato, estas análises revelaram que o ácido graxo 18:01  $\Delta^9$ c (ácido oleico) foi aumentado em isolados sensíveis, enquanto que o pico não identificado (com tempo de retenção de 32,88) mostrou a tendência oposta. A perspectiva é que estes ácidos graxos possam ser utilizados como biomarcadores para identificar isolados de leishmania quanto a sensibilidade ao NO e ao antimônio.

Também foi demonstrado que outros dois ácidos graxos ainda não identificados (picos retenções tempos de 20,28 e 20,84) são mais expressivos em *L. amazonensis*. Deste modo, estes ácidos graxos são potenciais candidatos para o trabalho como biomarcadores para identificação *L. amazonensis*. No entanto, devido ao pequeno número de isolados de *L. amazonensis* disponíveis não é possível garantir que estes picos terá o mesmo comportamento em um grande número de isolados. Assim, mais estudos são necessários para confirmar estes resultados.

Em conclusão, além da diferenciação de espécies de leishmania, estes achados são importantes porque podem fornecer biomarcadores para a resistência e sensibilidade ao NO/ antimônio. Os biomarcadores devem ajudar a introduzir a terapia correta para pacientes mais rapidamente que hoje e fornecem novos insights para criar tratamentos mais eficazes contra as leishmanioses.

## Referências

ADOSRAKU, R. K.; ANDERSON, M. M.; ANDERSON, G. J.; CHOI, G.; CROFT, Simon L.; YARDLEY, Vanessa; PHILLIPSON, J, David; GIBBONS William A. Proton NMR profile of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 62. P. 251-262. 1993.

ALLOATTI, A.; UTTARO, A. D. Highly specific methyl-end fatty-acid desaturases of trypanosomatids. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V. 175. P. 126-132. 2011.

AMATO V. S.; ANDRADE H. F.; DUARTE M. I. S. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**. V. 85. P. 39-49. 2003.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Ottawa. V. 37. P. 911-917. 1959.

BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 315. P. 710-718. 2004.

BUTTLER, J. L.; WILLIAMS, M. A.; BOTTOMLEY, P. J.; MYROLD, D. D. Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 69. N. 11. P. 6793-6800. November 2003.

CAVIGELLI, M. A.; ROBERTSON, G. P.; KLUG, M. K. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. **Plant and Soil**. Holanda. V. 170. P. 99-113. 1995.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 19. N. 1. P. 111-126. Jan. 2006.

DUFRENE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for flexible asymmetric approach. **Ecological Monographs**. V. 63. P. 345-366. 1997.

DRUMMESLSMITH, J.; BROCHU, V.; GIRARD, I.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M. Proteome Mapping of the Protozoan Parasite *Leishmania* and Application to the Study of Drug Targets and Resistance Mechanisms. **Molecular & Cellular Proteomics**. V. 2. P. 146-255. 2003.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. T.; PEREIRA, J. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; HO, J. L.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**. V. 7. I. 7. 2007.

GUCKERT B., HOOD M. A., WHITE D.C. Phospholipid, ester-linked fatty acid profile changes in nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increase in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. **Applied Environmental Microbiology**. V. 52. P. 794-801. 1986.

HOLZMULLER, P.; HIDE, M.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. **Infection, Genetics and Evolution**. V.6. P. 187-97. 2006.

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Lower Nitric Oxide Susceptibility of Trivalent Antimony-Resistant Amastigotes of *Leishmania infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 49. P. 4406-4409. 2005.

KATES, M. **Techniques of Lipidology**. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. 1986.

LANOISELET, V. M.; COTHER, E. J.; COTHER, N. J.; ASH, G. J.; HARPER, J. D. I. Comparison of total cellular fatty acid analysis protocols to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R.oryzae-sativae*. **Mycologia**. V. 97. P. 77-83. 2005.

MAUEL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Experimental Parasitology**. V. 87. P. 98–111. 1997.

MCCUNE, B.; GRACE, J. B. **Analysis of Ecological Communities MjM Software Design**. Gleneden Beach, OR. 2002.

MIELKE, P.W.; BERRY, K.J. **Permutation Methods: a Distance Function Approach**. Springer-Verlag, New York. 2000.

MONHANTY, B. P.; BHATTACHARJEE, S.; PARIA, P.; MAHANTY, A.; SHARMA, A. P. Lipids Biomarkers of Lens Aging. **Applied Biochemical Biotechnology**. V. 169. I. 1. P. 192-200. 2012.

OLIVEIRA, M. C.; AMORIM, R. F. B.; FREITAS, R. A.; COSTA, A. L. L. Óbito em caso de leishmaniose cutaneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 38. N. 3. P. 258-260. 2005.

PIOTROWSKA-SEGET, Z.; MROSZIK, A. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community of Soil Microorganisms. **Polish Journal of Environmental Studies**. V. 12. N. 6. P. 669-675. 2003.

RAKOTOMANGA, M., SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. and LOISEAU, P. M. "Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 49. N. 7. P. 2677–2686, 2005.

RICHARDSON, A. R.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C. A Nitric Oxide-Inducible Lactate Dehydrogenase Enables *Staphylococcus aureus* to Resist Innate Immunity. **Science**. V. 319. 2008.

ROMÃO, P. R. T.; DIAS R. de O.; CRUZ, K. K.; MARQUES, F. C. de S.; MONTEIRO, M. C. **Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape**. V. 3. N. 1. 2007.

SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A.; VENTURINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1545. P. 357-366. 2001.

SANTOS, P. L.; COSTA, R. V.; BRAZ, J. M.; SANTOS, L. F.; BATISTA, A. C.; VASCONCELOS, C. R.; RANGEL, M. R.; JESUS, A. R.; MOURA, T. R.; LEOPOLDO, P. T.; ALMEIDA, R. P. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide**. V. 27. P. 67-71. Jun. 2012.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Tech. Note #101**. Newark, DE: Microbial ID. 1990.

SCHELTEMA, R. A.; DECUYPERE, S.; T'KINDT, R.; DUJARDIN, J-C.; COOMBS, G. H.; BREITLING, R. The potencial of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. **Parasitology**. V. 137. 2010.

SCHUTTER, M. E.; DICK, R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. **Soil Science Society of America Journal**. Madison. V. 64. V. 1659-1668. 2000.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. P. 485-497, 2012.

SILVA, J. B. Antimoniato de meglumia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 34. P.103-105. 2001.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**. V. 278. N. 27. P. 25120–25132. 2003.

T'KINDT, R.; SCHELTEMA, R. A.; JANKEVICS, A.; BRUNKER, K.; RIJAL, S.; DUJARDIN, J-C.; BREITLING, R.; WATSON, D. G.; COOMBS, G. H.; DECUYPERE, S. Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. V. 4. I. 11. 2010.

ZHANG, K.; BANGS, J. D.; BEVERLEY, S. M. Sphingolipids in parasitic protozoa. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 688. 2010.

ZHANG, K. and BEVERLEY, S. M. Phospholipid and sphingolip metabolism in *Leishmania*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V. 170. 2010.

