



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



LAÍSA VILAR CORDEIRO

**CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA
AO ANTIMONIAL TRIVALENTE (SbIII) EM ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Leishmania (Viannia) braziliensis***

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

JOÃO PESSOA

2017



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



LAÍSA VILAR CORDEIRO

**CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA
AO ANTIMONIAL TRIVALENTE (SbIII) EM ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Orientadora: Prof^ª. Dr. Márcia Rosa de Oliveira

JOÃO PESSOA

2017

C794c Cordeiro, Laísa Vilar.
Correlação entre parâmetros de virulência e resistência ao antimonial trivalente (SbIII) em isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Laísa Vilar Cordeiro.- João Pessoa, 2017.
97f. : il.
Orientadora: Márcia Rosa de Oliveira
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Biologia celular e molecular. 2. *Leishmania braziliensis*.
3. Resistência ao antimonial trivalente. 4. Virulência.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



LAÍSA VILAR CORDEIRO

Dissertação de mestrado avaliada em: 16 / 02 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr. Márcia Rosa de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Louisa Maria de Andrade e Sousa

Universidade Federal da Paraíba

Examinador externo

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

Universidade Federal da Paraíba

Examinador interno

JOÃO PESSOA

2017

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor e carinho. Agradeço de forma especial à minha mãe, que sempre compreendeu minhas escolhas, minhas ausências e me acalmou nos momentos de angústias e dificuldades.

Ao meu namorado e amigo, André Parente, por toda paciência e carinho, por me incentivar diariamente a seguir na vida acadêmica e por todo apoio incondicional que sempre me deu.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Rosa de Oliveira, por ter me concedido a oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa. Por ter estado sempre perto, orientando cada parte da minha pesquisa com maestria, aberta a sugestões e respondendo pacientemente todos os meus questionamentos. A ela toda minha gratidão por sempre ter sido sempre tão generosa, compreensiva e por muitas vezes ter feito além do seu papel de orientadora, sendo uma verdadeira amiga.

A Patrícia Néris, pela generosidade em me ensinar tão bem tudo que pôde, pela imensa ajuda na realização de todos os experimentos e pela paciência diária. Agradeço também pelos momentos de conversa, pelos conselhos e incentivos que sempre me deu.

Aos meus colegas de laboratório: Klinger, Mayara, Vanessa e Daiana, por terem compartilhado comigo seus aprendizados e me auxiliado durante a minha chegada no laboratório de leishmanioses.

A todos os professores que contribuíram para minha formação pessoal e profissional, especialmente à Prof.^a Dr.^a Daniela Priscila Marchi-Salvador, que foi minha primeira “mãe científica” e responsável por iniciar minha caminhada enquanto pesquisadora.

Aos meus colegas de turma no PPGBCM, que contribuíram de maneira enriquecedora para todas as discussões em sala de aula. Agradeço principalmente a Giulian, Aleson, Sarah, Daiana, Fran, Vanessa e Angélica pela amizade, por todos os momentos de descontração em meio aos problemas, pelas alegrias proporcionadas e por terem me ajudado sempre que foi necessário.

A Prof.^a Dr.^a Louísa Andrade, pelo auxílio prestado durante este trabalho.

Aos funcionários do DBM e do PPGBCM, Regina, Ludmilla, Geralda, Cláudia, Bosco e Moreira, pelo auxílio durante as atividades acadêmicas.

RESUMO

CORDEIRO, L. V. **Correlação entre os parâmetros de virulência e resistência ao antimonial trivalente (SbIII) em isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2017. Dissertação (Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2017).

O tratamento com os antimoniais possui várias limitações, dentre elas o crescente surgimento de parasitos resistentes a estas drogas. Agravando esta situação, recentes evidências de que os parâmetros resistência a antimoniais e virulência possam estar correlacionados em *Leishmania* sp. têm sido publicadas na literatura. Dentro deste contexto, este trabalho objetivou investigar se existe correlação entre os parâmetros de virulência e resistência ao antimonial trivalente (SbIII) a partir de dois isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* denominados AF e JCTS. Foram selecionadas formas promastigotas destes parasitos resistentes ao SbIII, obtendo-se culturas com um nível de resistência correspondente a 14 e 13 vezes a IC₅₀ da cultura selvagem (sensível ao SbIII) para os isolados AF e JCTS, respectivamente. Ao analisar a estabilidade do fenótipo de resistência adquirido, verificou-se que ambos os isolados clínicos apresentaram um perfil instável, com progressiva reversão da resistência após sucessivos repiques na ausência da droga. Em análise morfológica, foi possível observar que as duas culturas resistentes ao SbIII apresentaram maior quantidade de formas promastigotas com características de metacíclicas quando comparado com as culturas sensíveis. Contudo, o perfil de crescimento em meio de cultivo foi semelhante para as culturas sensíveis e resistentes de ambos os isolados clínicos. Em fase estacionária de crescimento, a porcentagem de soro que causou 50% de lise celular (EC₅₀) da cultura AF sensível ao SbIII foi de 2,3%, enquanto que a correspondente cultura resistente à droga apresentou EC₅₀ de 9,4%. De modo semelhante, as culturas JCTS sensível e resistente ao SbIII apresentaram EC₅₀ de 2,5% e 18,4%, respectivamente. Assim, as culturas resistentes ao SbIII, de ambos os isolados clínicos, foram mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento do que as culturas sensíveis à droga. As culturas resistentes ao SbIII também apresentaram maior virulência *in vitro* sobre macrófagos murinos quando comparadas às correspondentes culturas sensíveis. O índice de infecção determinado para AF sensível e resistente ao SbIII foi de 260 e 593. Para JCTS sensível e resistente ao SbIII foi de 115 e 207, respectivamente. No modelo de infecção *in vivo* em camundongos suíços não foi evidenciada virulência significativa em nenhuma das culturas de *L. braziliensis*. Dessa forma, conclui-se que há uma correlação entre parâmetros de virulência *in vitro* e resistência ao SbIII em *L. braziliensis*.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; Resistência ao antimonial trivalente; Virulência.

ABSTRACT

CORDEIRO, L. V. **Correlation between virulence parameters and resistance to trivalent antimonial (SbIII) in clinical isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2017. Dissertação (Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2017).

Treatment with antimonials has several limitations, among them the progressive emergence of parasites resistant to these drugs. In this situation, recent evidence suggests that the parameters antimonial resistance and virulence may be correlated in *Leishmania* sp. have been published in the literature. In this context, this work aimed to investigate whether there is a correlation between virulence and resistance to trivalent antimonial (SbIII) from two clinical isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, named AF and JCTS. Promastigote forms of these parasites resistant to SbIII were selected, obtaining cultures with a resistance level corresponding to 14 and 13 times the wild-type IC₅₀ (sensitive to SbIII) for the isolates AF and JCTS, respectively. When analyzing the stability of the phenotype of acquired resistance, it was verified that both clinical isolates presented an unstable profile, with progressive reversion of resistance after successive passages in drug absence. In morphological analysis, it was observed that two cultures resistant to SbIII presented higher amount of promastigote forms with metacyclic characteristics when compared to sensitive cultures. However, the growth in culture medium was similar for sensitive and resistant cultures of both clinical isolates. In stationary phase of growth, the percentage of serum that caused 50% of cellular lysis (EC₅₀) of the AF culture sensitive to SbIII was 2.3%, whereas the corresponding drug resistant culture presented EC₅₀ 9.4%. Similarly, the sensitive and SbIII resistant JCTS cultures showed EC₅₀ 2.5% and 18.4%, respectively. Thus, cultures resistant to SbIII from both clinical isolates were more resistant to complement-mediated lysis than drug-sensitive cultures. SbIII resistant cultures also showed greater *in vitro* virulence on murine macrophages when compared to the corresponding sensitive cultures. The infection rate determined for sensitive and resistant SbIII AF was 260 and 593. For sensitive and resistant SbIII JCTS was 115 and 207, respectively. In the model of infection *in vivo* in swiss mice, no significant virulence was evident in any culture of *L. braziliensis*. Thus, we conclude that there is a correlation between parameters of *in vitro* virulence and resistance to SbIII in *L. braziliensis*.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; Resistance to trivalent antimonial; Virulence.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – *ATP-binding cassette*

ACR2 – Enzima antimônio tiol redutase

AF – Isolado clínico de *Leishmania braziliensis*: MHOM/BR/2011/AF

AF (R) – Isolado clínico de *L. braziliensis*: MHOM/BR/2011/AF resistente ao antimônio trivalente

AF (S) – Isolado clínico de *L. braziliensis*: MHOM/BR/2011/AF sensível ao antimônio trivalente

AQPR1 – Transportador aquagliceroforina

AQP1 – Aquaporina 1

CO₂ – Gás carbônico

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

EC₅₀ – Concentração que provoca morte de 50% dos parasitos

Gp63 – Glicoproteína de 63kDa

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% do crescimento

IL-10 – Interleucina 10

IFN- γ – Interferon gama

JCTS – Isolado clínico de *Leishmania braziliensis*: MHOM/BR/2010/JCTS

JCTS (R) – Isolado clínico de *L. braziliensis*: MHOM/BR/2010/JCTS resistente ao antimônio trivalente

JCTS (S) – Isolado clínico de *L. braziliensis*: MHOM/BR/2010/JCTS sensível ao antimônio trivalente

KMP-11 – *Kinetoplastid membrane protein 11*

- LCD** – Leishmaniose cutânea difusa
- LCDS** – Leishmaniose cutânea disseminada
- LCL** – Leishmaniose cutânea localizada
- LMC** – Leishmaniose mucocutânea
- LPG** – Lipofosfoglicano
- LT** – Leishmaniose tegumentar
- LV** – Leishmaniose visceral
- MAC** – Complexo de ataque à membrana
- MASP** – *Mannose associated serine proteases*
- MBL** – *Mannose binding lectin*
- M ϕ** – Macrófago
- NO** – Óxido nítrico
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- PAMPs** – Padrões moleculares associados a patógenos
- PKDL** – Leishmaniose dérmica pós-calazar
- PRR** – Receptores de reconhecimento padrão
- PSG** – Gel secretório de promastigotas
- SBF** – Soro bovino fetal
- SbIII** – Antimonial trivalente
- SbV** – Antimonial pentavalente
- SINAN** – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
- TDR1** – Enzima tiol redutase dependente
- TNF- α** – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL).....	16
Figura 2 – Leishmaniose cutânea localizada.....	17
Figura 3 – Leishmaniose cutânea disseminada.....	17
Figura 4 – Leishmaniose cutânea difusa.....	18
Figura 5 – Leishmaniose mucocutânea.....	19
Figura 6 – Regiões endêmicas de leishmaniose visceral e tegumentar, 2013.....	20
Figura 7 – Insetos vetores das diferentes espécies do gênero <i>Leishmania</i>	23
Figura 8 – Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	24
Figura 9 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	26
Figura 10 – Forma promastigota procíclica e metacíclica de <i>Leishmania braziliensis</i>	27
Figura 11 – Formas promastigotas de isolados clínicos de <i>Leishmania braziliensis</i> sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente (SbIII) em sétimo dia de cultivo (fase estacionária de crescimento).....	58
Figura 12 – Macrófagos murinos infectados com isolado clínico de <i>Leishmania braziliensis</i> AF sensível e resistente ao antimônio trivalente.....	67
Figura 13 – Macrófagos murinos infectados com isolado clínico de <i>Leishmania braziliensis</i> JCTS sensível e resistente ao antimônio trivalente.....	68

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Forma clínica e características das lesões dos pacientes com leishmaniose envolvidos no estudo.....**41**
- Quadro 2** – Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico AF.....**53**
- Quadro 3** – Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico JCTS.....**54**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (SbIII) em isolados clínicos (AF e JCTS) de <i>Leishmania braziliensis</i>	49
Gráfico 2 – Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (SbIII) em isolados clínicos resistentes (AF(R) e JCTS(R)) de <i>Leishmania braziliensis</i>	50
Gráfico 3 – Estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico AF.....	52
Gráfico 4 – Estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico JCTS.....	54
Gráfico 5 – Curva de crescimento de isolados clínicos de <i>Leishmania braziliensis</i> sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente (SbIII).....	56
Gráfico 6 – Sensibilidade à lise pelo sistema complemento (fase logarítmica de crescimento).....	59
Gráfico 7 – Porcentagem de promastigotas viáveis quando expostas a diferentes porcentagens de soro humano.....	60
Gráfico 8 – Sensibilidade à lise pelo sistema complemento (fase estacionária de crescimento).....	61
Gráfico 9 – Porcentagem de macrófagos infectados pelos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente.....	63
Gráfico 10 – Número de amastigotas por macrófagos infectados pelos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente.....	65
Gráfico 11 – Índice de infecção de macrófagos murinos infectados pelos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente.....	66
Gráfico 12 – Espessura das patas de camundongos suíços infectados pelo isolado clínico de <i>Leishmania braziliensis</i> AF em comparação com as espessuras das patas não infectadas.....	71
Gráfico 13 – Espessura das patas de camundongos suíços infectadas pelo isolado clínico de <i>Leishmania braziliensis</i> AF sensível em comparação com as espessuras das patas infectadas por AF resistente.....	72
Gráfico 14 – Espessura das orelhas de camundongos suíços infectadas pelo isolado clínico de <i>Leishmania braziliensis</i> AF sensível em comparação com as espessuras das orelhas infectadas por AF resistente.....	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Leishmanioses.....	15
1.2 Epidemiologia das leishmanioses.....	19
1.3 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp. e o processo de metaciclogênese.....	22
1.4 O papel do sistema complemento nas infecções por <i>Leishmania</i> sp.....	29
1.5 Tratamento das leishmanioses e resistência aos antimoniais.....	31
1.6 Resistência aos antimoniais e virulência do parasito.....	34
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Parasitos.....	41
3.2 Manutenção das culturas.....	42
3.3 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração de antimônio trivalente que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC ₅₀).....	42
3.4 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente (SbIII).....	43
3.5 Análise da estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio trivalente adquirido pelos isolados clínicos de <i>L. braziliensis</i>	43
3.6 Curva de crescimento de isolados clínicos de <i>L. braziliensis</i> sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente.....	43
3.7 Análise da morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII.....	44
3.8 Teste de lise pelo sistema complemento.....	44

3.8.1 Obtenção de soro a partir de sangue humano.....	44
3.8.2 Sensibilidade à lise mediada pelo sistema complemento.....	45
3.9 Infecção de macrófagos murinos.....	45
3.10 Infecção <i>in vivo</i> em camundongos suíços.....	47
3.11 Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Sensibilidade de isolados de <i>L. braziliensis</i> ao antimônio trivalente.....	49
4.2 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente (SbIII).....	50
4.3 Análise da estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio trivalente adquirido pelos isolados clínicos de <i>L. braziliensis</i>.....	52
4.4 Perfil de crescimento de isolados clínicos de <i>L. braziliensis</i> sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente.....	56
4.5 Análise da morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII.....	57
4.6 Sensibilidade à lise mediada pelo sistema complemento.....	59
4.7 Infecção de macrófagos murinos.....	62
4.8 Infecção <i>in vivo</i> em camundongos suíços.....	70
5. CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

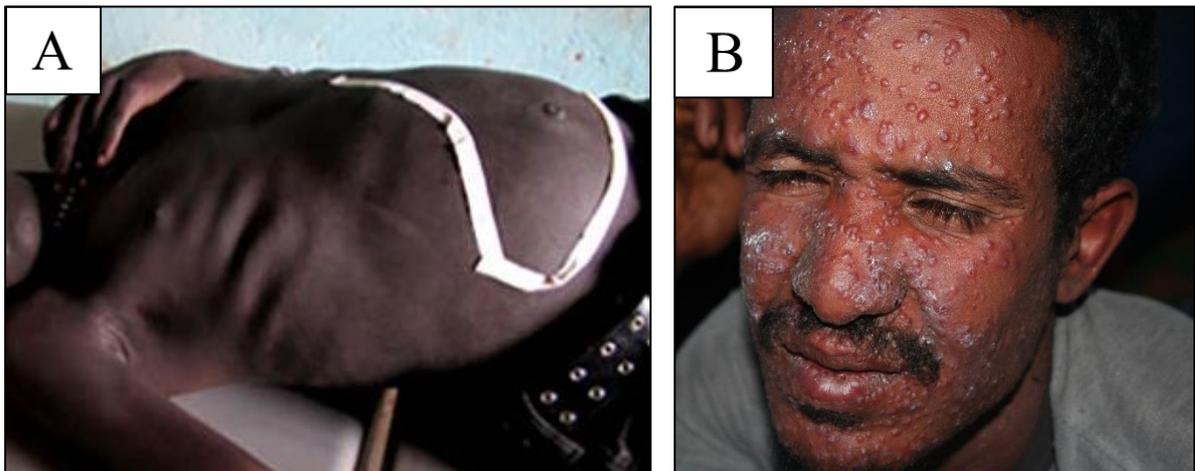
As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas ao homem pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Elas estão inseridas no grupo das doenças negligenciadas, que acometem principalmente países tropicais e populações de baixa condição socioeconômica. (MURRAY et al., 2005; FEASEY et al., 2010). Embora estime-se que 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorram anualmente, ainda há uma disponibilidade de recursos muito aquém da necessária para que essas doenças sejam erradicadas (WHO, 2016a), pois despertam pouco interesse por parte das grandes empresas farmacêuticas para investimento em pesquisa, produção de medicamentos mais eficazes e vacinas (MURRAY et al., 2005; LINDOSO; LINDOSO, 2009; FEASEY et al., 2010).

