



**Análisis comparativo de las respuestas transcripcionales de cinco especies
de *Leishmania* frente al antimonio trivalente.**

Julián Esteban Medina Velasquez

**Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Bogotá, Colombia
2021**

**Análisis comparativo de las respuestas transcripcionales de cinco especies
de *Leishmania* frente al antimonio trivalente.**

Julián Esteban Medina Velasquez

Tesis presentada como requisito para obtener el título de:

Biólogo

Director

Juan David Ramírez PhD.

**Facultad de Ciencias Naturales
Biología
Universidad del Rosario
Bogotá, Colombia
2021**

RESUMEN

La leishmaniasis es considerada una enfermedad tropical desatendida para la cual no se cuenta con una vacuna. Por otra parte, las drogas de primera elección han presentado un aumento en las fallas terapéuticas, entre otras causas por la adquisición de resistencia por parte de su agente etiológico dependiente de las características propias de cada especie (ej. manifestación clínica y distribución geográfica). Así, que comprender el mecanismo usado por el parásito para sobrevivir bajo la presión de tratamientos identificando probables blancos terapéuticos comunes y específicos es importante para el control de la leishmaniasis. Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un análisis donde se compare la expresión génica entre especies de *Leishmania* que exhiben diferentes características genéticas y biológicas reflejadas en las manifestaciones clínicas diferenciales asociadas. Aquí, aplicamos análisis comparativos de los perfiles transcriptómicos de líneas con resistencia inducida experimentalmente al antimonio trivalente (Sb^{III}) de cinco especies de importancia médica (Subgénero *L. (Leishmania)*: *L. donovani*, *L. infantum* y *L. amazonensis*; Subgénero *L. (Viannia)*: *L. panamensis* y *L. braziliensis*), causantes de diferentes manifestaciones clínicas (que generalmente son Leishmaniasis cutánea para *L. panamensis* y *L. amazonensis*, mucocutánea para *L. braziliensis* y visceral para *L. donovani* y *L. infantum*) a partir de análisis funcionales de ontología y asignación de grupos ortólogos. Las líneas resistentes tenían respuestas diferenciales principalmente en procesos metabólicos, unión a compuestos y componentes membranales respecto a su contraparte sensible. Predominaron los genes ortólogos diferencialmente expresados asignados a las respuestas especie específicas con un total de 1426 genes propios. A nivel de la respuesta por subgénero no se encontraron genes compartidos entre las especies pertenecientes a *L. (Leishmania)* y solo 7 lo fueron entre aquellas pertenecientes a *L. (Viannia)*. No se halló ningún gen diferencialmente expresado en común entre las 5 especies, pero se encontraron dos genes ortólogos sobrerregulados comunes entre 4 especies (*L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. panamensis*) referidos a una proteína de unión a RNA y al complejo NAD(P)H citocromo B5 oxidorreductasa, asociados al control transcripcional y a la síntesis de novo del ácido linoleico, importantes en los mecanismos de resistencia a los antimoniales. Estos patrones obedecen probablemente el fenómeno multifactorial de la resistencia a drogas, dependiente de características intrínsecas del parásito y el entorno. Por ende, las aproximaciones especie específicas resultan más recomendables para la proposición de potenciales blancos terapéuticos.

PALABRAS CLAVE

Leishmania, especies, perfil transcriptómico, antimonio trivalente, grupos ortólogos.

INTRODUCCIÓN

Leishmania (*Trypanosomatida: Trypanosomatidae*) es un género de parásitos protozoarios intracelulares que comprende más de 50 especies (agrupadas en 5 subgéneros) donde al menos 20 de ellas son consideradas patógenas para los humanos (Akhoundi *et al.*, 2016). Se trata del agente etiológico de la leishmaniasis, un conjunto de enfermedades infecciosas tropicales transmitidas vectorialmente por la picadura de la mosca de la arena, principalmente

de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en el viejo y nuevo mundo respectivamente (Alemayehu & Alemayehu, 2017). Se estima que anualmente a nivel mundial ocurren 2 millones nuevos casos, 70000 muertes y 350 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad (Oryan & Akbari, 2016). La leishmaniasis a su vez presenta la particularidad de un amplio espectro de manifestaciones clínicas dependientes de la especie de *Leishmania* involucrada y la respuesta inmune del huésped (Hashiguchi & Gomez, 2018; Galluzzi *et al.*, 2018).

Estas pueden ser divididas en leishmaniasis cutánea (LC), donde se presentan lesiones en la piel, en el sitio de la picadura de la mosca de la arena o en otras partes al diseminarse gracias a la ausencia de respuesta inmune; leishmaniasis mucocutánea (MCL), donde se invade y destruye la mucosa nasofaríngea; y leishmaniasis visceral (LV), donde órganos internos se ven perjudicados, generalmente en el bazo, hígado o médula ósea, teniendo un potencial mortal (Torres *et al.*, 2017).

Las especies de *Leishmania* pueden ser clasificadas en subgéneros de acuerdo con el sitio de propagación dentro del tracto digestivo del vector, en parásitos que tienen como huésped a los mamíferos encontramos dos subgéneros; *Leishmania* (*Leishmania*) donde el desarrollo se da en el intestino medio y anterior, y *Leishmania* (*Viannia*) que incluye además una etapa en el intestino posterior (Dostálová & Volf, 2012). De igual manera, ambos subgéneros presentan un patrón de distribución geográfica disyuntivo, *L.* (*Viannia*) está restringido al neotrópico, mientras que *L.* (*Leishmania*) se ubica en el nuevo y viejo mundo (Steverding, 2017). Su asociación con las manifestaciones clínicas va de la mano de las especies específicas de los subgéneros. Dentro *L.* (*Leishmania*) encontramos especies del nuevo mundo en el complejo *L. mexicana*, donde destaca *L. amazonensis*, una de las especies patógenas dominantes en Latinoamérica responsable de formas difusas de CL. Aquí, también encontramos especies del viejo mundo, el complejo *L. donovani* cuenta con los principales causantes de la forma visceral de la enfermedad con *L. infantum* y *L. donovani* (Burza *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2017). En *Leishmania* (*Viannia*), destacan *L. braziliensis* y *L. panamensis* que representan los causantes más frecuentes de CL y MCL en Latinoamérica (Valero & Uriarte *et al.*, 2020).

El número de cromosomas de cada especie también difiere de acuerdo con el subgénero, en *L. infantum* y *L. donovani* (36), mientras que *L. braziliensis* y *L. panamensis* (35) gracias a procesos de reordenamiento y combinación (Britto *et al.*, 2018). Por otra parte, se han reportado más de 200 genes con distribución diferencial entre *L. major* y *L. infantum* en comparación con *L. braziliensis*, donde la mayoría codificaban para la supervivencia del parásito en el macrófago, además de una serie de genes únicos para cada una de las especies (Peacock *et al.*, 2007). Un marcador del subgénero *Leishmania* (*Viannia*) es la maquinaria de ARN de interferencia, la cual funciona como un mecanismo de defensa antiviral que puede repercutir en la virulencia del parásito (Acino, 2017). Otra firma de este subgénero incluye patrones elevados de expresión de moléculas como GP63 y GP46, las cuales son componentes de superficie que actúan en el tropismo de LC y en el desarrollo dentro del vector (Llanes *et al.*, 2015; Diotallevi *et al.*, 2020). Otros blancos moleculares para la identificación de especies circulantes del subgénero *Leishmania* (*Viannia*) incluyen el gen

codificante para la β -tubulina y la proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Ovalle *et al.*, 2018; Marín *et al.*, 2008). Por su parte el subgénero *Leishmania* (*Leishmania*) cuenta con blancos asociados a la leishmaniasis visceral como los genes codificantes de proteínas A2 y 6PGDH, además de patrones de expresión diferencial de genes como POLA, HSP20 o NAGT (Akhoundi *et al.*, 2017; Fraga *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2013).