ZHANG, O.; WILSON, M. C.; XU, W.; HSU, F.; TURK, J.; KUHLMANN, M.; WANG, Y.; SOONG, L.; KEY, P.; BEVERLEY, S. M.; ZHANG, K. Degradation of Host Sphingomyelin Is Essential for *Leishmania* Virulence. **PLOS Pathogens**. V. 5. I. 12. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). < <http://www.who.int/en/> > Accessed in June 2012.

## CAPÍTULO II

O seguinte artigo está organizado de acordo com as normas para submissão ao periódico *Parasitology Research* (Fator de impacto/ JCR: 2,149; Qualis A2 na Área de Ciências Agrárias 1).

### Fatty Acids Profiles in *Leishmania* spp. Isolates with Natural Resistance to Nitric Oxide and Trivalent Antimony

Alana Freire de Azevedo<sup>1</sup>, Jorge Luís de Lisboa Dutra<sup>1</sup>, Michele Luize Barbosa Santos<sup>2</sup>, Darlisson de Alexandria Santos<sup>3</sup>, Péricles Barreto Alves<sup>3</sup>, Tatiana Rodrigues de Moura<sup>2</sup>, Roque Pacheco de Almeida<sup>2</sup>, Marcelo Ferreira Fernandes<sup>4</sup>, Ricardo Scher<sup>5</sup>, Roberta Miranda Fernandes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, UFS, Av. Marechal Rondon, S/N, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, UFS, Rua Claudio Batista, S/N, CEP 49060-100, Aracaju, Sergipe, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, UFS, Av. Marechal Rondon, S/N, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

<sup>4</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Avenida Beira Mar 3250, CEP 49025-040, Aracaju, Sergipe, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, UFS, Av. Marechal Rondon, S/N, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

\* Corresponding author:

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, UFS, Av. Marechal Rondon, S/N, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil, Tel.: +55-79-21056843, fax: +55-79-21056414

E-mail address: robertafernandes@ufs.br

## Abstract

Fatty acids, especially those from phospholipids (PLFA), are essential membrane components, present in a relatively constant proportion in the biological membranes under natural conditions. However, under harmful growth conditions such as diseases, environmental changes and chemical exposure, the proportion of lipids may vary. Once these changes could be identified and reveal to be specific for such adverse situation, it could be used as a biomarker. Thus, the biomarkers can help to identify a virulence and resistance mechanism to a particular chemotherapeutic agent. Therefore, to make treatment more effective, a specific biomarker could lead to a better therapeutic decision. The objective of this study was to compare the fatty acid profiles of *L. chagasi* and *L. amazonensis* isolates resistant and sensitive to antimony (Glucantime®) and to nitric oxide (NO). Fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained from total lipids, ester-linked lipids and ester-linked phospholipids. FAMES were analyzed by chromatography and mass spectrometry. Differences in FAME profiles associated with species or resistance were assessed by non-metric multidimensional scaling, multiresponse permutation procedures and indicator species analyses. The isolates groups had different MIDI-FAME profiles. However, neither ELFA nor PLFA profiles differed between sensitive and resistant isolates. The fatty acid 18:1  $\delta^9c$  was increased in sensitive isolates ( $p < 0,001$ ), whereas an yet unidentified peak showed the opposite trend ( $p < 0,01$ ). We can conclude that these two fatty acids are potential biomarkers for NO and antimony resistance in *L. chagasi* and *L. amazonensis* and they can be helpful for therapeutical diagnosis.

**Keywords:** *Leishmania chagasi*; *L. amazonensis*; fatty acids; FAMES.

## Introduction

Leishmaniasis is a spectrum of diseases that affects over 12 million people worldwide, according to World Health Organization (WHO). It has large impacts on public health especially in developing countries. These are neglected diseases, and although affects thousands of people around the world, still lack effective treatments (ROMÃO et al., 2007). In addition, the first choice drug - the pentavalent antimonials - require cautious administration under clinical and laboratory monitoring, due to problems like toxicity (nephrotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity), and fatal arrhythmias or sudden deaths are described (AMATO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; SILVA, 2001).

Leishmaniasis are caused by *Leishmania* spp. A kinetoplastid protozoa that lives as a flagellate form (promastigote) in the midgut of the sandfly vector. After transmission to a vertebrate host, mostly humans and dogs, they are converted into the amastigote form. Depending on the *Leishmania* species, the disease can be presented in different clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral.

Nitric oxide (NO), which is a free radical generated by the nitric oxide synthase enzyme (iNOS) of macrophages, is a microbicidal molecule produced to control the infection (RICHARDSON et al., 2008). Several studies have demonstrated antiparasitic effects of NO on leishmanias (MAUEL and RANSJIN, 1997; BOCEDI et al., 2004). Nonetheless, it was observed that the leishmanias can reduce the production of endogenous nitric oxide (SALVATI et al., 2001; BOCEDI et al., 2004) and that some isolates are naturally resistant to nitric oxide (GIUDICE et al., 2007; SANTOS et al., 2012). It has also been reported isolates resistant to available drugs for the treatment of leishmaniasis, such as antimony (CROFT et al., 2006). In addition, there are isolates resistant to antimonies and NO at the same time, suggesting a common resistance pathway (HOLZMULLER et al., 2005).

Studies using metabolomics approach as a tool to analyze the diversity of leishmania isolates are emerging (SCHELTEMA et al., 2010). T'Kindt et al. (2010) characterized clinical isolates of *Leishmania donovani* resistant or not to sodium stibogluconate. They have found that the largest class of metabolites identified was lipids and differences in phospholipids and sphingolipids content were the main difference found between the phenotypes. According to Zhang and Beverley (2010), these two lipid classes, besides being abundant, are critical for virulence and viability in leishmanias.

Analysis of fatty acids is a mean of studying lipids. Piotrowska-Seget and Mrozik (2003) reported that polyunsaturated fatty acids are rare in bacterial membranes and may be

common in eukaryotes. According to Adosraku et al. (1993), they represent a large proportion of leishmania total lipids. Moreover, Alloatti and Uttaro (2011) emphasized the role of the polyunsaturated fatty acids in cellular maintenance, especially concerning trypanosomatids membranes.

Interesting, it was shown that in *L. donovani* the fatty acids from phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were different in drug resistant strains compared to sensitive ones. In addition, it was demonstrated that polyunsaturated fatty acids from phosphatidylcholine are present in higher amounts in isolates resistant to antimony than the sensitive ones (TKDINT et al., 2010).

Currently, fatty acids have been used as biomarkers of different groups of microorganisms such as fungi, bacteria, actinomyces and others. The fatty acids 11Me19:1 and 18:2 $\omega$ 6,9 can be used as biomarker for *Vibrio cholera* (GUCKERT et al., 1986). Fatty acids are also biomarkers able to indicate starvation or stationary phase growth in bacteria (GUCKERT et al.; 1986; PIOTROWSKA-SEGET and MROZIK, 2003). Besides, they are key molecules able to differentiate a clinical condition such as drug resistance in infectious parasites (MOHANTY et al., 2012).