As características clínicas das leishmanioses são de ampla diversidade, variando conforme um conjunto de fatores que envolvem a espécie do flebótomo, a virulência e genética do parasito, fatores ambientais, bem como a capacidade imunológica e genética do hospedeiro mamífero (MURRAY et al., 2005; ZERPA et al., 2007). De acordo com as manifestações clínicas, essas doenças são divididas em dois grupos: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A LT se subdivide em quatro tipos básicos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada (LCDS), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012; BARBOSA; COSTA, 2013).

A leishmaniose visceral é uma forma grave da doença, que recebe esse nome por acometer as vísceras, causando organomegalia, especialmente do fígado e baço (Figura 1A). É popularmente conhecida como calazar (do indu *kala-azar*. *Kala* = negra, *azar* = febre), e caracteriza-se por episódios irregulares de febre alta, considerável perda de peso, pancitopenia, anemia e discreto aumento da pigmentação da pele em alguns pacientes (ALVAR et al., 2012). Caso não tratada, a taxa de óbito é aproximadamente 100%. Os agentes etiológicos relacionados a essa forma clínica são a *Leishmania donovani*, no Velho Mundo e a *L. infantum/chagasi*, encontrada no Velho e Novo Mundo (VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2012; WHO, 2016b). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) é uma

complicação da leishmaniose visceral que geralmente aparece seis meses a um ano ou mais após cura aparente da doença, mas pode ocorrer antes ou mesmo simultaneamente com a LV. É caracterizada por máculas hipopigmentadas, pápulas, erupção cutânea e nodular (Figura 1B). A PKDL ocorre principalmente em áreas onde *L. donovani* é endêmica (DOGANIS et al., 2015).

Figura 1 – Leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL)



Fonte: WHO, 2016b. Leishmaniose visceral (A) causando organomegalia e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) (B), onde é possível observar a presença de múltiplas lesões dérmicas nodulares na face do paciente.

A leishmaniose cutânea localizada é considerada a forma mais comum da doença. Pode ter início como pequenas pápulas vermelhas e progredir para úlceras características com bordas elevadas, de centro avermelhado e granuloso, nas regiões de picada do inseto vetor ou áreas próximas (Figura 2). As úlceras são confinadas à derme e geralmente acometem partes expostas do corpo, como a face, braços e pernas (DASSONI et al., 2013; WHO, 2016b). Essas lesões tendem à cicatrização espontânea e normalmente o período de cura é de alguns meses, mesmo sem a realização de tratamento medicamentoso (CARVALHO et al., 2006; REITHINGER et al., 2007; WHO, 2016b). No Novo Mundo, a LCL é provocada por parasitos pertencentes tanto ao subgênero *Leishmania* como *Viannia*. No Brasil, ela é causada principalmente pela espécie *L. (V.) braziliensis*. (BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012; SANTOS et al., 2012).

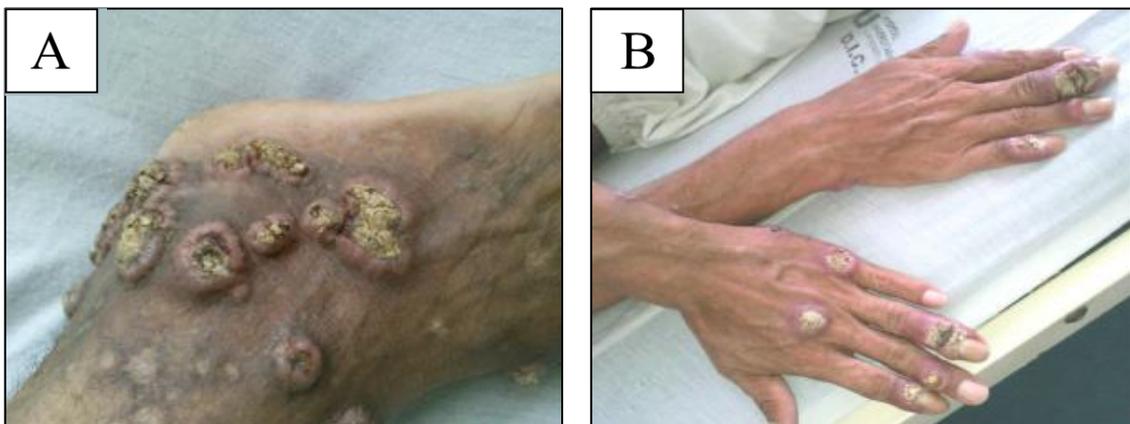
Figura 2 – Leishmaniose cutânea localizada



Fonte: MAURER; DONDJI; STEBUT, 2009. Leishmaniose cutânea localizada, com lesão característica, apresentando bordas elevadas e centro avermelhado e granuloso.

A forma disseminada da leishmaniose é caracterizada por múltiplas lesões em diversas áreas do corpo (Figura 3). Como provavelmente há disseminação hematológica ou linfática do parasito, normalmente são encontradas lesões em locais distantes de onde ocorreram as picadas pelo inseto vetor (BRASIL, 2007; REITHINGER et al., 2007). Podem ser ulceradas, papulosas, nodulares e acneiformes, e normalmente possuem boa resposta clínica à terapia medicamentosa. As espécies envolvidas na LCDS são a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, e *L. (L) amazonensis*, sendo a primeira a mais comumente associada a esta forma clínica (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012).

Figura 3 – Leishmaniose cutânea disseminada



Fonte: RODRIGUES, Y. K. S., 2012. Leishmaniose cutânea disseminada, onde o mesmo paciente apresentou várias lesões ulceradas com bordas elevadas e crostas, nos membros inferiores (A) e superiores (B).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma manifestação mais rara e grave da LTA. É caracterizada por numerosas lesões cutâneas não ulcerosas, nódulos e placas densamente infiltradas com parasitos, que podem disseminar do sítio de infecção para todo o corpo por via hematogênica ou linfática (Figura 4) (REITHINGER et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008). Indivíduos imunocomprometidos estão mais propensos a desenvolver esse tipo de leishmaniose. A principal espécie de *Leishmania* relacionada à LCD na América do Sul é a *L. (L.) amazonensis* (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012).

Figura 4 – Leishmaniose cutânea difusa



Fonte: COSTA et al., 2009. Leishmaniose cutânea difusa, com múltiplas lesões do tipo placas infiltrativas e nodulares nos membros inferiores.

A forma mucocutânea comumente tem início como uma inflamação da mucosa nasal, com evidente obstrução da região, progredindo para perfuração de septo e destruição da cartilagem nasal. Pode haver acometimento secundário de lábios, palato mole, faringe, laringe e bochechas, causando desfiguração dessas áreas (Figura 5) (DAVID; CRAFT, 2009). A principal característica da LMC é o dano às mucosas e cartilagens. Essa forma clínica comumente não responde bem aos tratamentos disponíveis, possuindo alto índice de recidivas. O agente etiológico mais associado a esta forma clínica é a *L. (V.) braziliensis* e, em alguns casos, a espécie *L. (V.) guananensis* (GOTO; LINDOSO, 2012; DASSONI et al., 2013).

Figura 5 – Leishmaniose mucocutânea



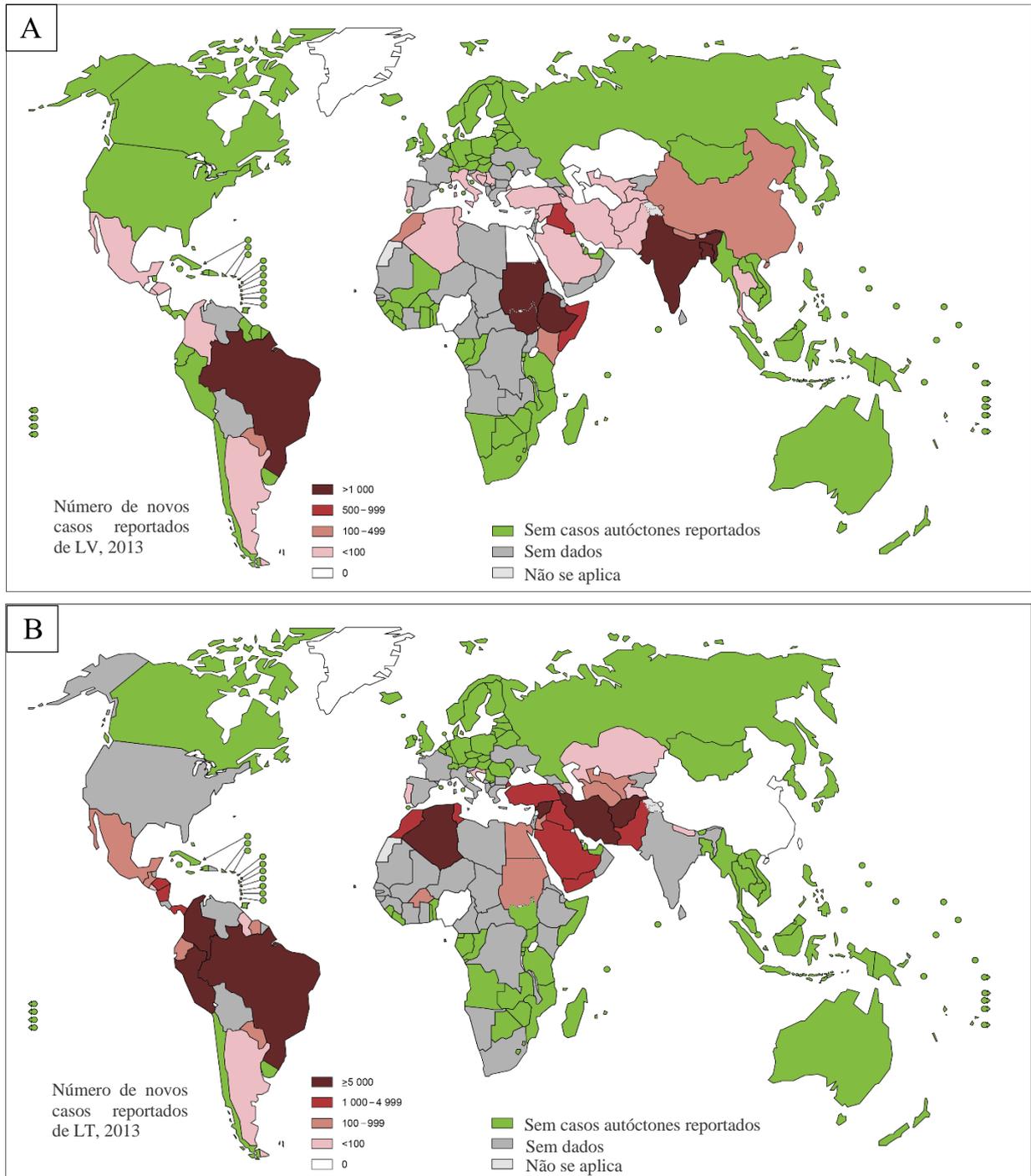
Fonte: DAULATABAD et al., 2015. Paciente com leishmaniose mucocutânea, com acometimento da região labial e nasal por lesões inflamatórias, causando ulcerações e desfiguração da face.

1.2 Epidemiologia das leishmanioses

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2016c), 98 países e três territórios são considerados regiões com potencial risco de transmissão de leishmanioses atualmente. Em média, são registrados oficialmente 220.000 casos de leishmaniose tegumentar e 58.000 casos de leishmaniose visceral por ano e mais de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas com risco de infecção (WHO, 2016c). Apesar da leishmaniose tegumentar ser a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral pode ser mais grave e fatal, caso não seja tratada. Mesmo quando há acesso ao tratamento medicamentoso, calcula-se que cerca de 10 a 20% dos casos de leishmaniose visceral resultem em óbitos (ALVAR et al., 2012).

A OMS relata que 90% dos casos globais de leishmaniose visceral nos últimos anos ocorreram em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. E dos casos de leishmaniose tegumentar mais de 70% estiveram concentrados em dez países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria. O Brasil é considerado endêmico tanto para leishmaniose visceral quanto para leishmaniose tegumentar (WHO, 2016d), com um elevado número de casos de ambas as formas da doença, conforme ilustrado na Figura 6 (A e B).

Figura 6 – Regiões endêmicas de leishmaniose visceral e tegumentar, 2013



Fonte: Adaptado de: WHO, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf>. Acesso em: 24/12/2016. O mapa representa os números de novos casos de leishmaniose visceral e tegumentar reportados em 2013. O Brasil apresentou mais de 1000 novos casos de LV e mais de 5000 novos casos de LT, sendo considerado endêmico para ambas as formas da doença.

Embora as leishmanioses estejam entre as nove doenças infecciosas mais amplamente distribuídas em todo o mundo, ainda há uma enorme dificuldade na obtenção de dados

epidemiológicos. Assim como outras doenças tropicais negligenciadas, as leishmanioses não são de notificação compulsória em todos os países em que ocorrem e muitos deles não realizam vigilância ou outras investigações, além de não possuírem um sistema de armazenamento de dados. A subnotificação preocupa as autoridades de saúde, pois são necessários dados que reflitam de maneira mais fidedigna a realidade acerca da doença para que medidas de controle mais efetivas possam ser tomadas (WHO, 2016c).

No Brasil, as leishmanioses fazem parte das doenças de notificação compulsória, registradas em todos os estados no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), por intermédio do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) (BRASIL, 2007). Os dados apontam que o Brasil concentra cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral que ocorrem na América Latina (BARBOSA; COSTA, 2013). Em 2014 foram registrados 3.453 casos de leishmaniose visceral no país, representando um coeficiente de incidência de 1,7 casos/100 mil habitantes. A faixa etária mais acometida pela doença foi de crianças de 0 a 9 anos (43,6% do total de casos) e 64,9% do total de casos ocorreu em pacientes do gênero masculino. O total de óbitos registrados em 2014 foi de 239 casos (6,9% de letalidade), representando um aumento de 102% em relação ao ano de 1994, onde a taxa de letalidade era 3,4% (BRASIL, 2014a).

A leishmaniose tegumentar é a mais frequente dentre as leishmanioses ocorrentes no Brasil e a forma cutânea é a mais comumente encontrada, sendo responsável por mais de 90% dos casos de LT (BRASIL, 2014b). O Brasil é o terceiro país com o maior número de casos novos da doença, o que corresponde a aproximadamente 10% dos casos de registrados no mundo, sendo superado apenas por Síria e Afeganistão (WHO, 2016c). Segundo a OMS (2016c), no período de 2012 a 2014, 40% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorridos nas Américas foram notificados no Brasil e há registros da doença em todos as unidades federativas do país. Entre os anos 2007 e 2014, 996 óbitos ocorreram no país devido à LT (BRASIL, 2014b).