A la fecha aún no se cuenta con una vacuna, por lo que la quimioterapia y diferentes drogas son la única alternativa de tratamiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis (Jain & Jain, 2015). Entre ellos antibióticos con acción leishmanicida como la pentamidina o la paromomicina, drogas antifúngicas como los imidazoles y triazoles, y tratamientos antitumorales como la Miltefosina (Lindoso *et al.*, 2012). Sin embargo, estos son consideradas tratamientos alternativos, la droga de primera elección en la mayor parte del mundo son los antimoniales (Sb) (ej. estibogluconato de sodio y antimonio de meglumina) principalmente por condiciones socioeconómicas y simultáneamente ser una enfermedad desatendida por desarrolladores de medicamentos (Eddaikra *et al.*, 2011; Vanleberghe *et al.*, 2007). Sin embargo, se han reportado una gran serie de fallas terapéuticas asociadas a múltiples factores tanto del paciente (adherencia al tratamiento, ubicación geográfica y estado inmune), el practicante (fallas en los protocolos de administración del antimonial) como de las características propias del parásito (resistencia al medicamento y la especie específica) (Sundar *et al.*, 2019; Rojas *et al.*, 2006; Denis *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2001; Vanaerschot *et al.*, 2014; Arévalo *et al.*, 2007; Sundar & Chakravarty *et al.*, 2015; de Vries *et al.*, 2015).

Para un mejor entendimiento de la biología de *Leishmania* múltiples estudios se han enfocado en determinar los mecanismos usados por este patógeno para sobrevivir bajo la presión de los antimoniales utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación. Se ha descrito el perfil transcriptómico (por RNA-seq) de especies expuestas a antimonio trivalente (Sb^{III}) al punto de desarrollar resistencia, con el fin de elucidar las vías y los cambios globales de la expresión de los genes mediante los cuales se adquiere un fenotipo adaptativo al estrés del tratamiento. Estos estudios abarcan especies del subgénero *Leishmania* (*Leishmania*), *L. infantum* (Andrade *et al.*, 2020), *L. donovani* (Rastrojo *et al.*, 2018) y *L. amazonensis* (Patino *et al.*, 2019); y del subgénero *Leishmania* (*Viannia*) *L. panamensis* y *L. braziliensis* (Patino *et al.*, 2019). Donde junto con otros estudios se ha encontrado que este comportamiento generalmente va de la mano de una alteración del número de copias de genes particulares de forma local o en todo el cromosoma (Iantorno *et al.*, 2017; Dumertz *et al.*, 2017; Restrepo *et al.*, 2019; Leprohon *et al.*, 2009). Aquí los transcritos asociados con las líneas resistentes involucran una serie de vías metabólicas directamente asociadas a drogas y antibióticos o involucradas en procesos de glicólisis y procesamiento de ácidos grasos, en contraparte de una reducción en la expresión de factores asociados a la motilidad y procesos replicativos principalmente asociados a la maquinaria ribosomal. Se hallaron, además, algunos genes o procesos específicos que han sido reportados como potenciales blancos de resistencias, entre ellos están transportadores de moléculas y de compuestos metálicos, proteínas de choque térmico como HSP70, genes codificantes para amastinas o canales transmembranales como AQP1 (Monte-Neto *et al.*, 2015; Maharjan & Madhubala, 2015). Otros resultados interesantes incluyen una mayor cantidad de transcritos asociados a la resistencia al

antimonio trivalente respecto a otros tratamientos para *L. donovani* o la inducción de autofagia por parte de *L. amazonensis* representando una estrategia de supervivencia o de muerte celular (Ponte-Sucre *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2017; Patino *et al.*, 2019; Rastrojo *et al.*, 2018).

Los factores que pueden contribuir a la virulencia y patogenicidad han sido investigados de acuerdo con su proporción y distribución entre especies responsables de diferentes presentaciones de la enfermedad (Depledge *et al.*, 2009; Rochette *et al.*, 2008). Algunos de estos estudio incluyen además líneas resistentes al estibogluconato de sodio y otras drogas o se enfocan en factores estrechamente relacionados con el tratamiento, estableciendo entonces la influencia de caracteres conservados y especie-específicos (Hefnawy *et al.*, 2017; Andrade & Murta, 2014; Matrangolo *et al.*, 2013). -A pesar de esto, a la fecha no se ha realizado una comparación interespecífica de perfiles transcriptómicos entre especies de *Leishmania* con resistencia inducida al Sb^{III}, siendo estos resultados cruciales a la hora de abordar el control de este patógeno desatendido desde un enfoque holístico o característico del agente etiológico y la presentación clínica. Por ende, el objetivo del presente estudio es proveer una aproximación a los perfiles de expresión y potenciales marcadores de resistencia compartidos y específicos de las principales especies de *Leishmania* de importancia médica (Subgénero *L. (Leishmania)*: *L. donovani*, *L. infantum* y *L. amazonensis*; Subgénero *L. (Viannia)*: *L. panamensis* y *L. braziliensis*) resistentes al Sb^{III}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descarga de secuencias y transcriptomas

Para cada una de las cinco especies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*). Se utilizaron dos replicas biológicas correspondientes a poblaciones con resistencia inducida experimentalmente al (Sb^{III}) y otras dos a su contraparte wild-type (sensible al Sb^{III}) por especie (cada una compuesta de dos lecturas pareadas), disponibles en las bases de datos del ENA y NCBI en formato fastq.gz. Los datos fueron seleccionados teniendo como criterio el uso de la concentración media máxima eficaz (EC₅₀) y el uso de promastigotes en fase logarítmica (Tabla 1).

Tabla. 1 información sobre las secuencias y transcriptomas de *Leishmania* utilizados. En todas se manejó como plataforma Illumina HiSeq 2000. Las librerías fueron paired-end a excepción de *.

ORGANISMO	ARTÍCULO	NÚMERO DEL PROYECTO	MUESTRA	NÚMERO DE READS	DESCRIPCIÓN	GENOMA DE REFERENCIA
<i>Leishmania amazonensis</i> (UA301)	Transcriptional responses of <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> in the presence of trivalent sodium stibogluconate	PRJEB33484	SAMEA5858064	4893013	Resistente al Sb ^{III}	<i>Leishmania mexicana</i> (MHOM/GT/2001/U1103)
			SAMEA5858065	3829389	Resistente al Sb ^{III}	
			SAMEA5858068	5069340	Wild-type	
			SAMEA5858069	5017756	Wild-type	
<i>Leishmania braziliensis</i> (MHOM/BR75/M2904)	Major changes in chromosomal copy, gene expression and gene dosage driven by Sb ^{III} in <i>Leishmania braziliensis</i> and <i>Leishmania panamensis</i>	PRJEB31092	SAMEA5593820	3992856	Resistente al Sb ^{III}	<i>Leishmania braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)
			SAMEA5593821	4710968	Resistente al Sb ^{III}	
			SAMEA5593825	4400059	Wild-type	
			SAMEA5593826	4135697	Wild-type	
<i>Leishmania donovani</i> (MHOM/ET/67/HU3)	Genomic and transcriptomic alterations in <i>Leishmania</i>	PRJEB20187	SAMEA103950315	1558126	Resistente al Sb ^{III}	<i>Leishmania donovani</i> (MHOM/NP/03/BPK282)
			SAMEA103950316	2595657	Resistente al Sb ^{III}	
			SAMEA103950318	2478273	Wild-type	

	<i>donovani</i> lines experimentally resistant to antileishmanial drugs		SAMEA103950319	2398344	Wild-type	
<i>Leishmania infantum</i> * (MHOM/BR/74/PP75)	Comparative Transcriptomic Analysis of Antimony Resistant and Susceptible <i>Leishmania Infantum</i> Lines	PRJNA348689	SAMN07137473 (SRX2833233)	3112158	Resistente al Sb ^{III}	<i>Leishmania infantum</i> (JPCM5)
			SAMN07137473 (SRX2833324)	5004343	Resistente al Sb ^{III}	
			SAMN07137475 (SRX2833322)	1557529	Wild-type	
			SAMN07137475 (SRX2833326)	2718622	Wild-type	
<i>Leishmania panamensis</i> (MHOM/COL/81L13)	Major changes in chromosomal copy, gene expression and gene dosage driven by Sb ^{III} in <i>Leishmania braziliensis</i> and <i>Leishmania panamensis</i>	PRJEB31092	SAMEA5593830	3066848	Resistente al Sb ^{III}	<i>Leishmania panamensis</i> (UA946)
			SAMEA5593831	2987384	Resistente al Sb ^{III}	
			SAMEA5593834	3358738	Wild-type	
			SAMEA5593835	2986493	Wild-type	

El control de calidad de las secuencias brutas se determinó a través de la herramienta FastQC (Andrews, 2010). Posteriormente, se retiraron los adaptadores usando la herramienta cutadapt (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable>) y las lecturas de baja calidad fueron eliminadas con utilizando el software Trimmomatic (Martin, 2011; Bolger *et al.*, 2010). Simultáneamente, se descargaron los genomas de referencia (.fasta) y los archivos de anotación (.gff) de cada especie en la base de datos de parásitos kinetoplastidos, EuPathDB (<http://eupathdb.org>) (Aurrecoechea *et al.*, 2017) (Tabla 1).