Thereby, clinically, useful biomarkers can help to identify pathogenic organism carrying resistance to particular chemotherapeutic agent. Therefore, to make treatment more effective, a specific biomarker could lead to a better therapeutic decision, regarding candidate drugs and their indications. Thus, our hypothesis is that strains of *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* both antimony and NO resistant or sensitive can present different profiles of fatty acids which can lead to identification of a fatty acid resistance biomarker in these organisms. In this study the fatty acid profiles of *L. chagasi* and *L. amazonensis* isolates resistant and sensitive to antimony (Glucantime®) and to nitric oxide (NO) were performed using ELFAME, PLFA and MIDI procedures.

## Methods

### 1) Parasites

The isolates of *Leishmania chagasi* (n=10) and *Leishmania amazonensis* (n=2) sensitive and resistant to nitric oxide and pentavalent antimonial (Gluantime®) were selected from the leishmania bank of the Molecular Biology Laboratory of the Universidade Federal de Sergipe (UFS) Medicine Department (Table 1). The *L. chagasi* were isolated from patients with Visceral Leishmaniasis from the UFS hospital. *L. amazonensis* isolates were obtained from a leishmania bank of the Immunology Laboratory of HUPES, Universidade Federal da Bahia. All the parasites strains were acquired through collaboration with Professor Roque Almeida, Universidade Federal de Sergipe, Brazil. *Leishmania amazonensis* and *L. chagasi* viability to NO was previously determined by Giudice et al. (2007) and Santos et al. (2012), respectively. *L. chagasi* antimony viability was characterized by Micheli Luize Barbosa Santos (unpublished data).

Table 1. Characterization of *L. chagasi* e *L. amazonensis* isolates for resistance/sensitivity to NO and antimony.

Isolates		NO	Antimony
<i>L. chagasi</i>	HU UFS 02	-	-
	HU UFS 07	-	-
	HU UFS 09	+	+
	HU UFS 14	+	+
	HU UFS 15	+	+
	HU UFS 17	-	-
	HU UFS 23	+	+
	HU UFS 49	+	+
<i>L. amazonensis</i>	LTCP 9667	-	+
	LTCP 10432	+	+

(+) Resistant; (-) sensitive.

### 2) Parasite growth conditions and sample preparation

*L. chagasi* and *L. amazonensis* promastigotes were thawed and cultured in biphasic NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) blood agar. Then cultures were started with an inoculum of  $1 \times 10^5$  promastigotes in Schneider's Insect medium supplemented with heat inactivated fetal bovine serum FBS (20%) and penicillin (1%). They were kept in an incubator at  $24 \pm 1$  °C and growth until stationary phase

### 3) Fatty acids extraction

The promastigotes in stationary growth phase ( $5 \times 10^8$  cells.mL<sup>-1</sup> in 50 mL) were centrifuged at  $2608 \times g$  /  $4^\circ\text{C}$  /10 min. The supernatant was discarded and the pellet washed twice with PBS (phosphate-buffered saline). Subsequently, the samples were lyophilized and used to cell fatty acid extraction. All analyzes were performed in triplicate for growth and analytical.

#### 3.1.) MIDI commercial procedure extraction of total fatty acids (MIDIFA)

The MIDI procedure followed the steps described by Sasser (1990). Briefly, lyophilized samples were treated with NaOH 3.75 M solution (water: methanol, 1:1), vortexed and heated for 30 min in a water bath. After incubation a mixture of acetic acid 6M and methanol (1:0.85) (2 mL) and hexane (3 mL) was added to the tubes followed by homogenization and centrifugation ( $2608 \times g$ /10 min/ $10^\circ\text{C}$ ). The organic phase was aspirated and NaOH 0.3 M (1 mL) was added to it with subsequent vortexing. The samples were dried in ultrapure nitrogen and resuspended in hexane (270  $\mu\text{L}$ ).

#### 3.2.) Ester linked fatty acids (ELFA)

This method followed Schutter and Dick (2000) steps and results in the formation of FAMES from all the ester-linked fatty acids present in the cells. For this procedure, to the cell pellet was added 3.3 mL of a methanolic KOH solution (0.2 M). Samples were incubated in a water bath ( $37^\circ\text{C}$ ) for 60 min, and vortexed for about 15 s, every 15 min throughout the incubation period. Subsequently 2mL of acetic acid (1M) were added in each sample and the contents homogenized using a vortex for 5 min. After addition of 2.2 ml of hexane, the vortex step was repeated, followed by an interval of 10 minutes for separation of phases. The samples were centrifuged ( $480 \times g$ /10 min/ $10^\circ\text{C}$ ) and the lipid fraction removed and dried under ultrapure nitrogen atmosphere. An additional hexane (250 $\mu\text{L}$ ) was added and the samples were again homogenized.

#### 3.3.) Phospholipids fatty acids (PLFA)

This procedure followed Bligh and Dyer (1959) total lipids extraction. For this method the samples were firstly prepared to total lipid extraction. Initially, the cells pellet were dissolved with phosphate buffer 100 mM (2 mL), methanol (5 mL) and chloroform (2.5 mL), agitated in shaker for 2 h and centrifuged ( $805 \times g$  /12 min/ $10^\circ\text{C}$ ). Then they were filtered in Whatman #1 paper over glass funnels. Methanol (5mL) and chloroform (2.5 mL) were added

again and the samples were homogenized in vortex – this step was repeated one more time. NaCl 2M (7.5 mL) was added and the chloroform phase was transferred and dried in ultrapure nitrogen.

Secondly, the lipid separation was made by Butler et al. (2003) steps. It was done with silica columns. The dried lipids were dissolved with 1mL of chloroform and loaded in the columns. The neutral phase was removed with chloroform, the glycolipids with acetone and the phospholipids, our interest fraction, with methanol. The drying procedure was repeated.

Lastly, the dried phospholipids were dissolved with methanol: toluene 1:1 (1 mL) with the vortex. The addition of KOH 0.2 M (1mL) occurred and the samples were heated in water bath (38-48 °C) for 15 min. Then were added deionized water (2 mL), acetic acid 1 M (0.3 mL) and hexane (0.5 mL) with an homogenization in vortex. After the phases' separation, the hexane fraction was removed and the same amount of hexane was added and removed twice. The hexane extract was dried under ultrapure nitrogen and the methyl esters were redissolved in hexane (270 µL).

#### 4) *FAME analysis*

Fame analysis was carried out in a Perkin Elmer Clarus 500 Gas Chromatograph and were programed under the following conditions for all experiments: run temperature of 120-270 °C with an increase of 4 °C per minute; injector temperature of 220 °C and detector temperature of 280 °C. Furthermore, it was used the column Perkin Elmer Elite-5 (Crossbond 5% diphenyl – 95% dimethyl polysiloxane; Cat #N9316076; Serial # 862923).