Nas duas últimas décadas, observava-se que as leishmanioses acometiam indivíduos com condições socioeconômicas reduzidas, residentes em áreas rurais ou semiáridas do nordeste (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). Com o passar dos anos, observou-se uma expansão da doença, e os casos passaram a ser notificados com mais frequência também nas regiões norte, centro-oeste e sudeste do Brasil, principalmente em municípios com crescente urbanização e alto índice de pobreza (MARCONDES; ROSSI, 2013). Dentre os fatores que

podem ter contribuído para essa expansão estão a exploração desordenada da floresta, extração de madeira, agricultura, pecuária e o processo migratório (BRASIL, 2007).

Os dados mais recentes do Ministério da Saúde mostram que no ano 2015 a região nordeste foi a que apresentou maior número de casos de leishmaniose visceral (1.806 casos), seguida da região sudeste (538 casos), norte (469 casos), centro-oeste (157 casos) e sul (apenas um caso). Com relação à leishmaniose tegumentar, a região norte foi a que apresentou o maior número de casos (8939), seguida da região nordeste (5.152 casos), centro-oeste (2.937 casos), sudeste (1.762 casos) e sul (493 casos) (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014b).

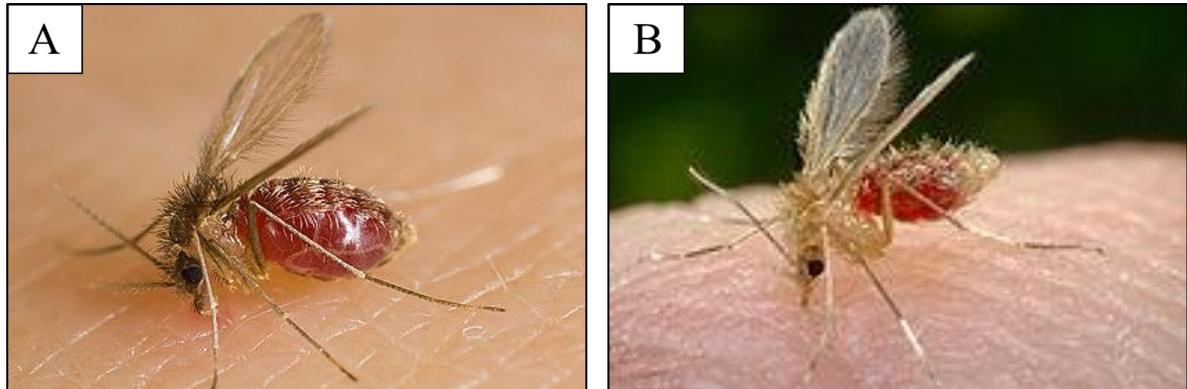
O estado da Paraíba registrou um total de 47 casos de leishmaniose visceral e 86 casos de leishmaniose tegumentar no ano de 2015. A forma cutânea foi responsável pela maioria dos casos, sendo notificados apenas quatro casos da forma mucosa em todo o estado. Tanto a leishmaniose visceral quanto a tegumentar, acometeram mais o gênero masculino (25 e 52 casos, respectivamente). Com relação à faixa etária, observa-se que pacientes entre 20 e 39 anos foram mais acometidos por ambas as formas da doença (14 de LV e 28 casos de LT). Os municípios que apresentaram maiores índices de casos de leishmaniose visceral e tegumentar na Paraíba foram Alagoa Nova, Areia, Alagoa Grande, Pilões e Alagoinha (BRASIL, 2015).

1.3 Ciclo biológico de *Leishmania* sp. e o processo de metaciclogênese

Os protozoários *Leishmania* estão inclusos no Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae. O gênero é dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Sabe-se que cerca de 22 espécies de *Leishmania* são patogênicas ao homem. Esses parasitos possuem um ciclo de vida heteroxênico, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado (LAISON; SHAW, 1987; FRAGA et al., 2010).

Os hospedeiros invertebrados são dípteros da família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae*. As fêmeas desses insetos servem como vetores da leishmaniose para os hospedeiros vertebrados, sendo as espécies pertencentes ao gênero *Lutzomia* mais prevalentes no Novo Mundo e as do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Figura 7) (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSEL, 1999; KAMHAWI, 2006).

Figura 7 - Insetos vetores das diferentes espécies do gênero *Leishmania*

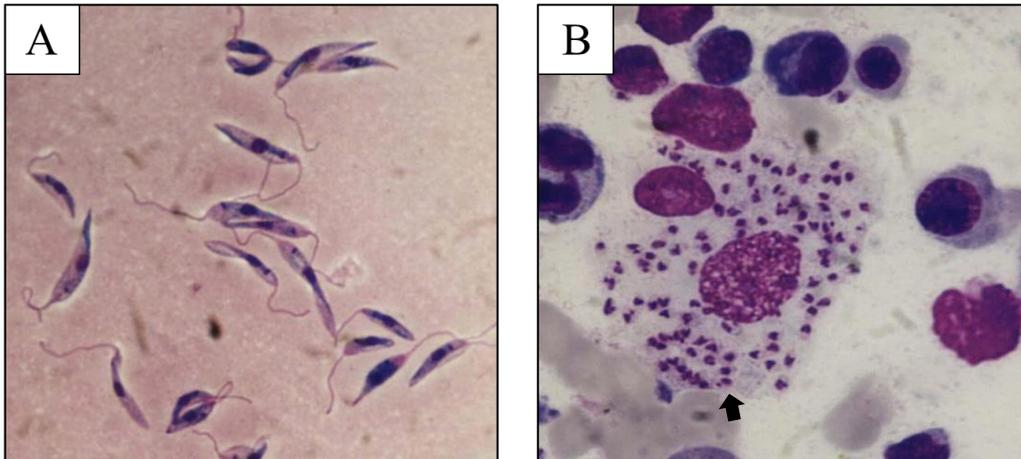


Fonte: Vector base. Disponível em: <www.vectorbase.org>. Acesso em: 24/12/2016. (A) *Lutzomyia longipalpis*. (B) *Phlebotomus papatasi*.

A transmissão ocorre quando o flebótomo infectado realiza o repasto sanguíneo, se alimentando do sangue do vertebrado. Nesse momento, o inseto regurgita promastigotas infectantes da *Leishmania*, que são formas alongadas e flageladas do parasito (Figura 8A) (VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002; ANDRADE et al., 2007). As promastigotas são primeiramente fagocitadas por neutrófilos presentes na derme do hospedeiro e, mais tardiamente, por macrófagos (PETERS et al., 2008).

No interior dos macrófagos, as promastigotas transformam-se em amastigotas, que são formas intracelulares arredondadas, imóveis, com flagelo rudimentar não exteriorizado (Figura 8B). As amastigotas reproduzem-se por divisão binária no interior de células do sistema monocítico fagocitário, especialmente em macrófagos, onde encontram condições favoráveis para sua multiplicação no ambiente ácido dos fagolisossomos (BUCHMORE; BARRETT, 2001; VAN ZANDBERGEN et al., 2004; CHARMOY et al., 2010).

Figura 8 – Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero *Leishmania*



Fonte: Laboratório de Leishmanioses – DBM/UFPB. Coloração hematológica panótico rápido. Aumento: 1000x. (A) Formas promastigotas de *Leishmania*. (B) Macrófago infectado com formas amastigotas de *Leishmania* (seta).

Para sobreviverem ao ambiente intracelular, estes parasitos desenvolvem estratégias sofisticadas que suprimem a atividade antimicrobiana dos macrófagos e conseguem driblar a atividade do sistema imunológico do hospedeiro. Os protozoários de *Leishmania* sp. inibem a apresentação antigênica, alteram a expressão de moléculas co-estimulatórias e outras moléculas envolvidas na sinalização dos mecanismos de defesa dos macrófagos e também modulam algumas vias metabólicas na célula hospedeira (LEMAIRE et al., 2013). Além disso, para garantir que as formas promastigotas consigam se diferenciar em amastigotas, os parasitos também inibem a ativação da apoptose nos macrófagos, alterando o padrão de expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas (FILARDY et al., 2014).

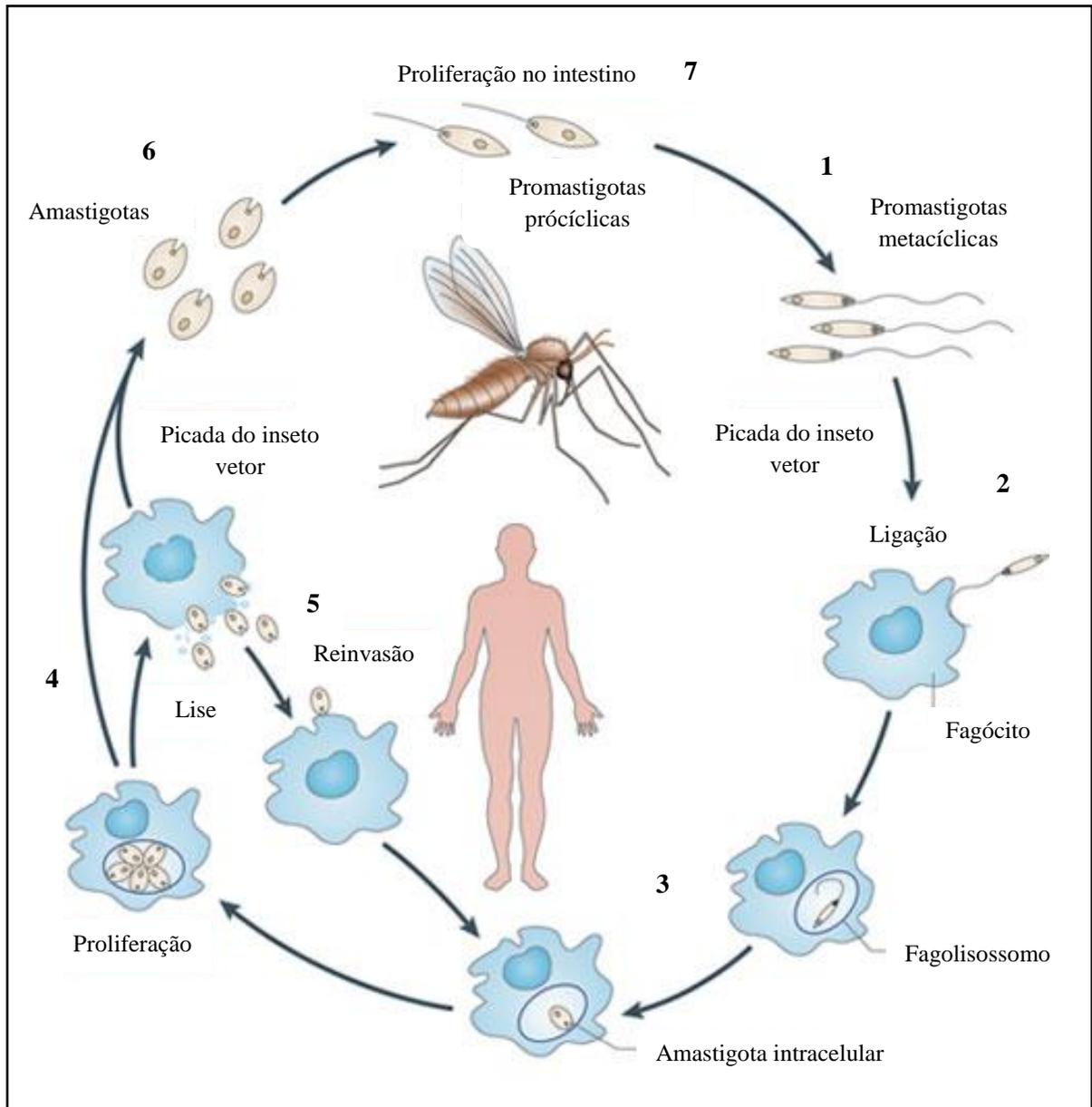
À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando no interior dos macrófagos, elas promovem a lise das células hospedeiras, então são liberadas e podem ser fagocitadas por outros macrófagos, desencadeando uma reação inflamatória (ANDRADE et al., 2007). Quando o inseto vetor se alimenta do sangue do vertebrado infectado, ele ingere também formas amastigotas que estão presentes no local. Estas, ao chegarem-no intestino médio ou estômago do vetor, sofrem um primeiro ciclo replicativo, transformando-se em formas extracelulares flageladas denominadas promastigotas procíclicas (KAMHAWI, 2006; BATES, 2008).

Através de sucessivas divisões binárias, as promastigotas procíclicas multiplicam-se ainda no sangue ingerido, que é envolto por uma membrana peritrófica, secretada pelas células

do estômago do inseto (NIEVES; PIMENTA, 2000). Após a digestão do sangue, entre o terceiro e o quarto dia, a membrana peritrófica se rompe e as formas promastigotas ficam livres, sendo então denominadas de promastigotas nectomônadas. Estas podem seguir por dois caminhos, dependendo da espécie do parasito (KAMHAWI, 2006; BATES, 2008).

As promastigotas pertencentes ao subgênero *Viannia* colonizam a região do piloro e ílio do inseto, onde são chamadas de promastigotas leptomônadas, e permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal. Nessa fase, os parasitos sofrem sucessivas divisões celulares até atingirem a fase metacíclica, quando deixam o intestino e migram em direção à faringe do inseto. Já as promastigotas leptomônadas pertencentes ao subgênero *Leishmania* multiplicam-se livres ou aderidas às paredes do estômago do inseto. Em seguida, ocorre a migração das formas flageladas para a região do esôfago e a faringe e então diferenciam-se em formas metacíclicas, da mesma maneira que os parasitos do subgênero *Viannia*. O tempo necessário para completar esse processo dura em média cinco dias, dependendo da espécie, e geralmente coincide com o período de um novo repasto do vetor, aumentando a probabilidade de inóculo em um novo hospedeiro vertebrado (NIEVES; PIMENTA, 2000; KAMHAWI, 2006; BATES, 2008). O ciclo de vida de *Leishmania* sp. está ilustrado na figura 9.

Figura 9 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

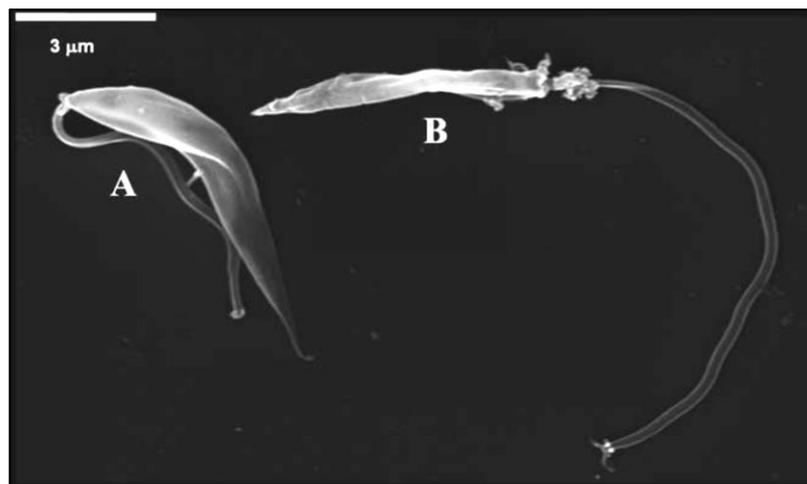


Fonte: Adaptado de: KAYE; SCOTT, 2011. (1) Parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidas para o hospedeiro vertebrado através da picada do inseto vetor infectado, no qual injeta formas promastigotas metacíclicas ou infectantes. (2) Estas são reconhecidas e fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos. (3) No interior do fagolisossomo, ocorre a transformação das formas promastigotas em formas amastigotas. (4) Em seguida os parasitas replicam-se até que ocorra lise da célula hospedeira. (5) As amastigotas liberadas no momento da lise celular podem infectar outras células (reinvasão). (6) O flebotomíneo sadio, ao se alimentar do sangue deste hospedeiro vertebrado infectado, suga as formas amastigotas que se transformam em formas promastigotas procíclicas no seu intestino. (7) Estas passam por um processo denominado metaciclogênese, originando as promastigotas metacíclicas, que podem ser transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado.