Análisis de expresión diferencial

Inicialmente se realizó la conversión de los genomas anotados al formato (.gtf) utilizando el paquete gffread v0.12.1 (Pertea & Pertea, 2020). Luego, se empleó el software STAR v.2.7 para indexar los genomas de referencia empleando los archivos de anotación (.gtf), por último, se alinearon los archivos fastq.gz previamente mencionados, generando un archivo BAM (Dobin *et al.*, 2013). El archivo binario y el genoma de referencia indexado fueron usados como entrada para HTSeq en la generación de un archivo de texto con una tabla que contenía el conteo para cada gen, mediante el parámetro de intersección de todos los conjuntos no vacíos, se generaron en total cuatro por especie, dos de ellos a partir de las lecturas wild-type y los otros dos a partir de las lecturas resistentes al Sb^{III} (Anders *et al.*, 2015).

El archivo de texto sirvió de entrada para el paquete de R, Bioconductor DESeq2 v.1.30.0, donde se evaluó la expresión diferencial de los genes a partir de un modelo de distribución binomial, aquí las muestras wild-type sirvieron como punto de comparación para las muestras resistentes al Sb^{III}, generando un archivo .csv con la información estadística de los DEG (Love *et al.*, 2014). Para visualizar los genes diferencialmente expresados (DEG) se realizó un diagrama de Volcán evaluando el promedio de conteo normalizado bajo los siguientes criterios de significancia estadística: un punto de corte del nivel de cambio > 1 o < 1, para los genes sobrerregulados y subregulados respectivamente, además de un Benjamini-Hochberg con un P-value ajustado < 0.01 (Doyle, 2019).

Determinación de grupos ortólogos y ontología

Ingresando la identificación de los DEG se realizó el análisis de enriquecimiento de ontología usando las herramientas de TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) con un test exacto de Fisher con

P-value < 0.05, donde los términos de ontología génica fueron clasificados en tres categorías (procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares), dichos términos fueron depurados en REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) donde se eliminaron términos redundantes mediante el filtro de genes indispensables. Posteriormente se realizó un diagrama de barras de los términos de ontología génica con mayor conteo de genes utilizando el paquete de visualización ggplot2 (Wickhan, 2016).

Por otra parte, se atribuyó un grupo ortólogo a cada DEG, con el fin de realizar una homogeneización de los datos para su posterior comparación entre especies, mediante los parámetros adicionales en la búsqueda por ID del gen en TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Se construyeron diagramas de Venn para los genes ortólogos utilizando el programa VennPainter con el fin de ilustrar las relaciones con las especies de *Leishmania*, se generó uno para los DEG sobrerregulados y otro para los subregulados, basándonos en el nivel de cambio (Lin *et al.*, 2016). Finalmente, se generó un Heatmap de los DEG por cada cromosoma distribuidos entre las cinco especies con el paquete ggplot2 de R (Wickhan, 2016).

RESULTADOS

Transcritos diferencialmente expresados (DEG) entre las especies de *Leishmania* resistentes al (Sb^{III})

No se encontraron diferencias significativas entre las réplicas biológicas de cada especie con el muestreo limitado de las mismas. Se identificaron un total de 1926 genes diferencialmente expresados contando todas las especies (P-value < 0.01), de los cuales 1118 fueron sobrerregulados y 808 subregulados. A nivel individual, *L. amazonensis* reporta la mayor cantidad de DEG en ambas categorías (382 y 390, respectivamente) mientras que *L. panamensis* y *L. infantum* presentan la menor cantidad de DEG sobrerregulados (65) y subregulados (16), respectivamente. Entre ellos (*L. donovani*: 22%, *L. infantum*: 30%, *L. amazonensis*: 17%, *L. braziliensis*: 41%, y *L. panamensis*: 13%) codificaban para proteínas hipotéticas. Los genes pueden ser visualizados en los volcanes que muestran la relación entre la expresión media y nivel de cambio para cada uno (Fig. 1, Tabla S2, Tabla S3).

La distribución de estos genes en los cromosomas de las especies pertenecientes al subgénero *L. (Leishmania)* evidencian un patrón homogéneo para *L. infantum*, una cantidad significativa de DEG en el cromosoma 29 de *L. donovani* (111) y un número considerable de genes en el cromosoma 34 para *L. amazonensis* (94). Sin embargo, no se observa un patrón común para el subgénero o para las especies asociadas a Leishmaniasis visceral (LV). Las especies pertenecientes al nuevo mundo (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*) también coinciden con un elevado número de DEG en el cromosoma 23 (58,39, 51, respectivamente) (Fig. 2, Tabla S2, Tabla S3).

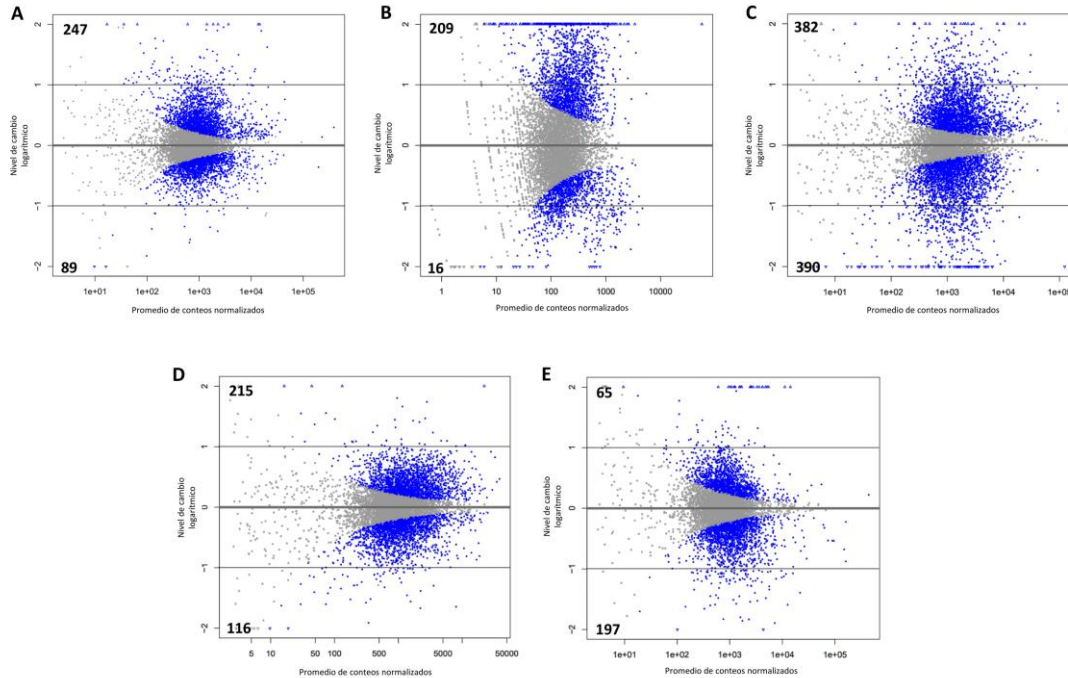


Fig. 1 Representación gráfica de los genes diferencialmente expresados entre las líneas sensibles y resistentes de las 5 especies de *Leishmania* (A) *L. donovani* (B) *L. infantum* (C) *L. amazonensis* (D) *L. braziliensis* (E) *L. panamensis*. Cada punto representa un gen. Los puntos de color gris indican los genes que no fueron diferencialmente expresados y los puntos azules, ubicados sobre y debajo de las líneas negras (puntos de corte del nivel de cambio logarítmico), representan los genes diferencialmente expresados con un valor absoluto > 1 ajustado con un P-value < 0.01, entre ambas líneas. Los números en la parte superior e inferior son la cantidad de DEG sobreexpresado y subexpresado, respectivamente.

Ontología de genes (GO) diferencialmente expresados entre las especies de *Leishmania* resistentes al (Sb^{III})

A nivel de especie se encontraron diferentes cantidades de ontología de genes. *L. donovani*: (137, 128), *L. infantum*: (46, 64), *L. amazonensis*: (69, 160), *L. braziliensis*: (62, 97), y *L. panamensis*: (89, 35), siendo el primer valor de los procesos subregulados y el segundo sobreexpresados (Tabla S1). Además, se determinaron los roles principales de los DEG de las poblaciones resistentes al Sb^{III} en cada categoría de los grupos funcionales de los GO (Fig. 3).