#### 5) *Data processing and statistical analysis*

The fatty acids analysis was performed by the program available at gas chromatograph, the TotalChrom navigator - Clarus 500. The fatty acid profile of each sample was inferred from ordination technique multivariate. Prior to the ordination the molar masses of each fatty acid (FAMES) of a sample (shown as peak chromatogram), the samples were relativized by the sum of the weights of all fatty acids found in it. Thus the FAMES were converted to molar percentage of total peaks (mol%). The fatty acid profiles of Leishmania isolates were then analyzed by non-metric multidimensional scaling (NMS) (McCune and Grace, 2002) using the program PC-ORD (MJM Software Design, Gleneden Beach, OR, USA). The T test checks the hypothesis that the fatty acid composition differs among species and isolates of leishmania sensitive and resistant to NO or antimony and a hypothesis test of multivariate non-difference

between treatments (Multiresponse Permutation Procedure, MRPP) (MIELKE and BERRY, 2000) was used. Finally, to identify a specific fatty acid to use as a biomarker for resistant or sensitive isolates or to identify a species biomarker, it was used the Indicator Species Analysis (ISA) (Dufrene, M.; Legendre, P., 1997). The ISA provides an indicator value (IV) varying from 0-100, which expresses the degree of relationship of the peak (fatty acid) to each group (species or resistance/sensitivity). This value is the product of the FAME relative abundance (amount of FAME in a given group to its amount across all groups) and relative frequency (number of samples in which the FAME was detected relative to the number of total samples within a given group). IVs were tested for statistical significance using a randomization (Monte Carlo's Test) procedure.

#### *6) Mass Spectrometry*

The GC/MS analyzes were performed using a GC-MS/FID (GC-2010 Plus; GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with an autosampler AOC-20i (Shimadzu). The separations were carried out using a fused silica capillary column Rtx®-5MS Restek (5% polysiloxane-diphenyl-95%-dimethyl) 30 m x 0.25 mm internal diameter (d.i.), 0.25- $\mu\text{m}$  thick film at a constant flow of helium (99.999%) with a rate of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. It was used an injection volume of 0.5  $\mu\text{L}$  (5 mg.mL<sup>-1</sup>), with a split ratio of 1:10. The programming of the oven temperature used was from 50 °C (isotherm for 1.5 min), with an increase of 4 °C / min to 200 °C, then at 10 °C / min to 250 °C, finishing with a 5 min isotherm at 250 °C.

The MS and FID data were acquired simultaneously using a detector separation system, the flow split ratio was 4:1 (MS: FID). A restrictor tube of 0.62 m x 0.15 mm d.i. (capillary column) was used to connect the splitter to the detector MS; a restrictor tube of 0.74 m x 0.22 mm d.i. was used to connect the splitter to the FID detector. The injector temperature was 250 °C and the ion source temperature was 200 °C. Mass spectra were generated at 70 eV, a scan rate of 0.3 s scan, and the fragments detected in the range of 40-350 Da. FID temperature was adjusted to 250 °C, and the gas supplies to FID were synthetic air, hydrogen, helium flow rates of 30, 300 and 30 mL.min<sup>-1</sup>, respectively. The quantification of each constituent was estimated by normalizing the peak area generated in the FID (%). The concentrations of the compounds were calculated from the GC peak areas and are arranged in order of elution from the GC.

The identification of the components was made based on the comparison with patterns BAME, SUP 37 from Supelco® and PUFA from Sigma®. It was also used three libraries of the equipment, WILEY8, NIST107 and NIST21 that allowed the comparison of spectral data with those contained in the libraries using a similarity index of 80%.

## Results

The experiments were conducted with eight isolates of *Leishmania chagasi* and two of *L. amazonensis*, classified in accordance with Table 1. The viability of the isolates were performed to the NO and antimony confirming the exposed by Holzmuller et al. (2005) that there is a high correlation between the NO and antimony resistance. Other studies also showed that there are isolates resistant to the NO and antimonial drugs at the same time (CROFT et al., 2006; GIUDICE et al., 2007; HOLZMULLER et al., 2006; SANTOS et al., 2012 and T'KINDT et al., 2010). Santos et al. (2012) also observed that the isolates of *L. chagasi* refractory to treatment with antimony showed higher resistance to NO. There are reports of pathways common to the actions of NO and antimonials. Sudhandiran and Shaha (2003) suggested that the activity of antimonials could be directly related to the induction of compounds such as NO. Holzmuller et al. (2005) state that some biochemical targets, such as thiol groups, are common to the mechanisms of antimony and NO resistance.

The isolates were grown until stationary growth phase for determining the fatty acid profile. The three methods used to produce the FAMES differ in extraction. The ELFA is based in a directly mild alkaline methanolysis of samples (SCHUTTER and DICK, 2000). Concerning the PLFA, the total lipids are first extracted, then the extract is fractionated in those three lipid moieties, at last the FAMES are directly produced from the phospholipid fraction. The MIDIFA differs because it uses saponification/ acid methanolysis instead (SASSER, 1990; CAVIGELLI, ROBERTSON, 1995). In the first two methods the FAMES obtained are derived from fatty acids with ester bonds, while the last one also extracts other types of fatty acids as the specimens linked by ether bonds (SASSER, 1990; CAVIGELLI and ROBERTSON, 1995).

The conversion of fatty acids in FAMES that are more volatile forms is necessary for identification of fatty acids in gas chromatography. Before NMS ordination the analysis of the peaks in chromatogram was performed by the area relativization of each peak by the peak area of the fatty acid 16:0 (palmitic acid). The palmitic acid was identified using standards such as PUFA (polyunsaturated fatty acids) and BAME (bacterial acid methyl ester mix). The analyzed peaks that had minimum values of integration equivalent to 4% of the area of 16:0. Only peaks eluted between the retention times 10.6 and 33 minutes were included in the multivariate analysis.

For the other peaks identification, it was carried out a mass spectroscopy (MS), as yet there is no standard or well-defined commercial for leishmania fatty acids identification. Figure 1 shows the fatty acid methyl esters chromatogram resulting of the gas chromatography

associated with mass spectrometry (GC-MS) from all the MIDI samples. Table 2 follows the identification of the peaks.

Table 2. Fatty acid methyl esters resulting from the GC-MS MIDI analysis from all isolates biomass.

Peak	Retention Time	Compound – Fatty Acid	(%) GC-MS	(%)GC/FID
1	11.515	Methyl dodecanoate (C12:0) – Lauric acid	0.08	0.0792
2	13.175	Methyl tridecanoate (C13:0)	0.07	0.0638
3	16.880	Methyl tetradecanoate (C14:0) – Myristic acid	2.41	2.3182
4	18.570	Methyl pentadecanoate (C15:0) – Pentadecyl Acid	3.92	3.7191
7	21.570	Cis-9-methyl hexadecanoate (C16:1 $\delta$ 9c) – Palmitoleic acid	0.11	0,1607
10	22.115	Methyl hexadecanoate (C16:0) – Palmitic acid	2.56	2.3601
11	23.680	15-methyl methyl hexadecanoate (C16:0i)	1.83	1.7519
13	24.595	Methyl heptadecanoate (C17:0) – Margarinic acid	0.87	0,7812
14	26.005	6,9,12-methyl octadecatrienoate (C18:3 $\delta$ 6c,9c,12c) – $\gamma$ -linolenic acid	20.34	21.4975
15	26.370	Cis-9,12-methyl octadecatrienoate (C18:2 $\delta$ 9c, 12c) – Linoleic acid	12.44	12.4524
16	26.525	Cis-9-methyl octadecatrienoate (C18:1 $\delta$ 9c) – Oleic acid	15.14	16.1968
17	26.605	Trans-9-methyl octadecatrienoate (C18:3 $\delta$ 9t12t15t)	0.62	-----
18	27.075	Methyl octadecanoate (C18:0) – Stearic acid	10.51	10.3550
22	29.000	Cis-9,10-methylene methyl octadecatrienoate (C19:0 cy9c)	12.94	11.5237
23	28.460	Methyl nonadecanoate (C19:0)	0.09	0.0319
24	30.145	Cis-5,8,11,14-methyl eicosatetraenoate (C20:4 $\delta$ 5c,8c,11c,14c) – Arachidonic acid	0.10	0.0733
27	31.895	Methyl eicosanoate (C20:0) – Arachidic acid	0.15	0.1377
31	36.425	Cis-5,8,11,14,17-methyl eicosapentaenoate (C20:5 $\delta$ 5c,8c,11c,14c,17c) – EPA	1.66	1.8845