A transformação de formas promastigotas procíclicas em metacíclicas no interior do inseto vetor é denominada metaciclogênese. Durante esta etapa ocorrem alterações na expressão gênica dos parasitos, que os tornam mais infectivos e com maior mobilidade. Este processo pode ser mimetizado *in vitro*, por crescimento de promastigotas de *Leishmania* sp. em meio de cultura (SACKS et al., 1989; SACKS; SHER, 2002). A cultura em fase logarítmica de crescimento apresenta formas promastigotas procíclicas. Com o passar dos dias de cultivo, o meio torna-se mais ácido e com menos nutrientes disponíveis, ocasionando a transformação das formas procíclicas em metacíclicas. Desta forma, a cultura em fase estacionária de crescimento possui, majoritariamente, promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp. (BATES; TETLEY, 1993).

As formas procíclicas possuem corpo celular largo e arredondado e um flagelo pequeno (Figura 10A), enquanto que as metacíclicas apresentam corpo celular mais fino e um flagelo com aproximadamente o dobro do tamanho do seu corpo celular (Figura 10B) (SOARES et al., 2005). O corpo mais fino e o flagelo bem desenvolvido fazem com que o parasito tenha uma maior capacidade de locomoção e assim consiga sobreviver durante o processo de infecção no hospedeiro vertebrado (DA SILVA et al., 2015).

Figura 10 – Forma promastigota procíclica e metacíclica de *Leishmania braziliensis*



Fonte: SOARES et al., 2005. Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura. (A) Forma promastigota procíclica e (B) metacíclica de *Leishmania braziliensis*. É possível observar o flagelo maior e o corpo celular mais fino da forma promastigota metacíclica em comparação com a forma procíclica.

A metaciclo-gênese também leva a modificações morfológicas e bioquímicas das moléculas de lipofosfoglicano (LPG) presentes na superfície das promastigotas. Tem sido demonstrado que este componente está envolvido em diversos processos essenciais para a sobrevivência do parasito (CLARKSON, 2003). Há aproximadamente 5×10^6 moléculas de LPG por célula de *Leishmania* sp., e a sequência de resíduos de açúcares do LPG é específica de cada espécie. As promastigotas ligam-se às lectinas presentes no epitélio intestinal posterior do inseto vetor através das moléculas de LPG, de modo que este componente é essencial para que o parasito se mantenha no hospedeiro invertebrado (SACKS et al., 2000). Após a metaciclo-gênese, as moléculas de LPG se tornam mais longas e complexas, fazendo com que as promastigotas se dissociem da parede intestinal do inseto e migrem em direção à porção anterior do trato digestivo para serem inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do inseto (SARAIVA et al., 1995; SACKS, 2001).

Alterações no LPG conferem maior poder de infecção para as formas promastigotas, pois o alongamento dessas moléculas cria uma barreira na superfície dos parasitos e os tornam mais resistentes à ação do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado através de diferentes mecanismos (PUENTES et al., 1990; CLARKSON, 2003). Outro fato importante que acontece durante a metaciclo-gênese é a produção do gel secretório de promastigotas (PSG), o qual envolve os parasitos metacíclicos e bloqueia o intestino do inseto, fazendo com que este regurgite as formas promastigotas imediatamente antes de realizar o repasto sanguíneo. O PSG também possui propriedades quimiotáticas e moduladoras do sistema imune do hospedeiro mamífero (BIFELD; CLOS, 2015).

Diversos tipos de proteínas são mais expressas durante a metaciclo-gênese, como as serino, cisteino e metaloproteinases, que atuam como fatores de virulência em *Leishmania* sp. (NORONHA et al., 1998; SILVA-ALMEIDA et al., 2012). A glicoproteína KMP-11 (*kinetoplastid membrane protein-11*), embora seja encontrada em ambos os estágios de vida de *Leishmania* sp., é mais abundante durante a fase metacíclica e nas formas amastigotas. A KMP-11 atua como fator de virulência, alterando a expressão de citocinas nos macrófagos e também por outros mecanismos que levam à proteção do parasito contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (MATOS et al., 2010). A glicoproteína gp63 é outra molécula encontrada em grande quantidade nas formas metacíclicas e é bastante estudada quanto ao seu papel na proteção à lise mediada pelo sistema complemento (OLIVIER et al., 2012). Ela também contribui para facilitar a internalização dos parasitos nos macrófagos e mantê-los viáveis após a fagocitose (BRITTINGHAM et al., 2001).

1.4 O papel do sistema complemento nas infecções por *Leishmania* sp.

O sistema complemento é composto por mais de 30 proteínas, que estão presentes na forma solúvel no sangue ou associadas às membranas plasmáticas. Essas proteínas fazem parte da imunidade inata, sendo responsáveis pelo rápido ataque inicial contra patógenos. Também tem sido demonstrado que o sistema complemento possui relevante função na imunidade adaptativa, auxiliando células T e B na eliminação de micro-organismos (MOLINA et al. 1996; DUNKELBERGER; SONG, 2010) O conjunto de proteínas do sistema complemento é ativado através de três formas principais denominadas via alternativa, via clássica e via das lectinas (MERLE et al., 2015).

A via alternativa é ativada por carboidratos, lipídeos e proteínas presentes na superfície de micro-organismos. O componente C3 do sistema complemento é hidrolisado espontaneamente, a um baixo nível basal, produzindo o análogo C3b, o qual se liga à superfície do patógeno. O Fator B é então recrutado e se liga ao C3b. Em seguida, o Fator D cliva o Fator B e forma a C3 convertase da via alternativa (C3bBb), que é estabilizada pela presença de properdina. Essa enzima então cliva novas moléculas de C3 em C3a e C3b (DUNKELBERGER; SONG, 2010). O C3b gerado liga-se às superfícies dos patógenos, formando novas C3 convertases que amplificam a via alternativa. O C3b também pode se associar às C3 convertases, produzindo a C5 convertase. Essa enzima hidrolisa C5 em C5a e C5b, sendo este capaz de se ligar a moléculas de C6. O complexo C5bC6 se associa ao C7 e se insere na membrana do micro-organismo. Em seguida, moléculas de C8 e C9 ligam-se e levam à formação de poros na membrana plasmática do agente invasor, fazendo com que ocorra a lise celular (KEMPER; ATKINSON; HOURCADE, 2010).

A via clássica necessita da presença de anticorpos para que seja ativada. O componente C1 é formado por uma subunidade C1q, duas moléculas de C1r e outras duas de C1s. O complexo C1 se liga à região Fc das imunoglobulinas presentes na superfície dos patógenos e então é convertido a sua forma ativa. O C1 ativado cliva os componentes C4 e C2, gerando fragmentos C4a, C4b, C2a e C2b. O C4b se adere à superfície da membrana e ao C2a, formando C4bC2a, que é a C3 convertase da via clássica. Da mesma forma que acontece na via alternativa, os fragmentos C3b produzidos pela C3 convertase se associam à enzima e formam a C5 convertase que dará continuidade à via, resultando no complexo de ataque à membrana (MAC) e lise do micro-organismo (SJÖBERG; TROUW; BLOM, 2009; BOTTAZZI et al., 2010).

Já a via das lectinas é independente de imunoglobulinas e tem sua ativação através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Uma das moléculas mais bem estudadas é a MBL (*Mannose binding lectin*), que inicia a via por reconhecimento de carboidratos na superfície de patógenos como leveduras, bactérias, protozoários e vírus. A MBL circula no soro associada a proteínas denominadas MASPs (*Mannose associated serine proteases*). A ligação aos patógenos ativa uma das MASPs (MASP 2), a qual cliva C4 em C4a e C4b. C4b se liga a superfície do agente invasor e induz a ligação de C2, o qual é então clivado a C2a e C2b. C4b associado ao C2a formam a C3 convertase da via das lectinas, que dará continuidade à via da mesma forma que a C3 convertase da via alternativa e da via clássica (SORENSEN; THIEL; JENSENIUS, 2005; MERLE et al., 2015).

O complexo de ataque à membrana (MAC) promove a saída de material citoplasmático e entrada de líquido e sais, fazendo com que a membrana dos patógenos seja rompida por lise osmótica. Esse processo constitui um dos principais mecanismos de defesa da resposta imune inata e é um ataque inicial aos agentes invasores (MERLE et al., 2015). Os componentes C3b e C4b servem como opsoninas, que recobrem as superfícies dos micro-organismos e favorecem a fagocitose por macrófagos e neutrófilos. Já as moléculas C3a e C5a atuam como anafilatoxinas, aumentando a permeabilidade vascular e promovendo uma intensa resposta inflamatória local (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001; OHNO et al. 2000).

O sistema complemento exerce um importante papel durante a infecção por *Leishmania* sp. No momento em que o inseto vetor insere as formas promastigotas no hospedeiro mamífero, elas entram em contato com o plasma. Uma reação extremamente rápida do sistema complemento é então desencadeada, principalmente por meio da via alternativa (HOOVER et al., 1984) e da via clássica (MOSSER et al., 1986), conseguindo eliminar grande parte da população de parasitos. Acredita-se que a ação do sistema complemento na fase inicial da infecção seja um dos fatores responsáveis por determinar se a infecção será controlada ou estabelecida (LAURENTI et al., 1996).

Contudo, a eficácia do sistema complemento está diretamente relacionada com a fase de desenvolvimento dos protozoários no momento da inoculação no hospedeiro mamífero. As formas promastigotas metacíclicas passam por alterações morfológicas e bioquímicas que as tornam mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento em comparação com as formas procíclicas (LAURENTI et al., 2004). As promastigotas metacíclicas expressam

moléculas de LPG mais longas em sua superfície. As moléculas de C3b conseguem depositar-se sob as promastigotas, mas a espessa camada de LPG que as reveste ocasiona um impedimento mecânico, fazendo com que a inserção de C5b em diante seja comprometida. Deste modo, o complexo de ataque à membrana não consegue ser formado para causar a lise dos parasitos (PUENTES et al., 1990; CUNNINGHAM, 2002).

Cerca de 40 cinases são expressas em maior quantidade na superfície das promastigotas metacíclicas e são capazes de fosforilar componentes do sistema complemento, tornando-os inativos (NORONHA et al., 1998). A glicoproteína gp63 possui atividade proteolítica e consegue clivar o componente C3b em C3bi, impedindo a continuidade da cascata de ativação. A forma inativa do C3b opsoniza os parasitos e promove a internalização por macrófagos, através do reconhecimento pelos receptores CR1 e CR3, os quais não levam à ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos (MOSSER; BRITTINGHAM, 1997; CUNNINGHAM, 2002). De forma semelhante, o LPG também favorece a fagocitose sem ativação dos mecanismos de defesa dos macrófagos, interagindo com a proteína C reativa (PCR), gerada pelo processo inflamatório agudo (CULLEY et al., 1996; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

Diversos estudos comprovam que as culturas de promastigotas em fase estacionária de crescimento, que possuem majoritariamente formas metacíclicas, são mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento quando comparadas com culturas em fase logarítmica (formas procíclicas) (BANDYOPADHYAY et al., 1991; ALMEIDA et al., 1993; PINTO-DASILVA et al., 2002; Da SILVA et al., 2015). Laurenti et al. (2004) demonstraram que camundongos BALB/c com sistema complemento deficitário infectados com *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento apresentaram maior carga parasitária e menor resposta inflamatória quando comparados àqueles com o sistema complemento normal. Ainda que as formas metacíclicas sejam mais resistentes à lise pelo sistema complemento, este mecanismo de defesa reduz o número de parasitos viáveis, influenciando no curso da infecção.

1.5 Tratamento das leishmanioses e resistência aos antimoniais

Devido à ausência de vacinas disponíveis para uso clínico e a dificuldade em controlar os vetores e reservatórios para a doença, a principal ferramenta para o combate da leishmaniose

ainda é a farmacoterapia. Contudo, o arsenal terapêutico é bastante limitado e consiste nos antimoniais pentavalentes, anfotericina B (e suas formulações lipídicas), pentamidina, miltefosina e paromomicina (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). Na maioria dos países, as drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções por *Leishmania* sp. são os antimoniais pentavalentes (SbV): Estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina. Em casos de insucesso terapêutico, opta-se principalmente pelo tratamento com anfotericina B e pentaminidina, podendo ser feito uso isolado ou em associações, mas o alto custo do tratamento e os intensos efeitos colaterais limitam o uso destas drogas (GAGANDEEP; BHAWANA, 2014).

Inicialmente eram utilizados antimoniais trivalentes (tartarato de antimônio e potássio) (SbIII) para o tratamento das leishmanioses. O primeiro relato da utilização de SbIII no tratamento da doença foi descrito em 1913 por Vianna (VIANNA, 1912; HALDAR; SEM; SOY, 2011). Foram constatados intensos efeitos colaterais como tosse, dor no peito e depressão (BERMAN, 1988). Além de muito tóxicos, os antimoniais trivalentes eram instáveis em clima tropical, de modo que o tratamento com estas drogas se tornou cada vez mais inviável, conduzindo ao descobrimento dos antimoniais pentavalentes (HALDAR; SEM; SOY, 2011).

Embora já sejam utilizados há mais de seis décadas, o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não está completamente elucidado (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Acredita-se que o SbV seja um pró-fármaco, que entra no macrófago por meio de um transportador ainda desconhecido e pode agir diretamente sobre as formas amastigotas do parasito, presentes no vacúolo, ou ser reduzido à forma trivalente (SbIII) no citosol (ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007). O SbIII entra na célula através do transportador aquagliceroforina (AQPR1). A redução de SbV a SbIII pode ser catalisada pelas enzimas antimônio redutase (ACR2) e tiol redutase dependente (TDR1) ou ocorrer quimicamente pela ação de tióis. O SbIII provavelmente interage com componentes celulares ou pode ser conjugado com tióis (cisteína, glutathiona e tripanotona). (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; BRASIL, 2007).

Estudos sugerem que os antimoniais atuam inibindo processos metabólicos vitais, como a oxidação de ácidos graxos, glicólise e o metabolismo energético do parasito (BERMAN; GALLALEE; BEST, 1987; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). Também foi proposto que poderia ocorrer a inibição da enzima topoisomerase em *Leishmania*, como foi

demonstrado por Chakraborty e Majunder (1987). Além disso, acredita-se que a enzima fosfofrutoquinase, envolvida na síntese de nucleotídeos trifosfatados, pode ser inibida pelo fármaco (BERMAN; WADDELL; HANSON, 1985). Alguns testes levam a crer que outros mecanismos podem estar envolvidos na farmacodinâmica desses medicamentos, como a indução de morte celular do parasito por apoptose, além de aumento da produção de ânions superóxidos (O⁻) e TNF- α pelas células fagocíticas mononucleares, induzindo a morte do parasito (SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003; OULELLETE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004).

Os antimoniais pentavalentes são mais tolerados e considerados mais seguros que os seus percussores (SbIII), embora vários efeitos adversos sejam comumente relatados, tais como: náuseas, vômitos, dores abdominais, letargia, artralgia, convulsões, cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade (ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004; SHAHIAN; ALBORZI, 2009). A administração destes medicamentos deve ser feita por via intramuscular ou intravenosa, com infusão bastante lenta para que seja evitada a ocorrência de trombose. O paciente deve ser monitorado, realizando periodicamente eletrocardiogramas, hemogramas e dosagens séricas, pois o uso de SbV pode causar alterações cardíacas, leucopenia, anemia, trombocitopenia e elevação dos níveis das enzimas hepáticas (WHO, 2010).