A nivel general para las especies de *Leishmania*, dentro del grupo de procesos biológicos los genes involucrados en el metabolismo (sustancias orgánicas, drogas y antibióticos) y procesos celulares fueron sobreexpresados mientras que aquellos asociados con oxidoreducción, plegamiento de proteínas y procesos replicativos fueron subregulados. En el grupo de componentes celulares se caracterizó por un aumento en la expresión de los genes que codificaban para proteínas de la membrana y sus componentes integrales, así como su estructura de movimiento. Al contrario, con lo que sucede con los DEG subregulados donde están componentes internos, citoplasma y ribosoma principalmente. Los genes sobreexpresados con una función molecular más representativos incluyen procesos catalíticos y de transporte, además de la unión a moléculas pequeñas, compuestos metálicos y drogas. Los genes subregulados siguen el patrón estructural y encontramos una reducción en la unión a proteínas y ácidos nucleicos, actividad de hidrolasa y oxidoreductasa (Tabla S1). A nivel

individual la ontología de genes con mayor enriquecimiento fue: *L. donovani*: (regulación de la replicación de ADN (6899)), *L. infantum*: (complejo de unión a proteínas (33193)), *L. amazonensis*: (metabolismo de isocitrato (2288)), *L. braziliensis*: (metabolismo de cisteína y glicerol (5267)), y *L. panamensis*: (metabolismo de esfingolípidos (8566)) (Tabla S1).

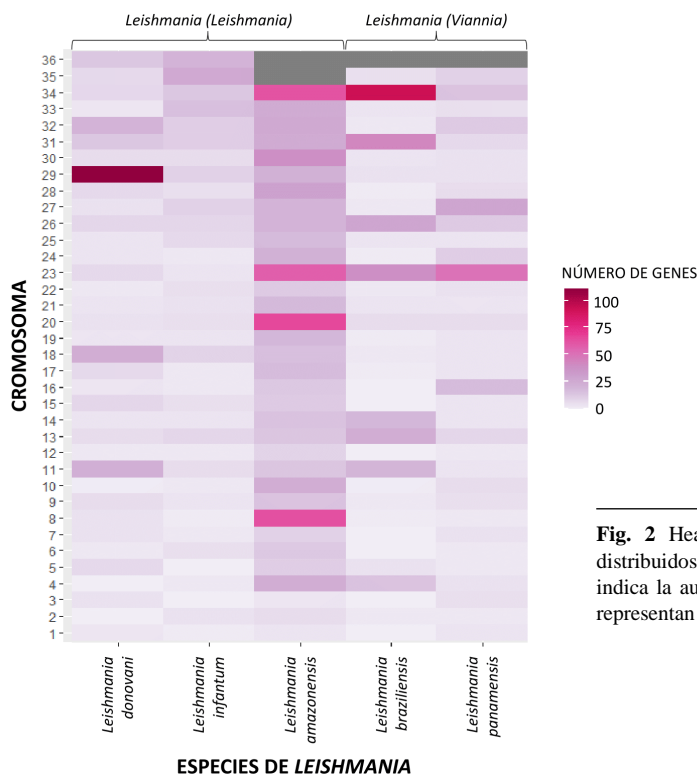


Fig. 2 Heatmap del conteo de los genes diferencialmente expresados distribuidos por los cromosomas de las especies de *Leishmania*. El color gris indica la ausencia de cromosoma en esa especie. Los colores más oscuros representan un mayor conteo y los colores claros un menor conteo.

Comparación del perfil transcriptómico de las especies de *Leishmania*

Los datos revelan que los genes ortólogos propios de cada especie son predominantes en proporción respecto a los compartidos, esto se da tanto para los DEG subregulados (606) como sobrerregulados (821). En cantidad le siguen los genes comunes entre dos especies (subregulados: 76; sobrerregulados: 106), donde cada combinación posible entre dos especies presentaba al menos un ortólogo compartido. En el caso de *L. donovani* y *L. infantum*, involucradas en la LV, se hallaron cuatro ortólogos (OG6_100045, OG6_101028, OG6_101741, OG6_206698) referidos a transporte de sustancias y en eventos catalíticos (Fig. 4, Tabla S2). Ya entre tres especies se encontraron ortólogos compartidos en tres combinaciones de especies. La primera entre las especies del subgénero *L. (Viannia)* junto con *L. amazonensis*, que son especies distribuidas en el nuevo mundo y que generalmente son asociadas a CL. (OG6_156932, OG6_100025, OG6_142640 y OG6_478666) referentes a proteínas motoras de microtúbulos y enzimas de unión de moléculas. Otra combinación donde se observó similitudes en ortólogos fue entre *L. amazonensis*, *L. donovani* y *L. panamensis* (OG6_110995, OG6_127587, OG6_101746 y OG6_157042).

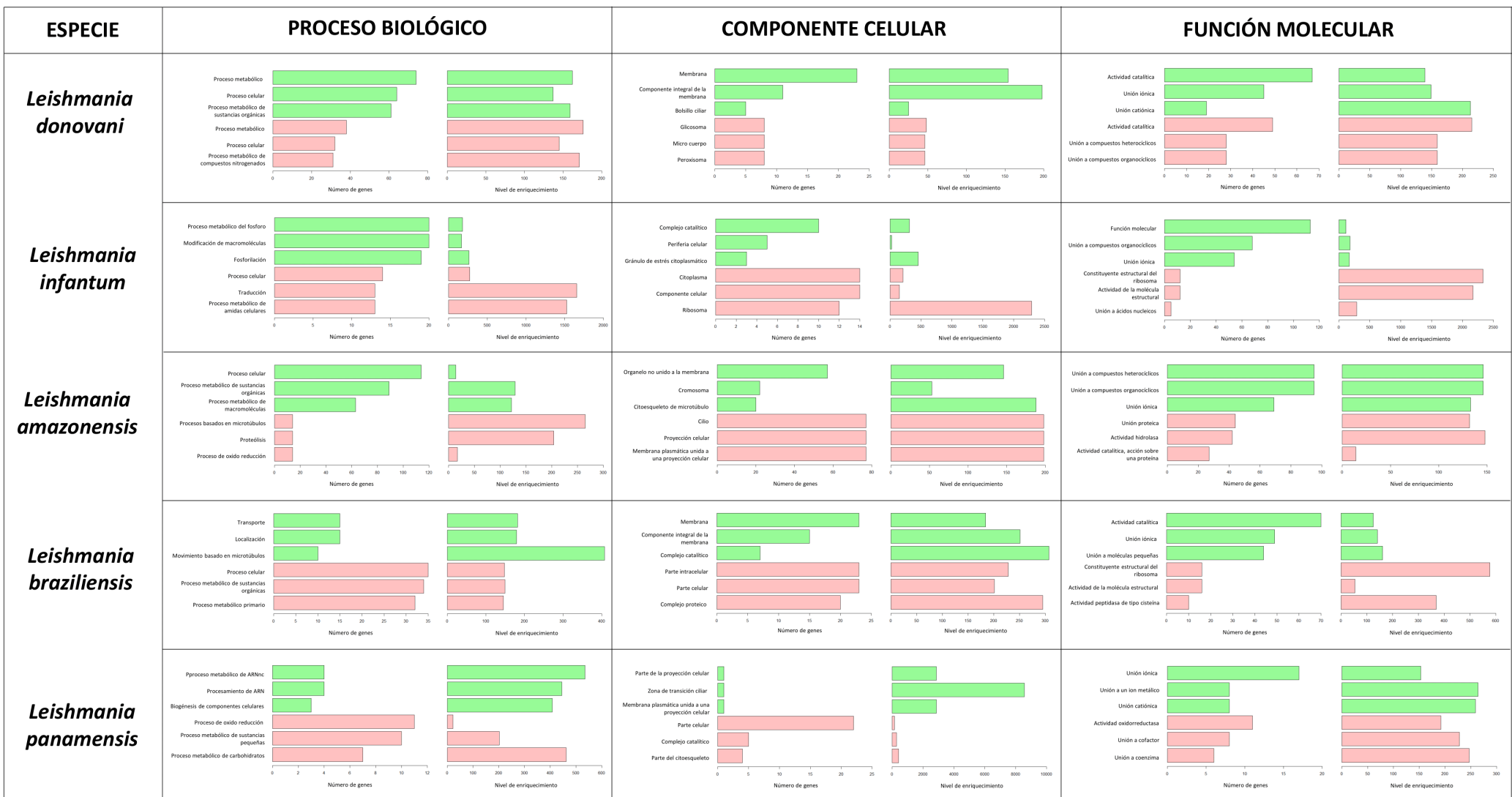


Fig. 3 Las predicciones de ontología de genes (GO) para los genes diferencialmente expresados. La grafica de barras muestra las funciones más representativas de las tres categorías basándose en el conteo de genes asociados. El enriquecimiento de cambio aporta un valor estadístico. Las barras de color verdes y rosadas representan la sobreexpresión y subexpresión, respectivamente.