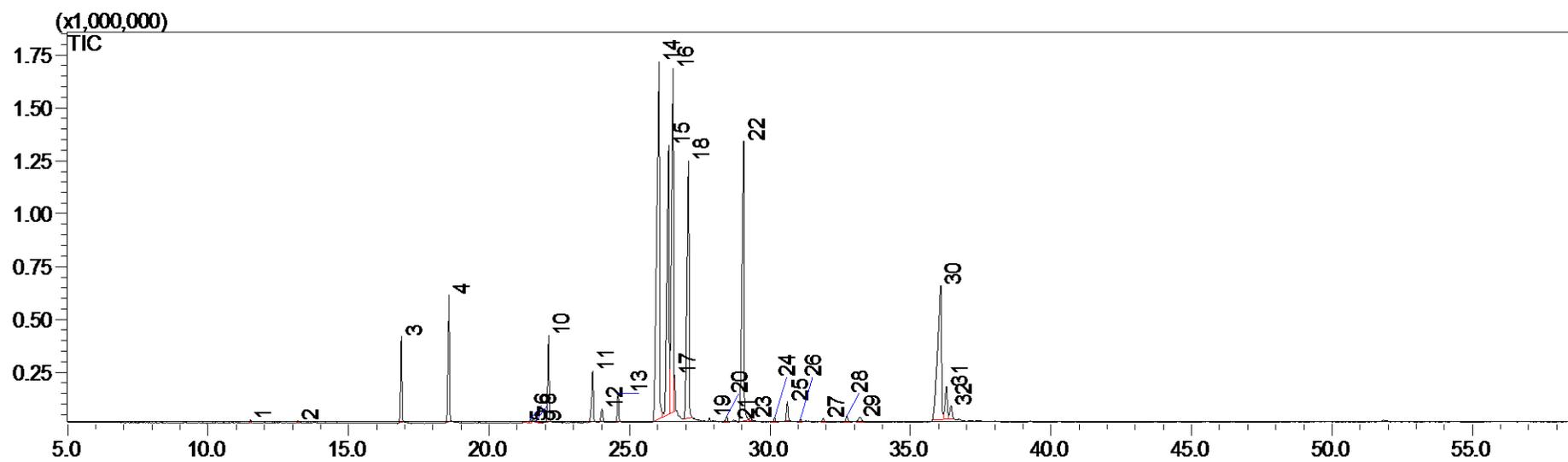


Figure 1. GC-MS Chromatogram from all the MIDI samples .

### *MIDIFA*

For these analyses, each isolate was in quadruplicate (samples A, B, C and D). Except the LVH SE 17, which sample A was lost during the procedures, and the isolate LTCP 9667, which sample A was an outlier. Thus, the analyses were carried out with 38 samples in total and 44 fatty acids methyl esters were obtained.

NMS analysis of MIDIFA profile was carried out. Each point (score) in the ordination represents all the fatty acids of each isolate. Pearson's correlations between the values of the variables and the scores of the isolates (determined by multivariate analysis) were used in order to characterize the main variations along the axes. The variables scores express the central tendency and the range of values for these variables among samples.

Figure 2 shows the graphic resulting from the Nonmetric Multidimensional Scaling (NMS) of the MIDI analysis grouping the isolates as NO/ antimony susceptibility. Although the isolates seem to be overlapped, there are statistically significant differences in fatty acid composition among NO/antimony sensitive and resistant isolates when *L. amazonensis* and *L. chagasi* were analyzed together. This can be clearly observed through the MRPP (Multi Response Permutation Procedure) statistics that showed significance below 0.04%. Of the total variability of the data, 86% were explained by ordination, being 38.8% and 47.2% of the fatty acids diversity represented along the axes 1 and 2, respectively.

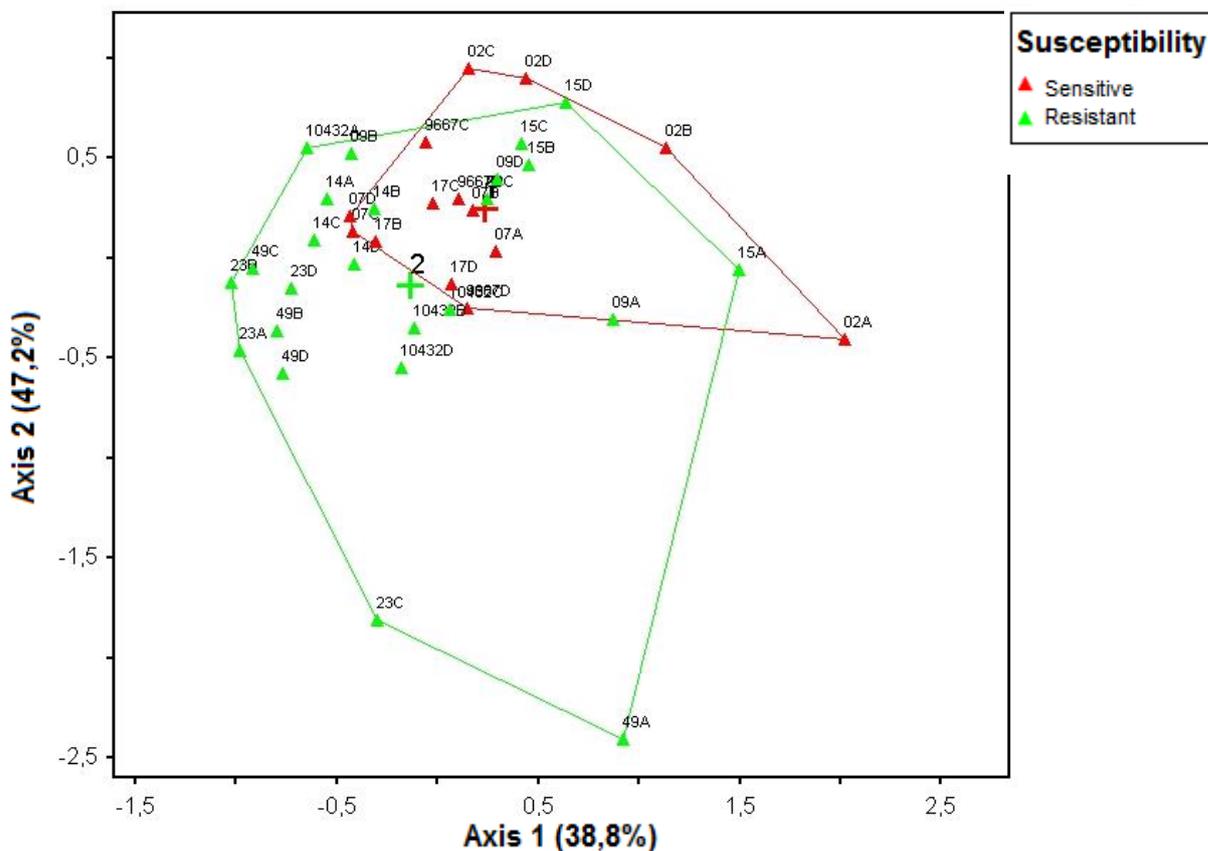


Figure 2. NMS representation of sample distance according to the MIDIFA composition separating the antimony/ NO resistant isolates and the sensitive ones. Continuous line encloses the study groups: Phenotypes of *L. chagasi* and *L. amazonensis* resistant to NO/antimony are in green symbols, while the sensitive are in red triangles. The proportion of variance explained by each axis is based on the correlation (R between distance in the reduced NMS space and the original space; it is reported after each axis heading). MRPP test:  $p = 0.00036787$ ;  $A = 0.05103330$ .