Além dos efeitos negativos associados ao tratamento com os antimoniais, longos períodos de terapia e insucessos terapêuticos são também observados. O esquema de tratamento com SbV dura, em média, 20 a 30 dias, mas tem sido modificado ao longo dos anos quanto à dose e duração, visando minimizar o aparecimento de parasitos resistentes (WHO, 2010). Entretanto, casos de resistência aos SbV têm sido constatados, trazendo um novo desafio para o tratamento da doença (THAKUR et al., 2001; ASHUTOSH et al., 2005). No Novo Mundo, verificou-se que cepas de *L. (V.) braziliensis* frequentemente apresentam resistência a tratamentos de menor duração ou em doses baixas (MOREIRA; SOARES; PETRILLO-PEIXOTO, 1995; MOREIRA; ANACLETO; PETRILLO-PEIXOTO, 1998). No Velho Mundo, cepas de *L. (L.) donovani* resistentes ao Glucantime[®] são observadas, especialmente em Bihar, na Índia, onde quase 60% dos parasitos isolados mostraram-se resistentes aos antimoniais (SUNDAR et al., 2001; FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

Acredita-se que o surgimento de cepas resistentes seja influenciado pela espécie de *Leishmania* envolvida, por variações farmacocinéticas do indivíduo e variações de interação da droga com o sistema imune do hospedeiro (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Contudo,

a maior causa apontada para seleção de parasitos resistentes é o uso irracional dos medicamentos. Na Índia os antimoniais pentavalentes são livremente comercializados e podem ser adquiridos sem prescrição. Além disso, pequenas doses de SbV eram utilizadas e aumentadas gradualmente durante o tratamento. Longos intervalos entre uma dose e outra eram concedidos, pois acreditava-se que assim o dano renal seria minimizado. Tudo isso expôs os parasitos a uma pressão constante de SbV, contribuindo para o surgimento de resistência (HALDAR; SEM; SOY, 2011).

A resistência pode ser intrínseca ou adquirida, além de poder ser induzida sob condições laboratoriais (LIRA et al., 1998). Estudos demonstraram que esses parasitos sofrem consideráveis alterações genômicas, como aneuploidias cromossomais, e mudanças no padrão de expressão gênica, que parecem estar envolvidas com a adaptação desses organismos à presença da droga (LEPROHON et al., 2009; KUMAR et al., 2013). Há, por exemplo, aumento na síntese de alguns transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) capazes de promover o efluxo da substância ou armazená-la em vesículas citoplasmáticas (provavelmente acidocalcissomos) impedindo que atue em seus alvos na célula (SANTOS et al., 2009; KUMAR et al., 2013). Também pode haver diminuição da expressão de AQP1, restringindo a entrada de SbIII no parasito. A alteração da expressão de algumas enzimas do parasito pode, por exemplo, inibir a conversão de SbV para SbIII em cepas resistentes ou aumentar a conjugação e formação do complexo antimônio-tiol, resultando em menos antimônio disponível para exercer seus efeitos (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004; GAGANDEEP; BHAWANA, 2014).

1.6 Resistência aos antimoniais e virulência do parasito

A palavra “*fitness*” é utilizada para referir-se ao conjunto de fatores que garantem a um patógeno a capacidade crescer, sobreviver, reproduzir-se e transmitir doença. O termo “virulência” está, muitas vezes, associado ao *fitness*, pois refere-se ao potencial de um patógeno em causar dano no hospedeiro (KAUR; RAJPUT, 2014). Alguns estudos em procariotos e eucariotos demonstram que a resistência a drogas está normalmente relacionada a uma redução no *fitness* dos micro-organismos, pois observa-se decréscimo no crescimento, virulência e transmissibilidade entre hospedeiros (BABIKER; HASTINGS; SWEDBERG, 2009; ABDELRAOUF et al., 2011).

Entretanto, pesquisas recentes têm demonstrado que algumas espécies de *Leishmania*, principalmente *L. donovani*, resistentes a drogas parecem ter desenvolvido mutações compensatórias que permitiram ao protozoário restaurar, total ou parcialmente, as habilidades de *fitness*. Em *Leishmania* sp. essa habilidade tem sido relacionada à capacidade de gerar formas metacíclicas, que possuem maior poder de infecção no hospedeiro (OUAKAD et al., 2011; VANAERSCHOT et al., 2013). A natureza plástica do genoma desses parasitos faz com que eles sejam altamente adaptáveis, sendo capazes de modular a expressão gênica através da amplificação ou deleção de genes e alterar a ploidia cromossomal em resposta ao estresse (HENDRICKX et al., 2016a).

Vanaerschot et al. (2010) analisaram isolados clínicos de *L. donovani* sensíveis e resistentes aos antimoniais. Os autores observaram que os parasitos resistentes apresentaram menor sensibilidade ao estresse oxidativo e nitrosativo *in vitro*. O índice de infecção em macrófagos *in vitro* foi significativamente mais elevado nas cepas resistentes em comparação com as cepas sensíveis. Além disso, os parasitos resistentes foram mais infectantes *in vivo* do que os sensíveis, atingindo uma maior carga parasitária, tanto no baço quanto no fígado dos camundongos Balb/c infectados. Os autores sugerem que a maior resistência ao estresse e um maior número de formas metacíclicas podem ser fatores que contribuem para aumentar a capacidade de infecção das cepas resistentes aos antimoniais.

Em 2011, Ouakad e colaboradores demonstraram que cepas de *L. donovani* resistentes aos antimoniais apresentaram quantidade de formas metacíclicas duas vezes maior do que aquela encontrada nas culturas sensíveis ao Sb. As culturas resistentes também apresentaram maior capacidade de infecção em macrófagos murinos e foram mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento. Vanaerschot et al. (2011) também analisaram cepas de *L. donovani* resistentes e sensíveis aos antimoniais, e verificaram maior poder de infecção *in vivo*. Assim como Vanaerschot et al. (2010), os autores também observaram uma carga parasitária maior dos parasitos resistentes em baço e fígado de camundongos Balb/c do que aquela encontrada nos camundongos infectados pelas culturas sensíveis ao Sb.

Em análise morfométrica realizada por Rai et al. (2013), isolados clínicos de *L. donovani* obtidos de pacientes com leishmaniose visceral resistentes ao tratamento com miltefosina apresentaram capacidade de diferenciação em formas metacíclicas significativamente maior do que aquela observada nos isolados de pacientes com boa resposta clínica ao tratamento. Também foi observado que os isolados resistentes à miltefosina infectaram maior porcentagem

de macrófagos *in vitro* do que os isolados sensíveis ao fármaco. Gómez et al. (2014) verificaram maior capacidade de sobrevivência dos isolados clínicos de *L. panamensis* de pacientes que foram refratários ao tratamento com antimonial no interior dos macrófagos (*in vitro*) em comparação com aqueles que responderam bem ao tratamento. Moura et al. (2016) observaram que cepas de *L. infantum/chagasi* resistentes aos antimoniais foram também mais resistentes ao óxido nítrico (NO) e que provavelmente a resistência à droga induz alterações bioquímicas capazes de modular a síntese de espécies reativas de oxigênio nos macrófagos. Hendrickx et al. (2016b) mostraram que cepas de *L. donovani* resistentes à miltefosina são mais infectantes *in vitro*, com maior capacidade de multiplicação de amastigotas e maior resistência ao estresse oxidativo provocado por macrófagos.

Estudos de metabolômica e proteômica em *Leishmania* sp. confirmam os recentes achados sobre a possível correlação existente entre resistência a drogas e virulência (VANAERSCHOT et al., 2013). Essas análises correspondem a uma representação mais próxima do fenótipo celular, já que analisa os produtos finais da expressão gênica e atividade enzimática. Esses estudos são de importante relevância, principalmente nos tripanossomatídeos, onde a expressão gênica é regulada principalmente a nível pós-transcricional (BERG et al., 2013).

Cepas de *L. donovani* resistentes aos antimoniais apresentaram alterações no metaboloma que estão associadas a uma maior fluidez da membrana, conferindo uma possível resistência ao estresse oxidativo dos macrófagos. Elas possuem biossíntese de fosfolipídeos aumentada, de modo que podem interferir em sua virulência e também aumentar a proteção contra o estresse oxidativo. Também é observada uma maior quantidade de alguns aminoácidos, que podem servir como fonte alternativa de energia para sobrevivência no interior das células fagocíticas, onde os nutrientes são escassos, e assim aumentar a sobrevivência do parasito. Os níveis de purina também são aumentados, servindo como um “kit de sobrevivência” com os fatores necessários para a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas no estágio inicial da infecção (BERG et al., 2013).

Matrangolo et al. (2013) verificaram que cepas de *L. braziliensis* e *L. infantum/chagasi* resistentes aos antimoniais expressam maiores níveis de proteínas antioxidantes, protegendo-as contra o estresse oxidativo gerado pelos macrófagos. Entretanto, não foi possível determinar se as mudanças observadas nas cepas resistentes se deram devido à resistência à droga em si ou se estavam relacionadas com os maiores níveis de promastigotas metacíclicas observados nessas

culturas. Resultados semelhantes foram encontrados por Carnielli et al. (2014) ao analisar cepas de *L. infantum/chagasi* resistentes à miltefosina, onde os parasitos resistentes apresentaram maior expressão de proteínas envolvidas na proteção ao estresse oxidativo e aumento da produção de IL-10 nos macrófagos.

O efeito da resistência nos parâmetros de *fitness* em parasitos do gênero *Leishmania* parece estar relacionado com o tipo de droga e espécie envolvida, uma vez que alguns estudos não observam essa correlação. Hendrickx et al. (2015) não observaram diferenças significativas entre cepas de *L. donovani* sensíveis e resistentes à paromomicina na infecção *in vitro* e *in vivo*. Turner et al. (2015) observou que cepas de *L. major* resistentes à miltefosina apresentaram duas vezes mais promastigotas metacíclicas que as cepas sensíveis, mas exibiram virulência atenuada *in vitro* e *in vivo*. Hendrickx et al. (2016b) mostraram que cepas de *L. donovani* resistentes à miltefosina apresentaram menor potencial replicativo, menor índice de metaciclogênese e menor tolerância ao estresse oxidativo quando comparadas àquelas sensíveis ao fármaco.

O impacto da resistência a drogas no *fitness* dos parasitos precisa ser melhor elucidado nas espécies de *Leishmania* com relação às diferentes drogas disponíveis no mercado para o tratamento da leishmaniose (CARNIELLI et al., 2014). Segundo Hendrickx et al. (2016a), o principal desafio dos estudos comparando cepas resistentes com sensíveis às drogas e relacionando-as com parâmetros de virulência é que essas pesquisas normalmente são realizadas comparando parasitos com diferentes *backgrounds* genéticos. Como os protozoários do gênero *Leishmania* possuem uma plasticidade genômica bastante grande, as diferenças genéticas e fenotípicas podem influenciar no comportamento do parasito. Selecionar cepas resistentes a partir de cepas sensíveis (selvagens) e realizar estudos comparativos entre os respectivos pares faz com que essa variável seja minimizada pois os parasitos terão o mesmo *background* genético.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se existe correlação entre os parâmetros de resistência ao antimônio trivalente (SbIII) e virulência a partir de isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar formas promastigotas resistentes ao SbIII a partir de isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*;
- Avaliar a estabilidade do fenótipo de resistência ao SbIII adquirido pelos isolados clínicos;
- Observar o perfil de crescimento das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII em meio de cultura;
- Analisar, qualitativamente, a morfologia das culturas de promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII;
- Investigar se a resistência ao SbIII interfere na susceptibilidade dos parasitos à lise pelo complemento;
- Verificar se a resistência ao SbIII leva à alteração na virulência *in vitro* dos parasitos sobre macrófagos murinos;
- Observar se a resistência ao SbIII interfere na virulência *in vivo* de *Leishmania braziliensis* em camundongos suíços.

Materials e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasitos

Neste trabalho foram utilizadas formas promastigotas de dois isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (RODRIGUES, 2012) a partir de pacientes com quadro de leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley da UFPB, localizado em João Pessoa, Paraíba. Os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram: MHOM/BR/2010/JCTS e MHOM/BR/2011/AF, obtidos de indivíduos do gênero masculino, residentes no município de Pilões-PB. O Quadro 1 descreve a forma clínica de leishmaniose e a característica das lesões encontradas nesses pacientes.

Quadro 1: Forma clínica e características das lesões dos pacientes com leishmaniose envolvidos no estudo

Parasitos	Característica da lesão	Forma clínica
MHOM/BR/2010/JCTS	Lesão única localizada no Membro inferior esquerdo; ulcerada; prurido; Relato de dor no local.	LCL
MHOM/BR/2011/AF	Cerca de 49 lesões distribuídas entre cabeça, membro superior e membro inferior. Lesões ulceradas de tamanhos variados, com bordas elevadas e crostas na superfície com processo inflamatório; prurido. Relatava ausência de dor.	LCDS

Fonte: RODRIGUES, Y. K. S., 2012.

LCL = Leishmaniose cutânea localizada; LCDS = Leishmaniose cutânea disseminada.

3.2 Manutenção das culturas

Os isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* foram cultivados *in vitro* em erlenmeyers contendo meio líquido Schneider (Cutilab, Brasil) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), antibióticos - estreptomicina (100 μ g/mL) e penicilina (100 U.I./mL) - e 3% de urina masculina estéril. As culturas foram incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e repicadas semanalmente, a fim de manter a viabilidade celular.

Sempre que necessário, células no início da fase estacionária de crescimento foram criopreservadas. Para isso, foi adicionado lentamente 10% de glicerol estéril sob agitação constante nas culturas de promastigotas em meio Schneider completo. Após 15 minutos de agitação, alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos apropriados para criopreservação. Esses tubos foram mantidos em freezer a -80°C e em nitrogênio líquido.

3.3 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração de antimônio trivalente que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC₅₀)

Os isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* foram avaliados quanto à sensibilidade inicial ao antimônio trivalente (SbIII). A determinação da inibição do crescimento de formas promastigotas dos isolados clínicos de *L. braziliensis* foi realizada utilizando tubos de ensaio rosqueados contendo meio líquido Schneider completo, como feito anteriormente por Amorim et al. (2013). Nos tubos de ensaio foram adicionados 1×10^6 promastigotas/mL de cada isolado clínico na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de antimônio trivalente.

Após 72h de incubação a 25°C , alíquotas das culturas foram retiradas, diluídas em solução de Isoton (ácido cítrico 0,05M, cloreto de sódio 0,12M, formaldeído 0,5% p/v, pH 7,2). na proporção adequada para quantificação em eppendorfs, os quais foram homogeneizados em agitador Vortex por aproximadamente trinta segundos. As células foram quantificadas e analisadas através de microscopia óptica comum diretamente em câmera de Neubauer. A contagem do número de parasitos/mL de cultura foi realizada utilizando a fórmula: N° de parasitos = média dos quatro quadrantes x inverso da diluição da amostra x 10^4 .

3.4 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente (SbIII)

A seleção dos parasitos resistentes foi realizada de acordo com o proposto por Liarte e Murta (2010). Inicialmente, os parasitos foram expostos às concentrações de SbIII correspondentes à IC₅₀ (concentração inibitória de 50% do crescimento) de cada isolado clínico. Quando as culturas expostas ao fármaco alcançavam uma taxa de crescimento semelhante às culturas do tipo selvagem (sensíveis ao SbIII), aumentos graduais na concentração da droga eram realizados. Esse procedimento foi repetido até que as culturas selecionadas conseguissem crescer na presença de SbIII em concentração correspondente a 10 vezes a IC₅₀ inicial.

Paralelamente, as culturas selvagens (sensíveis) eram repicadas em meio de cultura sem SbIII, a fim de garantir que as culturas sensíveis e resistentes fossem mantidas com igual número de repiques *in vitro*.