Para *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. infantum* se encontró un solo ortólogo en común (OG6_119258). Finalmente, no se halló un ortólogo en común del subgénero *L.* (*Leishmania*) (Fig. 4, Tabla S3).

Ningún gen ortólogo fue compartido entre todas las especies y solo dos (OG6_152462 y OG6_200283) lo fueron entre cuatro especies (*L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. panamensis*) ambos sobrerregulados asociados a una proteína de unión a RNA y al citocromo b5, respectivamente. Un diagrama de Venn ilustra el número de los DEG compartidos y propios de las líneas resistentes al (Sb^{III}) de las especies de *Leishmania* (Fig.4). Además, la especificación de los ortólogos específicos y compartidos junto la información estadística fue recopilada (Tabla S2, Tabla S3).

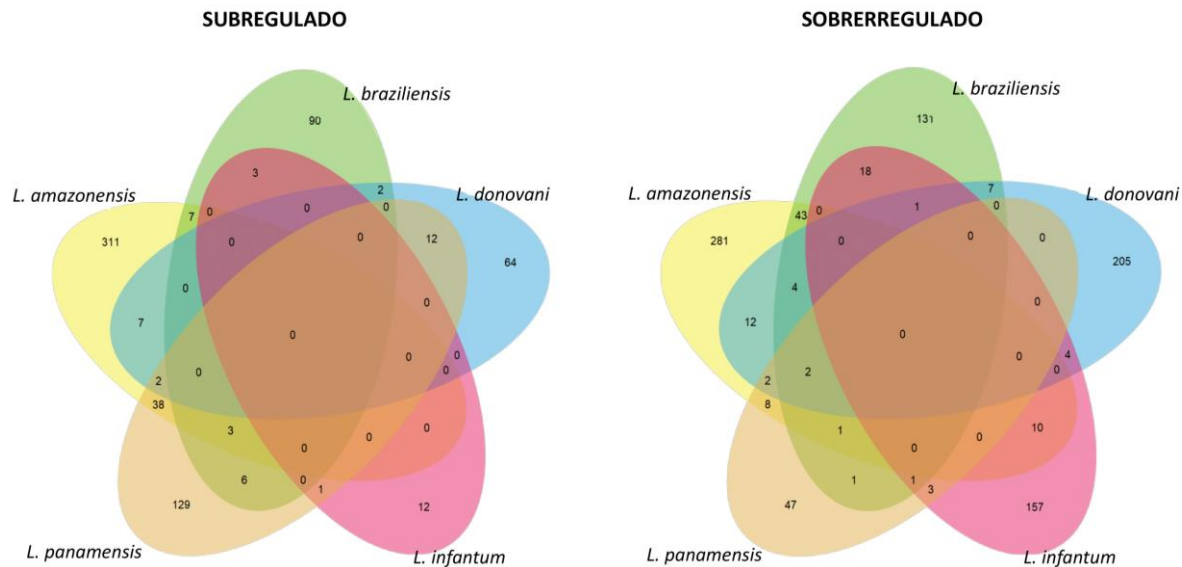


Fig. 4 El diagrama de Venn muestra el número de grupos ortólogos sobrerregulados y subregulados. Los valores externos de cada punta son propios de cada especie, mientras los valores internos son compartidos entre dos o más especies.

DISCUSIÓN

Las fallas terapéuticas asociadas a las drogas de primera elección en enfermedades parasitarias son un problema que dificulta su control, una de sus principales causas es la adquisición de resistencia por parte de los agentes etiológicos (Uliana *et al.*, 2018). Los mecanismos de resistencia de las especies de *Leishmania* frente al antimonio trivalente han sido evaluados desde aproximaciones individuales. Sin embargo, el establecimiento de patrones de estas respuestas, basados en las diferentes clasificaciones del parásito (taxonómica y médica), podría permitir aproximaciones a dilucidar posibles blancos terapéuticos comunes y comprender la relevancia de la biología de las especies en la adaptación a condiciones de estrés. En este estudio, presentamos el primer análisis comparativo de las respuestas transcripcionales de cepas resistentes al Sb^{III} inducidas experimentalmente de cinco especies de *Leishmania*, incluyendo representantes de los

subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* asociados generalmente a manifestaciones clínicas diversas (CL, MCL y VL).

En primer lugar, identificamos un gran número (1926) de genes diferencialmente expresados entre las cepas sensibles y resistentes en todas las especies de *Leishmania* (Fig. 1). Esto posiblemente sea consecuencia de las propiedades de base del parásito, empezando por el repertorio de genes únicos y los patrones de expresión que tengan una repercusión en su virulencia, los cuales necesariamente no tienen que estar vinculados a la resistencia a tratamientos. Ya que, *Leishmania* está expuesta a otras condiciones estresantes (ej. el estrés oxidativo en los macrófagos o la contaminación por arsénico en el medio) (Decuyper *et al.*, 2012; Yardley *et al.*, 2006). Ambos repertorios de genes diferencialmente expresados podrían discriminarse en estudios posteriores usando líneas celulares involucradas durante el proceso de infección del parásito sin intervención del tratamiento.

Entre las proteínas codificadas por los transcritos de las cepas resistentes, encontramos términos GO asociados principalmente procesos metabólicos, probablemente por la acción inhibitoria en la glicolisis o la oxidación de ácidos grasos por parte del antimonio trivalente, esto es concordante con estudios previos en *L. donovani* y *L. major* (Fig. 3) (Singh & Sundar, 2017; Rabhi *et al.*, 2012; Biyani *et al.*, 2011); en cuanto funciones moleculares evidenciamos la ontología génica asociada a uniones a diferentes compuestos, especialmente aquellos con propiedades iónicas, probablemente referido al secuestro de conjugados metal-tiol por parte de los cassettes de unión a ATP (transportadores ABC), un mecanismo de resistencia ampliamente reportado en especies como *L. infantum* y *L. major* (Manzano *et al.*, 2013; El Fadili *et al.*, 2005; Légare *et al.*, 2001); ya para los componentes estructurales del patógeno, el más significativo era la membrana, debido probablemente a propiedades como la cantidad de ergosteroles los cuales son requeridos para la protección frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en la activación biológica del antimonio y/o la presencia de transportadores (Mathur *et al.*, 2015; Frézard *et al.*, 2014). Muchas de las descripciones de los productos eran redundantes incluso después de la depuración con REVIGO, por lo que en oportunidades futuras la reconstrucción de vías de señalización podría ser una mejor alternativa a la hora de un análisis funcional.

Uno de los mecanismos adaptativos por los cuales se modula la dosis génica en especies ausentes de regulación transcripcional como *Leishmania*, es el cambio en el número de copias de cromosomas, cuyo número de base es un mosaico cromosomal donde se pueden presentar desde monosomías hasta cromosomas supernumerarios, aunque la mayoría de los cromosomas son disómicos (Rogers *et al.*, 2011). *Leishmania* además tiene la capacidad de amplificar y eliminar regiones específicas de algunos loci mediante eventos de reordenamiento y recombinación como una estrategia frente a los cambios ambientales (Laffitte *et al.*, 2016; Ubeda *et al.*, 2014). Estas podrían llegar a ser algunas de las posibles razones detrás de la sobrerepresentación de DEG a nivel del cromosoma 23 en las especies encontradas en el nuevo mundo y relacionadas con LC (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*) (Fig. 2). Aquí gran parte de los genes corresponden a transportadores ABC, involucrados en la entrada y distribución de la droga en el organismo (Douanne *et al.*, 2020; Barrera *et al.*, 2017). Aunque en otros estudios de aislamientos resistentes al Sb^{III} de especies del viejo mundo como *L. infantum* y *L. major* también se ha reportado aneuploidía significativa en el cromosoma 23, igualmente asociados a los transportadores ABC, lo que lo

apunta como un potencial biomarcador de resistencia más allá de la manifestación clínica del patógeno y su distribución geográfica (Brotherton *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013). Por otra parte, el cromosoma 34 de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* poseen genes relacionados con el metabolismo de la arginina, a la cual contribuye no solo al mantenimiento del balance de oxidación-reducción sino también en la expresión de factores de virulencia como GP63 y otros genes que codifican para amastinas, estas últimas importantes en la diferenciación de *Leishmania* (Passenda & da Silva, 2020). Sin embargo, en estudios posteriores se podrían aplicar datos genómicos para respaldar estas hipótesis.