A comparison of the fatty acid profile also shows that there is variability in fatty acid profile of species *L. chagasi* and *L. amazonensis* (Figure 3). There is a concentration of scores, thus indicating distinction between FAMES profiles.

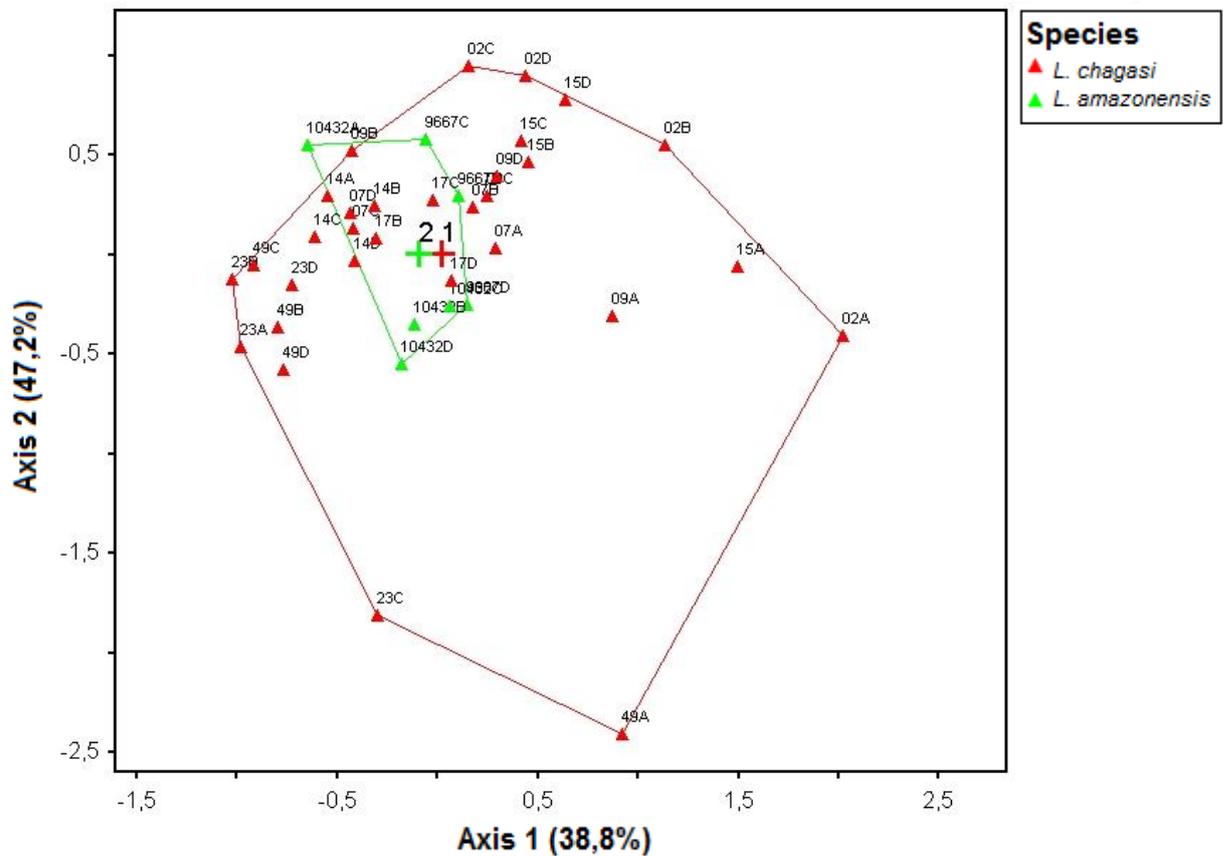


Figure 3. *L. amazonensis* vs *L. chagasi* NMS graphic representation of sample distance according the MIDIFA composition grouping the isolates according to species. Continuous lines enclose the study groups: *Leishmania chagasi*, green symbols, and the *L. amazonensis*, red triangles, isolates. The proportion of variance explained by each axis is based on the correlation (R between distance in the reduced NMS space and the original space; it is reported after each axis heading). MRPP test:  $p = 0.00489206$ ;  $A = 0.03432629$ .

Notwithstanding, there is greater variability when organizing the data as the two variables (NO/ antimony susceptibility and species), as shown in Figure 4. It also can be observed, a superior distinction of the profiles that was considered significant by the MRPP test.