3.5 Análise da estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio trivalente adquirido pelos isolados clínicos de *L. braziliensis*

Após indução de resistência ao SbIII em isolados clínicos de *L. braziliensis*, essas culturas foram cultivadas em meio Schneider suplementado na ausência de SbIII até o 40º repique sem a droga. Após o 2º, 10º, 20º, 35º e 40º repique sem a droga, a IC₅₀ dessas culturas frente ao antimônio trivalente foi determinada, conforme metodologia descrita no item 3.3, a fim de monitorar a estabilidade dessa resistência (FRADE, 2016).

3.6 Curva de crescimento de isolados clínicos de *L. braziliensis* sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente

A curva de crescimento foi realizada a fim de avaliar a cinética de crescimento dos isolados clínicos sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente e assim poder estabelecer as fases logarítmicas (formas promastigotas procíclicas) e estacionária (formas promastigotas metacíclicas) da cultura, bem como verificar se há diferenças no perfil de crescimento das

culturas sensíveis em relação às culturas resistentes. Foram feitos repiques das formas promastigotas dos isolados clínicos em tubos de ensaio rosqueados contendo meio Schneider suplementado. Esses repiques foram feitos em duplicata e partindo de uma concentração de 1×10^6 células/mL. Os repiques foram realizados a partir de culturas novas, isto é, com três ou quatro dias de crescimento. Posteriormente, a cada vinte e quatro horas, as culturas foram quantificadas utilizando a câmara de Neubauer sob microscopia óptica comum. Este procedimento foi realizado até o momento em que as culturas alcançaram a fase estacionária de crescimento.

3.7 Análise da morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII

Para o estudo da morfologia dos parasitos, as formas promastigotas dos isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis*, sensíveis e resistentes ao SbIII, foram cultivadas em meio de cultura até a fase estacionária de crescimento. Em seguida, foram realizados esfregaços em lâminas e posterior coloração com kit Panótico rápido (Centerkit, Brasil). As células foram examinadas e fotografadas em microscopia óptica comum sob aumento 1000x.

3.8 Teste de lise pelo sistema complemento

3.8.1 Obtenção de soro a partir de sangue humano

Para os ensaios de lise mediada pelo sistema complemento, foram coletadas amostras de sangue humano (cerca de 10mL) por punção venosa de voluntários adultos saudáveis, sendo utilizado material estéril adquirido comercialmente (agulhas e seringas BD Pastipak, Brasil) e colhidos em tubos a vácuo (Greiner Bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil).

Para obtenção do soro, após a coleta, o sangue foi mantido à temperatura ambiente por uma hora, para retração do coágulo. Posteriormente, foi feita a separação do soro utilizando

centrífuga por 5 minutos a 111 x g (1000 rpm [Centrífuga Parsec CT0603]). Em seguida o sobrenadante foi transferido para um microtubo estéril e seco para ser utilizado.

O estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPB, sendo aprovado com parecer número 1.789.831, CAAE: 58591416.5.0000.5188.

3.8.2 Sensibilidade à lise mediada pelo sistema complemento

Formas promastigotas dos isolados clínicos sensíveis e resistentes ao SbIII foram avaliadas quanto à sua resistência à lise mediada pelo sistema complemento, conforme descrito por Gamboa et al. (2008), com modificações. Inicialmente as culturas foram centrifugadas 10 minutos 447 x g (2000 rpm [Centrífuga Parsec CT0603]) lavadas com PBS (Solução salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,4) e as formas promastigotas foram ajustadas a uma concentração de 2×10^6 células/mL.

Em seguida foi adicionado 100µL da cultura em placas de cultivo celular com 96 poços, onde foram feitas diluições em série de soro humano a partir de 1:1 a 1:64 em 100µL de meio Schneider suplementado, sendo o experimento realizado em triplicata. Como controle, 100µL da solução de células foram colocadas em meio de cultura na ausência de soro. As placas foram incubadas em estufa a 25°C durante 1 hora. Após o período de incubação, os parasitos foram coletados e colocados diretamente na câmara de Neubauer, onde foram quantificadas apenas as células que apresentavam movimento flagelar (células viáveis).

3.9 Infecção de macrófagos murinos

A infecção *in vitro* foi estudada conforme realizado anteriormente por Nérís et al. (2013). Para obtenção dos macrófagos murinos foram utilizadas fêmeas de camundongos Suiços com 8 a 10 semanas de idade provenientes do Biotério Thomas George (CBiotec/UFPB). Os camundongos foram utilizados após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB (protocolo nº 183/2015). Esses camundongos foram elicitados através da

inoculação de 1mL de tioglicolato (Gibco) na cavidade peritoneal. Após 5 dias, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e os macrófagos coletados através da injeção de 10mL de PBS suplementado com 3% de SBF na cavidade peritoneal do animal, sendo esta solução recuperada em seguida e transferida para tubos de polipropileno, onde foi centrifugada durante 10 minutos $111 \times g$ (1000 rpm [Centrífuga Parsec CT0603]). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado de 10% de SBF e antibiótico (estreptomicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e penicilina a 100 U/mL) (RPMI completo). Essas células foram então quantificadas em câmara de Neubauer, na presença do corante vital Azul de Tripán a 0,4%, que é permeável apenas em células mortas, permitindo assim a distinção de células viáveis das não viáveis.

Após a coleta dos macrófagos peritoniais de camundongos, foi feito o ajuste para 5×10^5 células/mL com meio RPMI completo, sendo 1mL dessa suspensão distribuídos em placas de 24 poços, contendo cada poço uma lamínula estéril de 13mm de diâmetro. As placas foram incubadas em estufa de 5% de CO_2 a 37°C por 2 horas, para que os macrófagos pudessem aderir na lamínula. Durante o período de incubação, culturas de promastigotas dos dois isolados clínicos, sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente, em fase estacionária de crescimento, foram centrifugadas por 10 minutos a $447 \times g$ (2000 rpm [Centrífuga Parsec CT0603]). O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1mL de RPMI completo e quantificadas em câmara de Neubauer. Após as 2 horas, foram inoculadas 5×10^6 promastigotas/mL em cada poço (proporção de 10 promastigotas/ 1 macrófago), e incubadas novamente por 3 horas em estufa de 5% de CO_2 a 37°C . Após este tempo, cada poço foi lavado 3 vezes com PBS suplementado com 3% de SBF pré-aquecido a 37°C , para que as células não aderidas e não internalizadas fossem removidas, colocando no fim de cada lavagem 1mL de RPMI completo.

Após 24 e 72 horas de infecção, as lamínulas foram coletadas e coradas com o kit de coloração hematológica rápida (Centerkit, Brasil) e montadas em lâminas permanentes com o uso de entelan. As análises das lamínulas foram realizadas em microscopia óptica comum (aumento total: 1000x), onde foram quantificados cerca de 300 macrófagos por lamínula, analisando a quantidade de macrófagos infectados e não infectados, bem como o número de amastigotas por macrófago infectado. Os resultados foram expressos em: porcentagem de macrófagos infectados, número de amastigotas por macrófago infectado e índice de infecção (% de $m\phi$ infectados \times (nº de amastigotas/macrófago infectado)).

3.10 Infecção *in vivo* em camundongos suíços

Para os estudos *in vivo* foram utilizadas fêmeas de camundongos Suíços com 8 a 10 semanas de idade provenientes do Biotério Thomas George (CBiotec/UFPB). A fim de verificar uma possível diferença na infecção *in vivo* causada pelo isolado clínico AF sensível em comparação com a forma resistente ao SbIII 10 camundongos foram infectados com 40 μ L (1×10^7 promastigotas/40 μ L) de suspensão de formas promastigotas em fase estacionária do isolado clínico AF sensível e outros 10 camundongos foram infectados com AF resistente ao SbIII. A infecção foi feita através de injeção via subcutânea na pata posterior direita de cada animal. As espessuras das patas infectadas e não infectadas foram medidas periodicamente, durante 8 semanas, como já realizado anteriormente por Rocha (2014).

Em seguida, foi realizada a infecção em camundongos suíços fêmeas com formas promastigotas inoculadas nas orelhas dos animais, conforme realizado anteriormente por Sousa et al. (2014). Inicialmente, 10 camundongos foram infectados com 10 μ L (1×10^7 promastigotas/20 μ L) de suspensão de formas promastigotas em fase estacionária do isolado clínico AF sensível e outros 10 camundongos foram infectados com AF resistente ao SbIII. A infecção foi feita através de injeção via intradérmica na orelha direita de cada animal e as espessuras das orelhas infectadas foram medidas periodicamente, durante 5 semanas.

3.11 Análise estatística

Os dados obtidos em cada experimento foram avaliados utilizando o *teste t*. Para análise comparativa dos resultados obtidos entre grupos diferentes foi utilizado o *One-way ANOVA*, com pós teste de *Bonferroni*. Para realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa *GraphPadPrism* versão 6.0. Apenas os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Para o cálculo de IC_{50} e EC_{50} foi utilizado o modelo de análise de regressão Probit através do programa SPSS 13.0 para Windows.

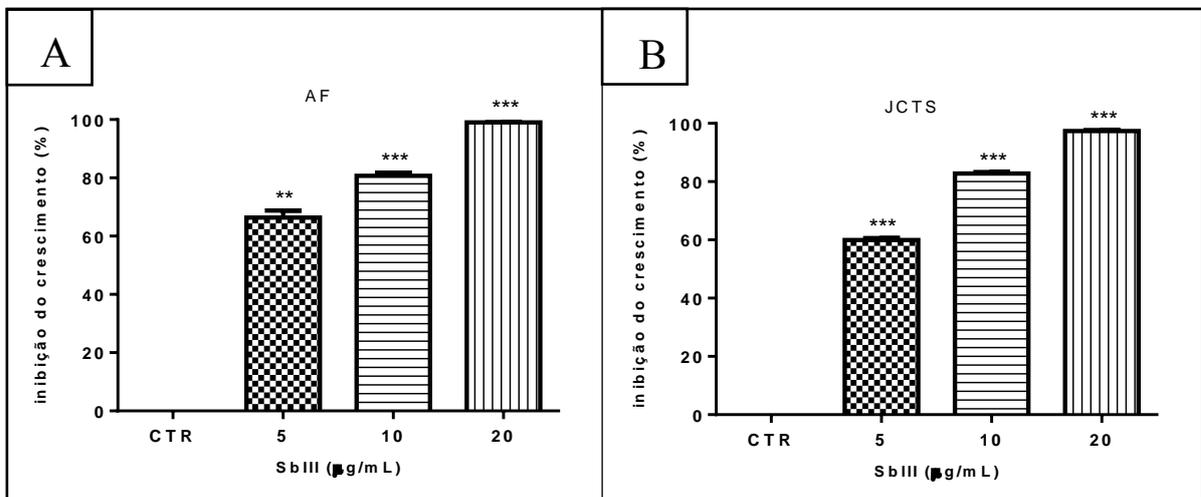
Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sensibilidade de isolados de *L. braziliensis* ao antimônio trivalente

Para verificar o nível inicial de sensibilidade das formas promastigotas dos isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* AF e JCTS, foram determinadas as concentrações de antimônio trivalente que inibem 50% do crescimento dos parasitos (IC_{50}), para cada isolado clínico. O IC_{50} calculado para o isolado clínico AF foi de 3,66 $\mu\text{g/mL}$ de SbIII, e para o isolado clínico JCTS foi de 5,7 $\mu\text{g/mL}$ de SbIII. O Gráfico 1 mostra que concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ de SbIII promoveu a morte de quase 100% dos parasitos, de ambas as culturas, e em microscopia óptica foi observada lise de quase todas as células.

Gráfico 1 - Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (SbIII) em isolados clínicos (AF e JCTS) de *Leishmania braziliensis*



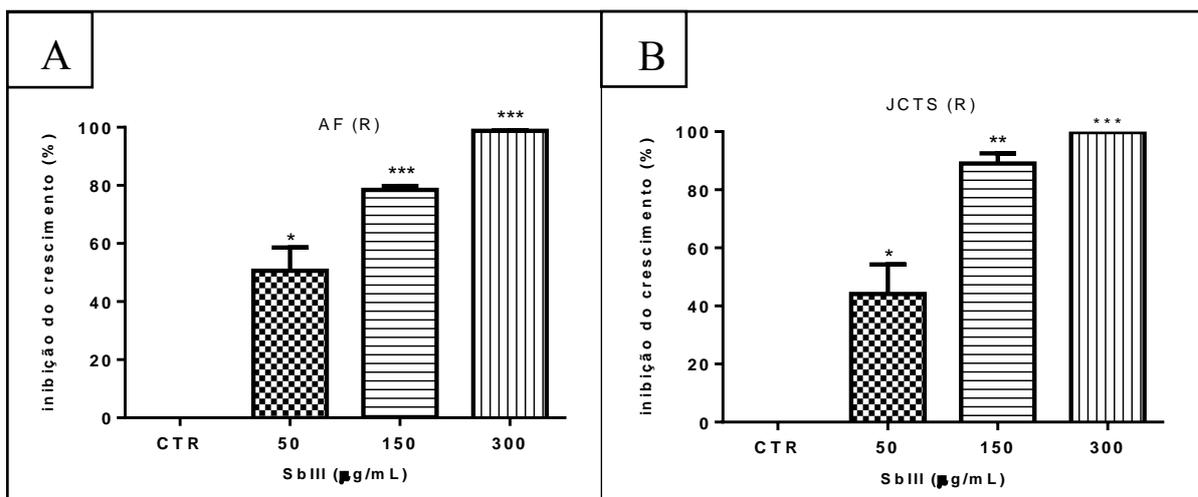
Fonte: CORDEIRO, L.V. As formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (1×10^6 células/mL) dos isolados clínicos (A) AF e (B) JCTS foram cultivadas a 25°C na presença de antimônio trivalente (SbIII) durante 72 horas. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Para calcular a IC_{50} foi realizada uma análise de regressão utilizando o software Probit SPSS 13.0. Os dados foram comparados utilizando o teste *t*, com significância de ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

4.2 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente (SbIII)

O processo de seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente iniciou-se utilizando as concentrações de SbIII correspondentes às IC_{50} dos dois isolados clínicos: AF e JCTS. Dessa forma, o isolado clínico AF foi inicialmente cultivado em presença de SbIII na concentração de 3,6 $\mu\text{g/mL}$ e o isolado clínico JCTS, em 5,7 $\mu\text{g/mL}$. As duas culturas foram cultivadas seguindo a mesma metodologia de seleção de resistência, onde foram realizados repiques sucessivos em concentrações crescentes da droga. Após um total de 41 repiques a IC_{50} calculada para o isolado clínico AF foi de 52,26 $\mu\text{g/mL}$ de SbIII, e para o isolado clínico JCTS foi de 78 $\mu\text{g/mL}$ de SbIII (Gráfico 2). Obteve-se culturas com um nível de resistência correspondente a 14 e 13 vezes a IC_{50} da cultura inicial (selvagem) para AF e JCTS, respectivamente.

As culturas selvagens foram consideradas sensíveis ao SbIII e identificadas como AF(S) e JCTS(S). Já as culturas que passaram pelo processo de seleção de parasitos resistentes foram identificadas como AF(R) e JCTS(R).

Gráfico 2 - Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (SbIII) em isolados clínicos resistentes (AF(R) e JCTS(R)) de *Leishmania braziliensis*



Fonte: CORDEIRO, L.V. Após a seleção de parasitos resistentes ao SbIII, as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (1×10^6 células/mL) dos isolados clínicos (A) AF e (B) JCTS resistentes foram cultivadas a 25°C na presença de antimônio trivalente (SbIII) durante 72 horas. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizada uma análise de regressão utilizando o software Probit SPSS 13.0 para cálculo da IC_{50} . Os dados foram

comparados utilizando o *teste t*, com significância de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

Os elevados níveis de resistência adquiridos pelas culturas utilizadas no presente estudo, 14 e 13 vezes maior que as culturas selvagens, estão em conformidade com as análises observadas por Liarte e Murta (2010). Estes autores selecionaram parasitos resistentes ao SbIII utilizando diferentes espécies de *Leishmania*. Após sucessivas passagens em meio de cultura com a droga, observaram que as culturas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *L. V. braziliensis* apresentaram níveis de resistência 19 e 20 vezes maior que as culturas iniciais, selvagens, respectivamente. Embora tenham seguido exatamente a mesma metodologia, as culturas de *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. L. infantum chagasi* alcançaram níveis de resistência menores, que foram 6 e 4 vezes maior que as culturas iniciais, respectivamente. Este estudo demonstrou que os parasitos do subgênero *Viannia* foram capazes de adquirir altos níveis de resistência, e que estes foram maiores que os níveis observados nas culturas do subgênero *Leishmania*.