Para la comparación de grupos ortólogos, se hallaron dos ortólogos compartidos entre especies de ambos subgéneros (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. panamensis*) (Fig. 4, Tabla S3). Uno de ellos OG6_152462, codificante para proteínas de unión a RNA (RBPs), las cuales están presentes en los procesos de control postranscripcional de la expresión de los genes, algo fundamental en los tripanosomátidos, posible razón que se encuentren presentes y diferencialmente expresados en varias especies. Incluso ya ha sido descrita como un blanco terapéutico de interés al afectar la virulencia del parásito debido a una expresión alterada (Rashidi *et al.*, 2020; Nocua *et al.*, 2017). El otro ortólogo fue OG6_200283, codificante para un componente del complejo NAD(P)H citocromo B5 oxidorreductasa, cuya sobreexpresión puede favorecer la supervivencia del parásito en un medio con deficiencia de lípidos, algo que experimenta no solo al estar expuesto al antimonio trivalente sino también durante su ciclo de vida. Es probable que se encuentre en varias especies por su participación en la síntesis de novo del ácido linolénico, ácido graso insaturado más común en *Leishmania* que a su vez ha sido relacionado con una disminución de estrés oxidativo por ROS (Mukherjee *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2012).

No obstante, el patrón general indica una proporción mayoritaria de genes ortólogos únicos de cada especie en comparación con aquellos compartidos entre una o más especies. Mientras que a nivel de subgéneros no se evidencia un número de relaciones ortólogas considerables, dentro de *L. (Leishmania)* no se presentan ortólogos propios y en *L. (Viannia)* solo se encuentran 7 genes ortólogos propios (Fig. 4). Esto se debe probablemente a que los mecanismos de la resistencia al antimonio son bastante complejos y multifactoriales, donde las características de cada especie pueden contribuir a la respuesta final, los que a su vez son un reflejo de la clasificación taxonómica, la ubicación geográfica y la manifestación clínica, aunque un análisis a nivel poblacional permitiría un análisis más a fondo (Fernández *et al.*, 2014; Jeddi *et al.*, 2014; Bañuls, 2007). Por otra parte, algunos de estos ortólogos pueden estar asociados a una respuesta general al estrés mientras que otros a los mecanismos de resistencia de *Leishmania* al antimonio, donde las cepas resistentes podrían modificar el comportamiento normal de las vías metabólicas para elaborar su fenotipo (Matrangolo *et al.*, 2013). Lo cual va de la mano con los diferentes mecanismos de acción que tiene la droga para combatir el parásito donde se incluyen la fragmentación de material genético, la inducción de estrés oxidativo, interferencia en las interacciones proteicas, incremento de Ca²⁺ intracelular, etc. (Chakravarty & Sundar, 2010; Haldar *et al.*, 2010; Croft *et al.*, 2006).

A nivel metodológico, posibles causas incluyen limitaciones sobre la cantidad de evidencia funcional e inherente anotación en una o varias especies, y la gran especificidad de los grupos ortólogos, donde dos o más genes pertenecientes a la misma vía metabólica y/o proceso de carácter molecular/estructural incluso a nivel de un mismo complejo sean tomados como

diferentes basados en características que en un orden práctico podrían ser prescindibles (Aslett *et al.*, 2010). Un ejemplo son los ortólogos OG6_101492 y OG6_101499, ambos putativos codifican para el mantenimiento estructural del cromosoma en *L. amazonensis*, pero uno de ellos pertenece a una familia proteica (Tabla S2). El uso de únicamente la secuencia de dos replicas biológicas para cada condición también puede repercutir en la generación de probables falencias de sensibilidad y especificidad estadística o la ausencia de datos sobre otros genes diferencialmente expresados. Otro escenario que puede contribuir a una mayor proporción de genes propios por especie es que el ortólogo sea compartido pero que su expresión diferencial sea diferente, como ocurre, por ejemplo, con OG6_119258 donde este transportador de nucleobases es subregulado en *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. infantum*, pero sobrerregulado en *L. panamensis* (Tabla S2, Tabla S3). Estos cambios en el transcriptoma también podrían estar correlacionados a empalmes trans alternativos, un mecanismo de heterogeneidad descrito en tripanosomátidos como *L. major* y *T. brucei* (Dillon *et al.*, 2015; Michaeli, 2011). Además, se pueden presentar cambios a nivel del transcrito atribuidos a diferencias en la maduración y estabilidad del ARNm mediados principalmente por eventos de poliadenilación o deadenilación, en gran medida por parte de proteínas de unión a ARN (Clayton, 2016).

En cuanto las limitaciones de nuestro estudio se deben tener en cuenta, el uso de promastigotes en lugar de amastigotes, considerando que se ha demostrado diferencias transcriptómicas en ambos estadios y que los amastigotes al ser la forma infectiva e intracelular del parásito representan la mejor alternativa en estudios *in vitro* de exposición a drogas (Vermeersch *et al.*, 2009). Condiciones experimentales que probablemente pueden repercutir en los resultados incluyen la estabilidad de las líneas sensibles y resistentes el cual es determinado por el tiempo en su medio respectivo. Cabe mencionar, que las rondas de selección de resistencia y su duración también variaban dependiendo de la especie, pero esto iba de la mano de las dosis necesarias hasta llegar a un punto de corte común (EC₅₀). Por otra parte, cabe mencionar que la resistencia y otros factores de virulencia pueden variar incluso de forma intraespecífica, por lo que estudios posteriores deberán considerar una mayor cantidad de cepas, de cada una de las especies evaluadas en este trabajo, preferiblemente recolectadas de zonas geográficas comunes (Urrea *et al.*, 2018; Rugani *et al.*, 2018). Establecer las relaciones de nuestros resultados con estudios llevados a nivel de proteoma y de estructura cromosomal (general y local), podría contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia y el establecimiento de patrones entre especies (Downing *et al.*, 2011). Investigaciones posteriores deben dirigirse a determinar el papel de las proteínas hipotéticas y genes con función desconocida ya que representan un porcentaje significativo de los potenciales marcadores individuales.

Nuestro estudio contribuye al conocimiento de los patrones de resistencia al antimonio trivalente de varias especies de *Leishmania* a nivel de expresión genética de acuerdo con su clasificación taxonómica diferencial. Se presentó una predominancia de respuestas propias, asociados principalmente a procesos biológicos y componentes celulares. Asimismo, se evidenciaron algunos DEG potenciales que podrían llegar a ser evaluados como blancos terapéuticos dirigidos a un subgénero o manifestación clínica específica, los cuales dada su función pueden estar regulados en condiciones estresantes más allá de la exposición al Sb^{III}, como la deficiencia lipídica y el control postranscripcional (proteína de unión a RNA y al citocromo B5). Por otra parte, la resistencia al antimonio trivalente es un fenómeno

multifactorial por lo que se deben considerar y controlar otras variables, las cuales incluyen propiedades intrínsecas del parásito y del tratamiento. Esta información junta sugiere que las investigaciones de los mecanismos de resistencia deben ser dirigidas a componentes especie específicos, principalmente aquellos asociados al estrés oxidativo, la membrana y el transporte de la droga en el parásito.