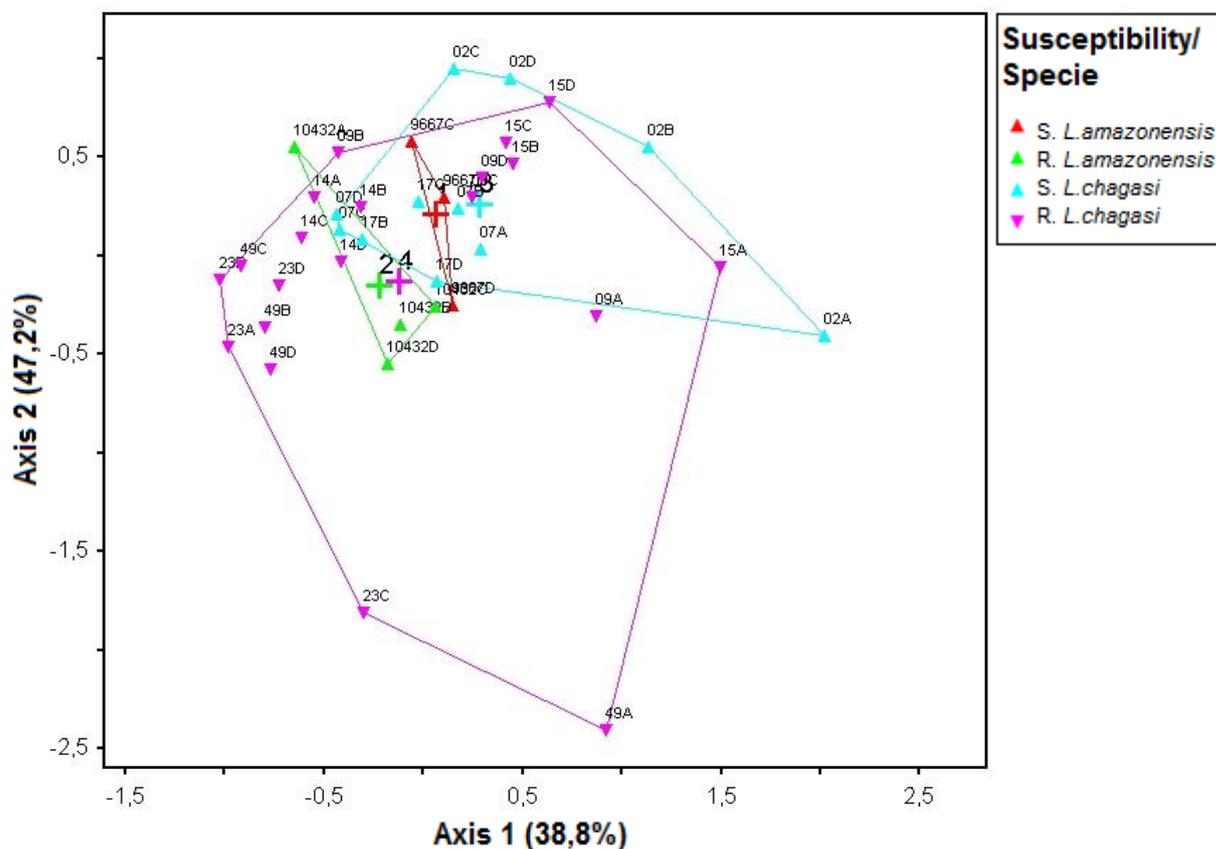


Figure 4. NMS graphic representation of sample distance according to the MIDIFA composition grouping the isolates according to species and also to NO/antimony susceptibility. The triangles represent the isolates: red = sensible *L. amazonensis*; green = resistant *L. amazonensis*; pink = resistant *L. chagasi*; blue = sensible *L. chagasi*. . The proportion of variance explained by each axis is based on the correlation (R between distance in the reduced NMS space and the original space; it is reported after each axis heading). MRPP test:  $p = 0.00009271$ ;  $A = 0.07796919$ .

Because MIDI fatty acid profiles were significantly different between *L. amazonensis* and *L. chagasi* and between isolates resistant or not to NO/ Glucantime®, an indicator species analyses were performed to each variable (NO/antimony susceptibility and species). This analysis was used to identify the fatty acids responsible for a greater variability between the phenotypes. In table 3 the most expressive fatty acid differences are listed.

Table 3. MIDI Indicator values as the NO/antimony susceptibility and as the species.

Fatty acid/ Retention Time	Indicator Value (IV)		Expressive group	p*
18:1 $\delta$ 9c	63	34	NO Sensitive	0.0002
32.88	24	63	NO Resistant	0.0038
20.28	15	71	<i>L. amazonensis</i>	0.0006
20.84	0	74	<i>L. amazonensis</i>	0.0006

\*Monte Carlo test of significance.

The fatty acid 18:1  $\delta$ 9c, oleic acid, was increased in sensitive isolates ( $p < 0,001$ ), whereas an yet unidentified peak showed the opposite trend ( $p < 0,01$ ). Regarding the indicator values for species differentiation, two fatty acids yet unidentified (20,28 and 20,84) were increased in *L. amazonensis* species ( $p < 0,001$ ).

#### ELFA and PLFA

For the ELFA analyses 30 samples (each isolate was in triplicate) were used and 49 fatty acids methyl esters were obtained. As for the PLFA analyses were used 40 samples (each isolate was in quadruplicate) and 40 fatty acids methyl esters were obtained. Analysis of the fatty acid profiles using these two techniques showed that there is no difference in the fatty acid profiles of *L. amazonensis* and *L. chagasi*, and also between NO/antimony resistant and sensitive isolates. The MRPP results of NMS ordination from ELFA and PLFA analysis had no statistically significant results as seen in table 4.

Table 4. MRPP results of NMS ordination from ELFA and PLFA analysis of the *L. chagasi* and *L. amazonensis* isolates relating the resistance and sensibility to NO/antimony, the species and both characteristics.

	ELFA		PLFA	
	P	A	P	A
Sensibility	0.26007990	0.00482760	0.30770480	0.00172086
Specie	0.01837509	0.04369502	0.31499664	0.00184066
Sensibility/Specie	0.08801758	0.04781894	0.34227467	0.00637848

## Discussion

Fatty acids are commonly used as biomarker to profile microbial community or for bacteria identification (SASSER, 1990; SCHUTTER and DICK, 2000; BUTLER et al., 2003; LANOISELET et al., 2005). Fatty Acids Methyl Esters (FAMES) profiles from isolates of *L. amazonensis* and *L. chagasi* resistant and sensitive to Glucantime® and nitric oxide were produced by three different methods of fatty acid extraction: ELFA, PLFA and MIDI. Hence, the results presented showed that MIDI FAMES profiles are different between *L. amazonensis* and *L. chagasi* and between isolates resistant or not to NO/ Glucantime®. MIDI procedure was originally developed to produce FAMES from bacterial cells aiming the identification of strains based on their lipid profiles. This method also seems to be useful to differentiate *Leishmania* species and isolates with different phenotypes. Difference in fatty acid from phospholipids in *L. donovani* isolates sensitive and resistant to antimonial was also reported by T'Kindt et al. (2010). Previously Rakotomanga et al. (2005) had already reported changes in lipid composition of *L. donovani* promastigotes resistant to antimony when compared to sensitive ones.

Interesting, there were no statistical differences among the fatty acids profiles obtained by PLFA, which extracts only phospholipids fatty acids, and ELFA, which extracts fatty acids from neutral lipids, phospholipids and glycolipids. However, the fatty acid profiles obtained by each method of extraction were different. These differences are expected once PLFA gives FAMES profiles exclusively of phospholipids. Beside the amount of the fatty acids extracted by MIDIFA and ELFA is different. ELFA extracts the FAMES of the three lipid classes: neutral lipids, phospholipids and glycolipids (SCHUTTER and DICK, 2000). On the other hand, MIDIFA also extracts dimethylacetals (derived from ether bonds) and other compounds that might be derived from the fatty acid of sphingolipids (KATES, 1986). This occurs because MIDI uses saponification/acid methylation reaction, while ELFA is based on mild alkaline methanolysis.

It is important to highlight that the fatty acid profiles analyzed by NMS emphasizes the differences in the relative composition of fatty acids present in the samples, rather than differences in its absolute amount.

The MIDIFA technique employed in this study might have analyzed some of the sphingolipids fatty acid residues in the yet unidentified molecules. The sphingolipids are ubiquitous components of eukaryotic membranes where they have roles in membrane physiology, cellular signaling and lipid raft formation (ZHANG et al., 2009, ZHANG et al., 2010). These findings suggest the importance of SLs as molecular targets and they suggest that

the SLs should be studied carefully and possibly will provide a biomarker or drug target to leishmaniasis treatment.