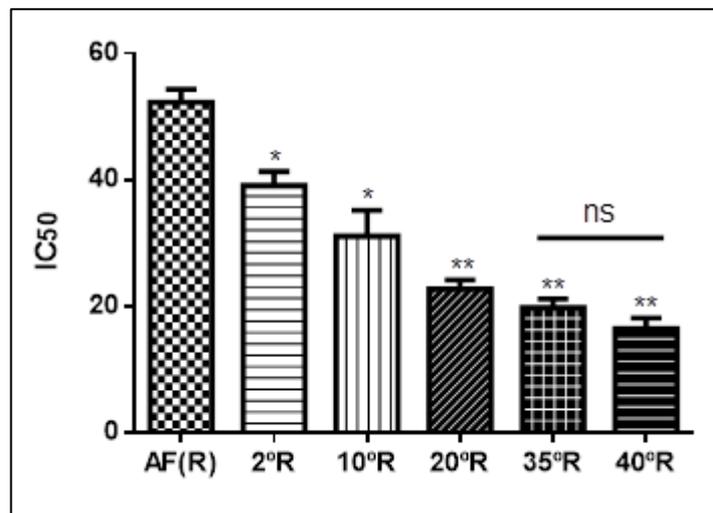
No presente estudo, a seleção de parasitos resistentes foi induzida *in vitro* a partir de cepas sensíveis ao SbIII e todas as análises subsequentes foram realizadas comparando os respectivos pares, sensíveis e resistentes, de cada isolado clínico. Dessa forma, os pares sensíveis e resistentes possuem o mesmo *background* genético, minimizando os possíveis efeitos das variáveis genotípicas, conforme argumentado por Hendrickx et al. (2016a). Diversas pesquisas demonstram que o processo de cultivo de *Leishmania* sp. *in vitro* a longo prazo pode levar à atenuação da virulência dos parasitos (SILVA; SACKS, 1987; CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998; BEETHAM; DONELSON; DAHLIN, 2003; MOREIRA et al., 2012). Visando também evitar essa variável experimental, as culturas sensíveis e seus respectivos resistentes, de cada isolado clínico, foram mantidas com igual número de repiques. Como as análises realizadas foram comparativas entre culturas sensíveis e resistentes, a possível atenuação da virulência devido ao tempo de cultivo terá ocorrido de igual maneira para ambas as culturas. Assim, as diferenças observadas nos parâmetros de virulência entre culturas sensíveis e resistentes terão ocorrido devido a outros fatores que não o número de repiques *in vitro*.

4.3 Análise da estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio trivalente adquirido pelos isolados clínicos de *L. braziliensis*

A fim de verificar a estabilidade da resistência ao SbIII adquirida pelos isolados clínicos AF(R) e JCTS(R), essas culturas foram cultivadas na ausência da droga (SbIII), para que após repiques sucessivos fossem analisadas as IC₅₀ frente ao SbIII.

Conforme demonstrado no gráfico 3, a cultura AF apresentou níveis de resistência ao SbIII menores à medida que o número de repiques na ausência da droga aumentaram. Após 40 repiques sem a droga, a cultura apresentou IC₅₀ de 16,40 µg/mL de SbIII, demonstrando um decréscimo significativo em seu nível de resistência inicial, de 52,26 µg/mL de SbIII (Quadro 2). Embora após 40 repiques sem SbIII a cultura ainda seja quatro vezes mais resistente do que a cultura AF (S) (*teste t*; $p \leq 0,05$), observa-se um comportamento de reversão progressiva do fenótipo de resistência, conforme ilustrado no gráfico 3 e no quadro 2.

Gráfico 3 - Estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico AF



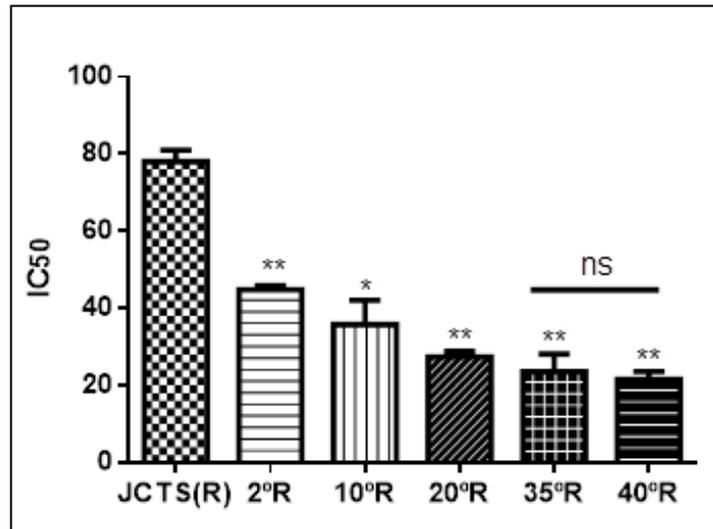
Fonte: CORDEIRO, L.V. Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico AF através da determinação da IC₅₀ após sucessivos repiques (2, 10, 20, 35 e 40 repiques) em meio de cultura na ausência do antimônio trivalente (SbIII). Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer. O cálculo das IC₅₀ foi feito através do software Probit SPSS 13.0. Os dados foram comparados utilizando o *teste t*, com significância de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Significância em relação à cultura AF (AF(R)) com nível de resistência 14 vezes maior que a cultura sensível). Entre o 35º e o 40º repique realizado na ausência de SbIII não foi observada diferença significativa (ns) entre as IC₅₀ determinadas.

Quadro 2 - Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico AF

Cultura: AF	IC₅₀	Nível de resistência
Sensível	3,66 µg/mL	-
Resistente	52,26 µg/mL	14x
2°R s/SbIII	39,07 µg/mL	10x
10°R s/SbIII	31,07 µg/mL	8x
20°R s/SbIII	22,70 µg/mL	6x
35°R s/SbIII	19,70 µg/mL	5x
40°R s/SbIII	16,40 µg/mL	4x

Fonte: CORDEIRO, L.V. Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico AF através da determinação da IC₅₀ após sucessivos repiques (2, 10, 20, 35 e 40 repiques) realizados em meio de cultura na ausência do antimônio trivalente (SbIII). Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer. O cálculo das IC₅₀ foi feito através do software Probit SPSS 13.0 e o nível de resistência foi determinado em comparação com o nível de resistência (IC₅₀) da cultura sensível.

De modo semelhante ao observado com o isolado clínico AF, a cultura JCTS também apresentou níveis de resistência ao SbIII menores à medida que o número de repiques na ausência da droga aumentaram (Gráfico 4). Após 40 repiques sem a droga, a cultura apresentou IC₅₀ de 22,00 µg/mL de SbIII, demonstrando um decréscimo significativo em seu nível de resistência inicial, de 78,00 µg/mL de SbIII, embora ainda mantenha um nível de resistência três vezes maior que a cultura JCTS (S) (*teste t*; $p \leq 0,05$) (Quadro 3). Portanto, também foi possível observar um comportamento de reversão progressiva do fenótipo de resistência neste isolado clínico.

Gráfico 4 - Estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico JCTS

Fonte: CORDEIRO, L.V. Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico JCTS através da determinação da IC₅₀ após sucessivos repiques (2, 10, 20, 35 e 40 repiques) em meio de cultura na ausência do antimônio trivalente (SbIII). Os resultados representam a média de dois experimentos em duplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer. O cálculo das IC₅₀ foi feito através do software Probit SPSS 13.0. Os dados foram comparados utilizando o teste *t*, com significância de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (Significância em relação à cultura JCTS (JCTS(R)) com nível de resistência 14 vezes maior que a cultura sensível). Entre o 35º e o 40º repique realizado na ausência de SbIII não foi observada diferença significativa (ns) entre as IC₅₀ determinadas, indicando uma possível estabilização no nível de resistência dessa cultura.

Quadro 3 - Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico JCTS

Cultura: JCTS	IC ₅₀	Nível de resistência
Sensível	5,70 µg/mL	-
Resistente	78,00 µg/mL	13x
2ºR s/SbIII	44,87 µg/mL	7x
10ºR s/SbIII	35,80 µg/mL	6x
20ºR s/SbIII	27,45 µg/mL	4x
35ºR s/SbIII	23,65 µg/mL	4x
40ºR s/SbIII	22,00 µg/mL	3x

Fonte: CORDEIRO, L.V. Análise da estabilidade da resistência adquirida pelo isolado clínico JCTS através da determinação da IC₅₀ após sucessivos repiques (2, 10, 20, 35 e 40 repiques) realizados em meio de cultura na ausência do antimônio trivalente (SbIII). Os resultados representam a média de dois

experimentos em duplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer. O cálculo das IC₅₀ foi feito através do software Probit SPSS 13.0 e o nível de resistência foi determinado em comparação com o nível de resistência (IC₅₀) da cultura sensível.

Ambos os isolados clínicos, AF e JCTS, apresentaram comportamentos semelhantes, com progressiva reversão do fenótipo de resistência. Estudos demonstram que protozoários do gênero *Leishmania* são bastante adaptáveis. A natureza plástica do genoma desses microorganismos lhes confere habilidade de amplificar, deletar genes e alterar a ploidia cromossomal conforme necessidade imposta pelo meio (HENDRICKX, 2016a). Dessa forma, acredita-se sem o estresse gerado pela presença da droga, os parasitos provavelmente têm sua expressão gênica alterada, de modo a não mais dispendem gasto energético para expressar fatores envolvidos com a resistência à droga (MOREIRA et al., 2012; LAFFITTE et al., 2016).

Entretanto, outros estudos utilizando culturas resistentes observaram que enquanto algumas culturas também revertiam o fenótipo de resistência outras o mantinham estável mesmo após longos períodos na ausência da droga. Frade (2016) verificou que uma cultura de *L. amazonensis* resistente ao SbIII reduziu significativamente seu nível de resistência após 18 repiques sem a droga e outra cultura de *L. amazonensis* resistente ao SbIII manteve este fenótipo estável após o mesmo número de repiques sem SbIII. Monte-Neto et al. (2011) observaram que entre quatro cepas de *L. amazonensis* resistentes ao SbIII, três reverteram a resistência após 20 repiques na ausência da droga e uma manteve o nível de resistência estável.

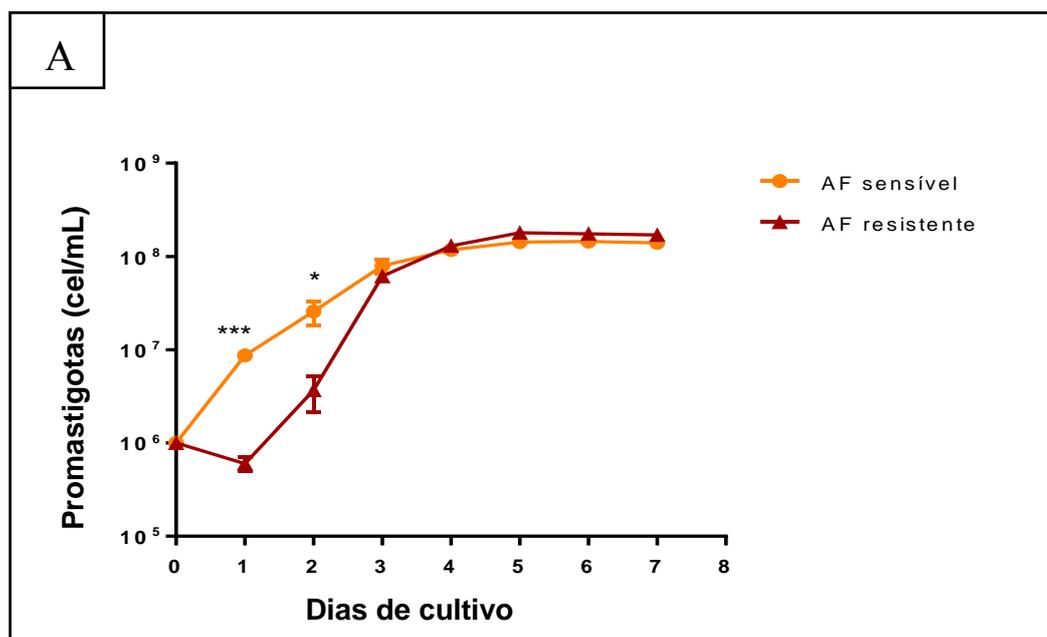
Liarte e Murta (2010) estudaram diferentes espécies resistentes ao SbIII e verificaram que após 47 passagens *in vitro* sem a droga as culturas de *L. guyanensis* e *L. chagasi* não apresentaram alterações em seus níveis de resistência, enquanto que as culturas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* reverteram parcialmente a resistência ao SbIII. Os autores explicam que esses diferentes fenótipos são observados porque provavelmente mais de um mecanismo de resistência está envolvido nesse processo e, enquanto alguns são mais estáveis, outros apresentam capacidade de reversão na ausência de pressão seletiva da droga.

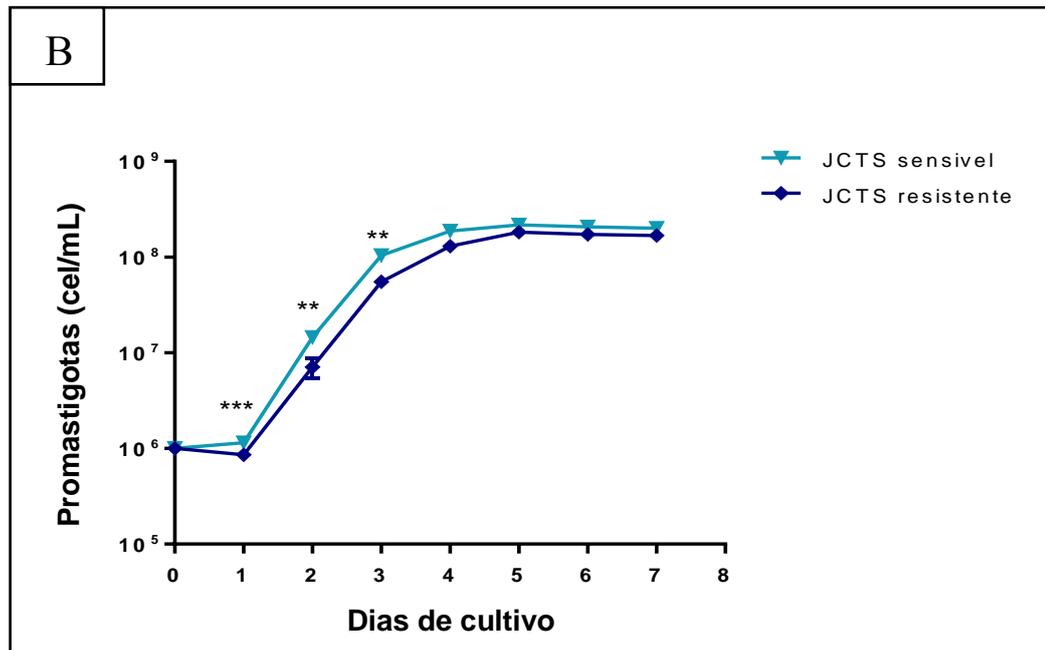
4.4 Perfil de crescimento de isolados clínicos de *L. braziliensis* sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente

Para verificarmos os perfis de crescimento das culturas sensíveis (S) e resistentes (R) ao SbIII foi necessária a análise da curva de crescimento das culturas. É conhecido que na fase logarítmica de crescimento são encontradas, majoritariamente, formas promastigotas procíclicas, enquanto que na fase estacionária são encontradas formas metacíclicas. Desse modo, é possível mimetizar, *in vitro*, o desenvolvimento do parasito, tal como ocorre no interior do inseto vetor (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

Nas condições de cultivo utilizadas no presente trabalho, as culturas sensíveis e resistentes de ambos os isolados clínicos, AF e JCTS, apresentaram perfil de crescimento semelhantes, com fase logarítmica até o quarto dia de cultivo, entrando em fase estacionária de crescimento a partir do quinto dia de cultivo (Gráfico 5). Foi possível detectar que as culturas resistentes (R), tanto do isolado clínico AF quanto JCTS, apresentaram um crescimento populacional menor durante a fase logarítmica, contudo essa diferença não foi constatada quando as culturas entraram em fase estacionária de crescimento.