REFERENCIAS

Acino Brettmann, E. (2017). *The Role of RNA Interference in the Control of Leishmania RNA virus 1 Infection*. Retrieved from https://openscholarship.wustl.edu/art_sci_etds/1090

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>

Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., ... Sereno, D. (2017, October 1). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 57, pp. 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>

Alemayehu, B., & Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, 11(4), <https://doi.org/10.21767/1791-809x.1000519>

Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>

Andrade, J. M & Murta, S. (2014). *Functional analysis of cytosolic trypanothione peroxidase in antimony-resistant and -susceptible Leishmania braziliensis and Leishmania infantum lines*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 406–. doi:10.1186/1756-3305-7-406

Andrade, J. M., Gonçalves, L. O., Liarte, D. B., Lima, D. A., Guimarães, F. G., de Melo Resende, D., Santi, A., de Oliveira, L. M., Velloso, J., Delfino, R. G., Pescher, P., Späth, G. F., Ruiz, J. C., & Murta, S. (2020). Comparative transcriptomic analysis of antimony resistant and susceptible *Leishmania infantum* lines. *Parasites & vectors*, 13(1), 600. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04486-4>

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Arevalo, J., Ramirez, L., Adui, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., ... Llanos-Cuentas, A. (2007). Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 195(12), 1846–1851. <https://doi.org/10.1086/518041>

Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., Depledge, D. P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M. J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., ... Wang, H. (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic acids research*, 38(Database issue), D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>

Aurrecochea, C., Barreto, A., Basenko, E. Y., Brestelli, J., Brunk, B. P., Cade, S., ... Zheng, J. (2017). EuPathDB: The eukaryotic pathogen genomics database resource. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D581–D591. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1105>

Bañuls, A. L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007, January 1). Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, Vol. 64, pp. 1–458. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)

- Barrera, M. C., Rojas, L. J., Weiss, A., Fernandez, O., McMahon-Pratt, D., Saravia, N. G., & Gomez, M. A. (2017). Profiling gene expression of antimony response genes in *Leishmania (Viannia) panamensis* and infected macrophages and its relationship with drug susceptibility. *Acta Tropica*, 176, 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.017>
- Biyani, N., Singh, A. K., Mandal, S., Chawla, B., & Madhubala, R. (2011). Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 179(2), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.06.004>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pagès, M., Dedet, J. P., & Wincker, P. (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*, 222(1), 107–117. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00472-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00472-7)
- Brotherton, M.-C., Bourassa, S., Leprohon, P., Légaré, D., Poirier, G. G., Droit, A., & Ouellette, M. (2013). Proteomic and Genomic Analyses of Antimony Resistant *Leishmania infantum* Mutant. *PLoS ONE*, 8(11), e81899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081899>
- Burza, S., Croft, S. L. and Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet*, 392, 951-970. doi: 10.1016/s0140-6736(18)31204-2.
- Chakravarty, J., & Sundar, S. (2010). Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, 2(2), 167–176. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62887>
- Clayton, C. E. (2016, August 1). Gene expression in Kinetoplastids. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 32, pp. 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.018>
- Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 111–126. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
- de Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015, March 18). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*, Vol. 16, pp. 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
- Denis, S., Carla, M., & Khatima, A. O. (2012). Antimony resistance and environment: Elusive links to explore during *Leishmania* life cycle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.07.003>
- Depledge, D. P., Evans, K. J., Ivens, A. C., Aziz, N., Maroof, A., Kaye, P. M., & Smith, D. F. (2009). Comparative Expression Profiling of *Leishmania*: Modulation in Gene Expression between Species and in Different Host Genetic Backgrounds. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(7), e476. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000476>
- Decuypere, S., Vanaerschot, M., Bruncker, K., Imamura, H., Müller, S., Khanal, B., ... Coombs, G. H. (2012). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Natural *Leishmania* Populations Vary with Genetic Background. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1514. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001514>
- Dillon, L. A., Okrah, K., Hughitt, V. K., Suresh, R., Li, Y., Fernandes, M. C., Belew, A. T., Corrada Bravo, H., Mosser, D. M., & El-Sayed, N. M. (2015). Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania* major differentiation. *Nucleic acids research*, 43(14), 6799–6813. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv656>
- Diotalleivi, A., Buffi, G., Ceccarelli, M., Neitzke-Abreu, H. C., Gnutzmann, L. V., da Costa Lima, M. S., ... Galluzzi, L. (2020). Real-time PCR to differentiate among *Leishmania (Viannia)* subgenus, *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Application on Brazilian clinical samples. *Acta Tropica*, 201, 105178. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105178>

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, 5, 276. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>

Douanne, N., Wagner, V., Roy, G., Leprohon, P., Ouellette, M., & Fernandez-Prada, C. (2020). MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in *Leishmania infantum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 13, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.03.003>

Doyle, M. (2019) Visualization of RNA-Seq results with Volcano Plot (Galaxy Training Materials). [/training-material/topics/transcriptomics/tutorials/rna-seq-viz-with-volcanoplot/tutorial.html](https://training-material/topics/transcriptomics/tutorials/rna-seq-viz-with-volcanoplot/tutorial.html) Online; accessed Sat Jan 09 2021

Downing, T., Imamura, H., Decuyper, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., Cotton, J. A., ... Berriman, M. (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Research*, 21(12), 2143–2156. <https://doi.org/10.1101/gr.123430.111>

Dumetz, F., Imamura, H., Sanders, M., Seblova, V., Myskova, J., Pescher, P., ... Domagalska, M. A. (2017). Modulation of aneuploidy in *leishmania donovani* during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. *MBio*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00599-17>

Eddaikra, N., Ait-Oudhia, K., Kherrachi, I., Oury, B., Moulti-Mati, F., Benikhlef, R., ... Sereno, D. (2018). Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), e0006310. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006310>

El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., Roy, G., Guimond, C., Trudel, N., Saravia, N. G., Papadopoulou, B., Légaré, D., & Ouellette, M. (2005). Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1988–1993. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1988-1993.2005>

Fernandes, A. P., Canavaci, A. M. C., McCall, L. I., & Matlashewski, G. (2014). A2 and other visceralizing proteins of *Leishmania*: Role in pathogenesis and application for vaccine development. *Sub-Cellular Biochemistry*, 74, 77–101. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_3

Fernández, O. L., Diaz-Toro, Y., Ovalle, C., Valderrama, L., Muvdi, S., Rodríguez, I., Gomez, M. A., & Saravia, N. G. (2014). Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(5), e2871. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002871>

Fraga, J., Montalvo, A. M., Van der Auwera, G., Maes, I., Dujardin, J. C., & Requena, J. M. (2013). Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.020>

Frézard, F., Monte-Neto, R., & Reis, P. G. (2014). Antimony transport mechanisms in resistant *leishmania* parasites. *Biophysical reviews*, 6(1), 119–132. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0134-y>

Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018, May 2). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, Vol. 11, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>

Haldar, A. K., Sen, P., & Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular biology international*, 2011, 571242. <https://doi.org/10.4061/2011/571242>

Hashiguchi, Y., & Gomez, E. A. (2018, June 28). Importance of *Leishmania* Species and Vector Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Identification. *Journal of Medical Entomology*, Vol. 55, pp. 773–774. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy044>

Hefnawy, A., Berg, M., Dujardin, J. C., & De Muylder, G. (2017, March 1). Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends in Parasitology*, Vol. 33, pp. 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003>

Iantorno, S. A., Durrant, C., Khan, A., Sanders, M. J., Beverley, S. M., Warren, W. C., ... Grigg, M. E. (2017). Gene expression in *Leishmania* is regulated predominantly by gene dosage. *MBio*, 8(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01393-17>

Jain, K., & Jain, N. K. (2015, June 11). Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 422, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.017>

Jeddi, F., Mary, C., Aoun, K., Harrat, Z., Bouratbine, A., Faraut, F., Benikhlef, R., Pomares, C., Pratlong, F., Marty, P., & Piarroux, R. (2014). Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(8), 4866–4874. <https://doi.org/10.1128/AAC.02521-13>

Laffitte, M. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *PLoS ONE*, 11(12), e2350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162888>

Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y. D., Rosen, B. P., Haimeur, A., ... Ouellette, M. (2001). The *Leishmania* ATP-binding Cassette Protein PGPA is an Intracellular Metal-Thiol Transporter ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26301–26307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102351200>

Leprohon, P., Légaré, D., Raymond, F., Madore, E., Hardiman, G., Corbeil, J., & Ouellette, M. (2009). Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic acids research*, 37(5), 1387–1399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1069>

Lin, G., Chai, J., Yuan, S., Mai, C., Cai, L., Murphy, R. W., ... Luo, J. (2016). VennPainter: A Tool for the Comparison and Identification of Candidate Genes Based on Venn Diagrams. *PLOS ONE*, 11(4), e0154315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154315>

Lindoso, J., Costa, J., Queiroz, I. T., & Goto, H. (2012). Review of the current treatments for leishmaniases. *Research and reports in tropical medicine*, 3, 69–77. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S24764>

Llanes, A., Restrepo, C. M., Vecchio, G. Del, Anguizola, F. J., & Lleonart, R. (2015). The genome of *Leishmania panamensis*: Insights into genomics of the L. (Viannia) subgenus. *Scientific Reports*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep08550>

Love MI, Huber W, Anders S (2014). “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.” *Genome Biology*, 15, 550. doi: [10.1186/s13059-014-0550-8](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8).