Once MIDI fatty acids profiles were able to differentiate both *Leishmania* species and the isolates by their viability to NO/Glucantime we performed an ISA analyses to search for the fatty acids that could be relevant in that profile differences. In fact, these analyses revealed that the fatty acid 18:1  $\Delta^9$ c (oleic acid) was increased in sensitive isolates, whereas a yet unidentified peak (retention time of 32.88) showed the opposite trend. The perspective is that these fatty acids could be used as biomarker to identify leishmania isolates concerning NO and antimony susceptibility.

It was also demonstrated that other two yet unidentified peaks (retentions times of 20.28 and 20.84) are more expressive in *L. amazonensis*. In this way, these fatty acids are potential candidate to work as biomarkers for *L. amazonensis* identification. However due to the small number of *L. amazonensis* isolates available we cannot ensure that these peaks will have the same behavior in a larger number of isolates. Thus, further studies are needed to confirm these findings.

In conclusion, besides the differentiation of *leishmania* species, these findings are important because they can provide biomarkers to the resistance and sensibility to NO and Glucantime®. The biomarkers must help to introduce the right therapy to patients faster than today and provide new insights to create more effective treatments against leishmaniasis.

## References

- ADOSRAKU, R. K.; ANDERSON, M. M.; ANDERSON, G. J.; CHOI, G.; CROFT, Simon L.; YARDLEY, Vanessa; PHILLIPSON, J, David; GIBBONS William A. Proton NMR profile of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 62. P. 251-262. 1993.
- ALLOATTI, A.; UTTARO, A. D. Hihly specific methyl-end fatty-acid desaturases of trypanosomatids. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V. 175. P. 126-132. 2011.

AMATO V. S.; ANDRADE H. F.; DUARTE M. I. S. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**. V. 85. P. 39-49. 2003.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Ottawa. V. 37. P. 911-917. 1959.

BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 315. P. 710-718. 2004.

BUTTLER, J. L.; WILLIAMS, M. A.; BOTTOMLEY, P. J.; MYROLD, D. D. Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 69. N. 11. P. 6793-6800. November 2003.

CAVIGELLI, M. A.; ROBERTSON, G. P.; KLUG, M. K. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. **Plant and Soil**. Holanda. V. 170. P. 99-113. 1995.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 19. N. 1. P. 111-126. Jan. 2006.

DUFRENE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for flexible asymmetric approach. **Ecological Monographs**. V. 63. P. 345-366. 1997.

DRUMMESLSMITH, J.; BROCHU, V.; GIRARD, I.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M. Proteome Mapping of the Protozoan Parasite *Leishmania* and Application to the Study of Drug Targets and Resistance Mechanisms. **Molecular & Cellular Proteomics**. V. 2. P. 146-255. 2003.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. T.; PEREIRA, J. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; HO, J. L.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**. V. 7. I. 7. 2007.

GUCKERT B., HOOD M. A., WHITE D.C. Phospholipid, ester-linked fatty acid profile changes in nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increase in the *trans/cis* ratio and

proportions of cyclopropyl fatty acids. **Applied Environmental Microbiology**. V. 52. P. 794-801. 1986.

HOLZMULLER, P.; HIDE, M.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. **Infection, Genetics and Evolution**. V.6. P. 187-97. 2006.

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Lower Nitric Oxide Susceptibility of Trivalent Antimony-Resistant Amastigotes of *Leishmania infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 49. P. 4406-4409. 2005.

KATES, M. **Techniques of Lipidology**. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. 1986.

LANOISELET, V. M.; COTHER, E. J.; COTHER, N. J.; ASH, G. J.; HARPER, J. D. I. Comparison of total cellular fatty acid analysis protocols to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R.oryzae-sativae*. **Mycologia**. V. 97. P. 77-83. 2005.

MAUEL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Experimental Parasitology**. V. 87. P. 98–111. 1997.

MCCUNE, B.; GRACE, J. B. **Analysis of Ecological Communities MjM Software Design**. Gleneden Beach, OR. 2002.

MIELKE, P.W.; BERRY, K.J. **Permutation Methods: a Distance Function Approach**. Springer-Verlag, New York. 2000.

MONHANTY, B. P.; BHATTACHARJEE, S.; PARIA, P.; MAHANTY, A.; SHARMA, A. P. Lipids Biomarkers of Lens Aging. **Applied Biochemical Biotechnology**. V. 169. I. 1. P. 192-200. 2012.

OLIVEIRA, M. C.; AMORIM, R. F. B.; FREITAS. R. A.; COSTA, A. L. L. Óbito em caso de leishmaniose cutaneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 38. N. 3. P. 258-260. 2005.

PIOTROWSKA-SEGET, Z.; MROSZIK, A. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community of Soil Microorganisms. **Polish Journal of Environmental Studies**. V. 12. N. 6. P. 669-675. 2003.

RAKOTOMANGA, M., SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. and LOISEAU, P. M. "Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 49. N. 7. P. 2677–2686, 2005.

RICHARDSON, A. R.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C. A Nitric Oxide-Inducible Lactate Dehydrogenase Enables *Staphylococcus aureus* to Resist Innate Immunity. **Science**. V. 319. 2008.

ROMÃO, P. R. T.; DIAS R. de O.; CRUZ, K. K.; MARQUES, F. C. de S.; MONTEIRO, M. C. **Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape**. V. 3. N. 1. 2007.

SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A.; VENTURINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1545. P. 357-366. 2001.

SANTOS, P. L.; COSTA, R. V.; BRAZ, J. M.; SANTOS, L. F.; BATISTA, A. C.; VASCONCELOS, C. R.; RANGEL, M. R.; JESUS, A. R.; MOURA, T. R.; LEOPOLDO, P. T.; ALMEIDA, R. P. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide**. V. 27. P. 67-71. Jun. 2012.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. **Tech. Note #101**. Newark, DE: Microbial ID. 1990.

SCHELTEMA, R. A.; DECUYPERE, S.; T'KINDT, R.; DUJARDIN, J-C.; COOMBS, G. H.; BREITLING, R. The potencial of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. **Parasitology**. V. 137. 2010.

SCHUTTER, M. E.; DICK, R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. **Soil Science Society of America Journal**. Madison. V. 64. P. 1659-1668. 2000.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. P. 485-497, 2012.

SILVA, J. B. Antimoniato de meglumia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 34. P.103-105. 2001.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**. V. 278. N. 27. P. 25120–25132. 2003.

T'KINDT, R.; SCHELTEMA, R. A.; JANKEVICS, A.; BRUNKER, K.; RIJAL, S.; DUJARDIN, J-C.; BREITLING, R.; WATSON, D. G.; COOMBS, G. H.; DECUYPERE, S. Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. V. 4. I. 11. 2010.

ZHANG, K.; BANGS, J. D.; BEVERLEY, S. M. Sphingolipids in parasitic protozoa. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 688. 2010.

ZHANG, K. and BEVERLEY, S. M. Phospholipid and sphingolip metabolism in *Leishmania*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V. 170. 2010.

ZHANG, O.; WILSON, M. C.; XU, W.; HSU, F.; TURK, J.; KUHLMANN, M.; WANG, Y.; SOONG, L.; KEY, P.; BEVERLEY, S. M.; ZHANG, K. Degradation of Host Sphingomyelin Is Essential for *Leishmania* Virulence. **PLOS Pathogens**. V. 5. I. 12. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). < <http://www.who.int/en/> > Accessed in June 2012.