Manzano, J. I., García-Hernández, R., Castanys, S., & Gamarro, F. (2013). A new ABC half-transporter in leishmania major is involved in resistance to antimony. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3719–3730. <https://doi.org/10.1128/AAC.00211-13>

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Marín, M., Aguilar, Y. A., Ramírez, J. R., Triana, O., & Muskus, C. E. (2008). Molecular and immunological analyses suggest the absence of hydrophilic surface proteins in *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Biomedica*, 28(3), 423–432. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.80>

Maharjan, M., & Madhubala, R. (2015). Heat shock protein 70 (HSP70) expression in antimony susceptible/resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Nepal Journal of Biotechnology*, 3(1), 22–28. <https://doi.org/10.3126/njb.v3i1.14225>

Mathur, R., Das, R. P., Ranjan, A., & Shaha, C. (2015). Elevated ergosterol protects *Leishmania* parasites against antimony-generated stress. *FASEB Journal*, 29(10), 4201–4213. <https://doi.org/10.1096/fj.15-272757>

Matrangolo, F. S. V., Liarte, D. B., Andrade, L. C., De Melo, M. F., Andrade, J. M., Ferreira, R. F., ... Murta, S. M. F. (2013). Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 190(2), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.06.006>

- Michaeli, S. (2011, April). Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology*, Vol. 6, pp. 459–474. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.20>
- Monte-Neto, R., Laffitte, M. C., Leprohon, P., Reis, P., Frézard, F., & Ouellette, M. (2015). Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(2), e0003476. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003476>
- Mukherjee, S., Sen Santara, S., Das, S., Bose, M., Roy, J., & Adak, S. (2012). NAD(P)H cytochrome b5 oxidoreductase deficiency in *Leishmania major* results in impaired linoleate synthesis followed by increased oxidative stress and cell death. *The Journal of biological chemistry*, 287(42), 34992–35003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.389338>
- Mukherjee, A., Boisvert, S., Monte-Neto, R. L. do, Coelho, A. C., Raymond, F., Mukhopadhyay, R., ... Ouellette, M. (2013). Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. *Molecular Microbiology*, 88(1), 189–202. <https://doi.org/10.1111/mmi.12178>
- Mukherjee, A., Adhikari, A., Das, P., Biswas, S., Mukherjee, S., & Adak, S. (2018). Loss of virulence in NAD(P)H cytochrome b5 oxidoreductase deficient *Leishmania major*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(1), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.037>
- Nocua, P. A., Ramirez, C. A., Requena, J. M., & Puerta, C. J. (2017). *Leishmania braziliensis* SCD6 and RBP42 proteins, two factors with RNA binding capacity. *Parasites and Vectors*, 10(1), 610. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2557-y>
- Oryan, A., & Akbari, M. (2016, October 1). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol. 9, pp. 925–932. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>
- Ovalle-Bracho, C., Camargo, C., Díaz-Toro, Y., & Parra-Muñoz, M. (2018). Molecular typing of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and species of the subgenus *Viannia* associated with cutaneous and mucosal leishmaniasis in Colombia: A concordance study. *Biomedica*, 38(1), 86–95. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3632>
- Patino, L. H., Imamura, H., Cruz-Saavedra, L., Pavia, P., Muskus, C., Méndez, C., ... Ramírez, J. D. (2019). Major changes in chromosomal copy, gene expression and gene dosage driven by SbIII in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45538-9>
- Patino, L. H., Muskus, C., & Ramírez, J. D. (2019). Transcriptional responses of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the presence of trivalent sodium stibogluconate. *Parasites and Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3603-8>
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., ... Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, 39(7), 839–847. <https://doi.org/10.1038/ng2053>
- Pertea, G., & Pertea, M. (2020). GFF Utilities: GffRead and GffCompare. *F1000Research*, 9, 304. <https://doi.org/10.12688/f1000research.23297.2>
- Pessenda, G., & da Silva, J. S. (2020, July 1). Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. *Parasite Immunology*, Vol. 42. <https://doi.org/10.1111/pim.12722>
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(12), e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Rabhi, I., Rabhi, S., Ben-Othman, R., Rasche, A., Consortium, S., Daskalaki, A., ... Guizani-Tabbane, L. (2012). Transcriptomic Signature of *Leishmania* Infected Mice Macrophages: A Metabolic Point of View. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1763. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001763>

Rashidi, S., Kalantar, K., Fernandez-Rubio, C., Anvari, E., Nguewa, P., & Hatam, G. (2020, February 1). Chitin binding protein as a possible RNA binding protein in *Leishmania* parasites. *Pathogens and Disease*, Vol. 78. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa007>

Rastrojo, A., García-Hernández, R., Vargas, P., Camacho, E., Corvo, L., Imamura, H., Dujardin, J. C., Castanys, S., Aguado, B., Gamarro, F., & Requena, J. M. (2018). Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 8(2), 246–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.04.002>

Restrepo, C. M., Llanes, A., Cedeño, E. M., Chang, J. H., Álvarez, J., Ríos, M., ... Lleontart, R. (2019). Environmental conditions may shape the patterns of genomic variations in *Leishmania panamensis*. *Genes*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/genes10110838>

Rochette, A., Raymond, F., Ubeda, J. M., Smith, M., Messier, N., Boisvert, S., ... Papadopoulou, B. (2008). Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics*, 9(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-255>

Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., ... Mottram, J. C. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, 21(12), 2129–2142. <https://doi.org/10.1101/gr.122945.111>

Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M. X., Ouellette, M., & Saravia, N. G. (2006). Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 193(10), 1375–1383. <https://doi.org/10.1086/503371>

Romero, G. A. S., De Farias Guerra, M. V., Paes, M. G., & De Oliveira Macêdo, V. (2001). Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 456–465. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.456>

Rugani, J. N., Quaresma, P. F., Gontijo, C. F., Soares, R. P., & Monte-Neto, R. L. (2018). Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 1170–1180. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.149>

Singh, N. & Sundar, S. (2017). Integrating genomics and proteomics permits identification of immunodominant antigens associated with drug resistance in human visceral leishmaniasis in India. *Experimental Parasitology*, 176(), 30–45. doi:10.1016/j.exppara.2017.02.019

Steverding D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 10(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

Sundar, S., & Chakravarty, J. (2015, February 1). An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, Vol. 16, pp. 237–252. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.973850>

Sundar, S., Chakravarty, J., & Meena, L. P. (2019, January 2). Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, Vol. 7, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1080/21678707.2019.1552853>

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Ubeda, J.-M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., ... Ouellette, M. (2014). Genome-Wide Stochastic Adaptive DNA Amplification at Direct and Inverted DNA Repeats in the Parasite *Leishmania*. *PLoS Biology*, 12(5), e1001868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001868>

Uliana, S. R. B., Trinconi, C. T., & Coelho, A. C. (2018, April 1). Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. *Parasitology*, Vol. 145, pp. 464–480. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002523>

Urrea, D. A., Duitama, J., Imamura, H., Álzate, J. F., Gil, J., Muñoz, N., ... Triana-Chavez, O. (2018). Genomic Analysis of Colombian *Leishmania panamensis* strains with different level of virulence. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35778-6>

Valero, N. N. H., & Uriarte, M. (2020, February 1). Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology Research*, Vol. 119, pp. 365–384. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06575-5>

Vanaerschot, M., Dumetz, F., Roy, S., Ponte-Sucre, A., Arevalo, J., & Dujardin, J. C. (2014). Treatment failure in leishmaniasis: Drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, Vol. 12, pp. 937–946. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.916614>

Vanlerberghe, V., Diap, G., Guerin, P. J., Meheus, F., Gerstl, S., Stuyft, P. Van Der, & Boelaert, M. (2007). Drug policy for visceral leishmaniasis: A cost-effectiveness analysis. *Tropical Medicine and International Health*, 12(2), 274–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01782.x>

Verma, A., Bhandari, V., Deep, D. K., Sundar, S., Dujardin, J. C., Singh, R., & Salotra, P. (2017). Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in *Leishmania donovani*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7(3), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.10.004>

Vermeersch, M., da Luz, R. I., Toté, K., Timmermans, J. P., Cos, P., & Maes, L. (2009). In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 3855–3859. <https://doi.org/10.1128/AAC.00548-09>

Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Yardley, V., Ortuño, N., Llanos-Cuentas, A., Chappuis, F., Doncker, S. D., Ramirez, L., ... Dujardin, J. (2006). American Tegumentary Leishmaniasis: Is Antimonial Treatment Outcome Related to Parasite Drug Susceptibility? *The Journal of Infectious Diseases*, 194(8), 1168–1175. <https://doi.org/10.1086/507710>