Gráfico 5 – Curva de crescimento de isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente (SbIII)





Fonte: CORDEIRO, L.V. As formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (1×10^6 células/mL) dos isolados clínicos (A) AF sensível e resistente e (B) JCTS sensível e resistente foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 20% de SBF e 3% de urina, incubadas à temperatura de 25°C e quantificadas diariamente em câmara de Neubauer. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicata para cada cepa. A comparação de cada ponto da curva do isolado clínico sensível (S) em relação ao seu respectivo resistente (R) foi realizada através do teste *t*, com significância de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

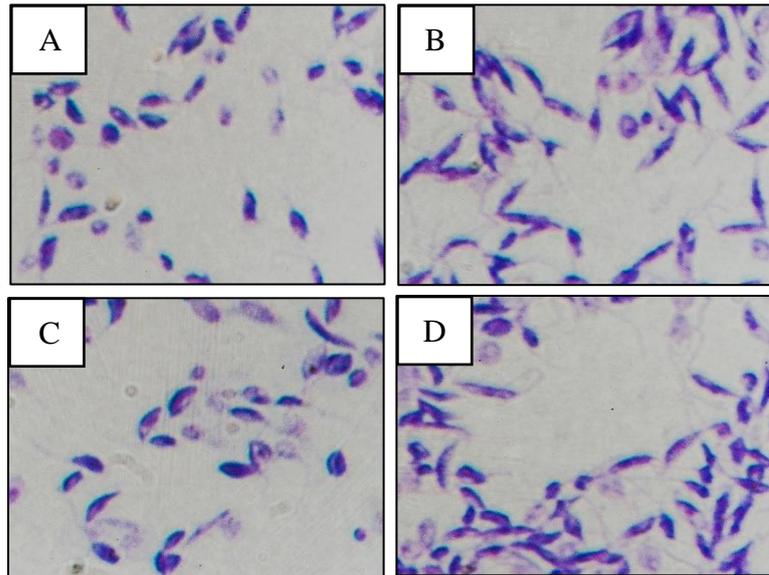
Em estudo realizado por Hendrickx et al. (2015) comparando cepas de *L. donovani* sensíveis e resistentes à paromomicina, os autores relatam não haver diferenças significativas entre as curvas de crescimento das culturas sensíveis e resistentes à droga. Já Hendrickx et al. (2016b) observaram que cepas de *L. donovani* resistentes à miltefosina apresentaram crescimento populacional menor que as respectivas culturas sensíveis, tanto em fase logarítmica quanto em fase estacionária. Contudo, não há relatos na literatura sobre o monitoramento do crescimento de culturas de *L. braziliensis* sensíveis e resistentes aos antimoniais.

4.5 Análise da morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII

Em análise qualitativa sob microscopia óptica foi possível observar que as culturas AF e JCTS resistentes ao SbIII em fase estacionária de crescimento apresentavam mais células com

corpo celular afilado e longa estrutura flagelar quando comparadas às correspondentes culturas sensíveis ao SbIII, conforme demonstra a figura 11.

Figura 11 – Formas promastigotas de isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente (SbIII) em sétimo dia de cultivo (fase estacionária de crescimento)



Fonte: CORDEIRO, L.V. *Leishmania braziliensis*. Formas promastigotas (A) AF sensível, (B) AF resistente, (C) JCTS sensível, (D) JCTS resistente em sétimo dia de cultivo (fase estacionária de crescimento), coradas com coloração hematológica rápida Panótico (aumento 1000x).

Formas promastigotas procíclicas possuem corpo celular largo e arredondado e um flagelo pequeno, enquanto que as metacíclicas apresentam corpo celular mais fino e um flagelo com aproximadamente o dobro do tamanho do seu corpo celular (SOARES et al., 2005), que garante maior capacidade de locomoção ao parasito (DA SILVA et al., 2015). A análise qualitativa realizada no presente estudo indica um maior número de promastigotas com morfologia característica de formas metacíclicas nas culturas resistentes ao SbIII de ambos os isolados clínicos (AF e JCTS) quando comparadas às culturas sensíveis. Os resultados sugerem que possivelmente as culturas resistentes possuam uma maior capacidade de diferenciação em formas metacíclicas *in vitro* do que as culturas sensíveis ao antimonial.

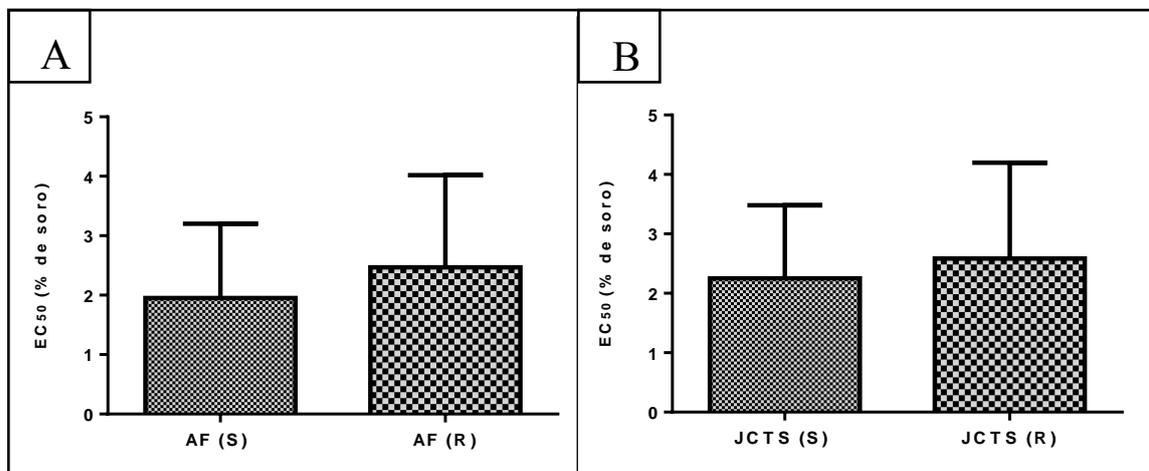
Essa análise corrobora com os resultados encontrados pelas recentes pesquisas realizadas na área, as quais demonstram que a culturas de *L. donovani* resistentes aos antimoniais (OUAKAD et al., 2011) e também à miltefosina (RAI et al., 2013) são capazes de alcançar uma taxa de diferenciação em formas metacíclicas duas vezes maior do que aquela

observada nas culturas sensíveis às drogas. Turner et al. (2015) também demonstrou essa capacidade em cepas de *L. major* e resistentes à miltefosina.

4.6 Sensibilidade à lise mediada pelo sistema complemento

Os isolados clínicos de *L. braziliensis* foram testados quanto à sensibilidade à lise mediada pelo sistema complemento, ao serem colocados em contato com diferentes porcentagens de soro humano. Em fase logarítmica de crescimento não foram encontradas diferenças significativas entre a EC₅₀ (porcentagem do soro que causou 50% de lise celular) determinada para os isolados clínicos sensíveis em comparação com os resistentes ao SbIII, demonstrando que as culturas resistentes apresentam mesmo nível de sensibilidade à lise mediada pelo sistema complemento que as respectivas culturas sensíveis ao SbIII (Gráfico 6).

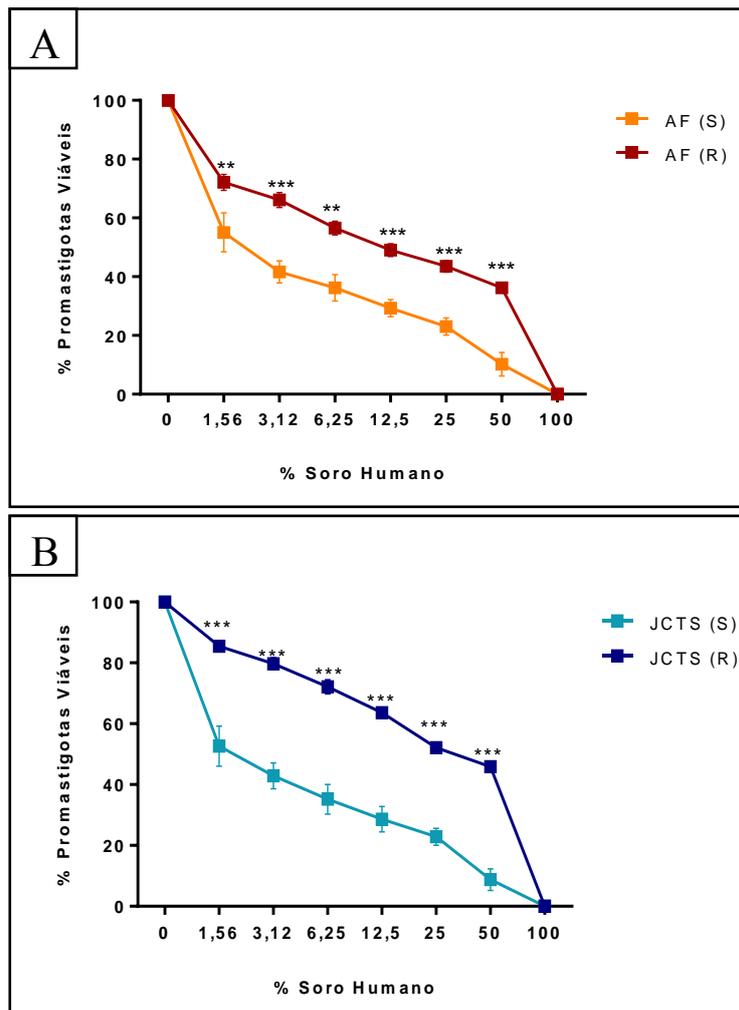
Gráfico 6 – Sensibilidade à lise pelo sistema complemento (fase logarítmica de crescimento)



Fonte: CORDEIRO, L.V. Análise da sensibilidade das formas promastigotas dos isolados clínicos AF e JCTS sensíveis e resistentes ao SbIII quando expostas a diferentes porcentagens de soro humano em fase logarítmica de crescimento. (A) isolados clínicos AF sensível e resistente (B) isolados clínicos JCTS sensível e resistente. A resistência à lise foi determinada pelo cálculo de EC₅₀ (porcentagem do soro que causou 50% de lise celular) através do software Probit SPSS 13.0. Os dados foram comparados utilizando o teste *t*, com significância de ** $p \leq 0,01$. Os resultados representam as médias \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Após exposição das formas promastigotas ao soro humano durante 1 hora, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, sendo consideradas viáveis apenas as células que apresentaram movimento flagelar.

A porcentagem de promastigotas viáveis foi progressivamente menor à medida que a porcentagem de soro aumentou, entretanto, em fase estacionária de crescimento a quantidade de promastigotas viáveis observada nas culturas resistentes foi maior que àquela observada nas culturas sensíveis, em ambos os isolados clínicos (Gráfico 7).

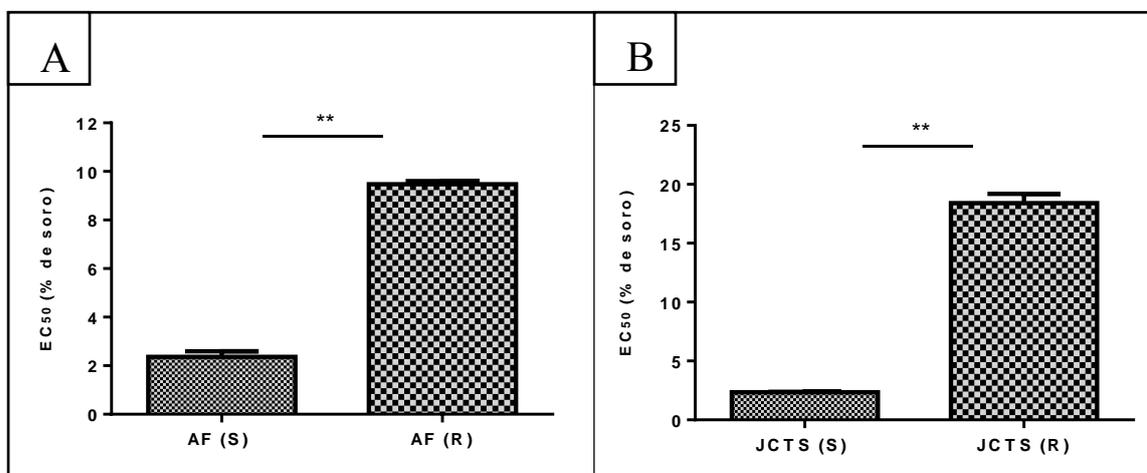
Gráfico 7 – Porcentagem de promastigotas viáveis quando expostas a diferentes porcentagens de soro humano



Fonte: CORDEIRO, L.V. Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento dos isolados clínicos AF sensível e resistente (A) e JCTS sensível e resistente (B) foram expostas a diferentes porcentagens de soro humano durante 1h para análise da resistência à lise mediada pelo sistema complemento. A porcentagem de células viáveis foi calculada com base nos controles, nos quais as células foram cultivadas, sob as mesmas condições experimentais, na ausência do soro humano. Para análise, foi utilizado o teste *t*, com significância de ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, comparando a forma sensível com a resistente. Os resultados representam as médias \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Após exposição das formas promastigotas ao soro humano foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, sendo consideradas viáveis apenas as células que apresentaram movimento flagelar.

Em fase estacionária de crescimento, a EC_{50} determinada para as culturas AF(S) e JCTS(S) foi de 2,3% e 2,5%, respectivamente. Os resultados encontrados para as culturas resistentes ao SbIII foram 9,4% para AF(R) e 18,4% JCTS(R), significativamente maiores do que aqueles encontrados para as correspondentes culturas sensíveis (Gráfico 8). Assim, as culturas resistentes ao SbIII, de ambos os isolados clínicos, foram mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento do que as culturas sensíveis à droga.

Gráfico 8 – Sensibilidade à lise pelo sistema complemento (fase estacionária de crescimento)



Fonte: CORDEIRO, L.V. Análise da sensibilidade das formas promastigotas dos isolados clínicos AF e JCTS sensíveis e resistentes ao SbIII quando expostas a diferentes porcentagens de soro humano em fase estacionária de crescimento. (A) isolados clínicos AF sensível e resistente, (B) isolados clínicos JCTS sensível e resistente. A resistência à lise foi determinada pelo cálculo de EC_{50} (porcentagem do soro que causou 50% de lise celular) através do software Probit SPSS 13.0. Os dados foram comparados utilizando o teste *t*, com significância de ** $p \leq 0,01$. Os resultados representam as médias \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Após exposição das formas promastigotas ao soro humano durante 1 hora, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, sendo consideradas viáveis apenas as células que apresentaram movimento flagelar.

Culturas em fase estacionária de crescimento possuem, majoritariamente, formas promastigotas metacíclicas, que são resultantes de uma série de transformações morfológicas e bioquímicas que as tornam naturalmente mais resistentes à lise pelo sistema complemento (LAURENTI et al., 2004). Por exemplo, os parasitos metacíclicos expressam moléculas de LPG mais longas em sua superfície. Dessa forma, as moléculas de C3b do sistema complemento conseguem depositar-se sob as promastigotas, mas a espessa camada de LPG que as reveste ocasiona um impedimento mecânico, fazendo com que a inserção de C5b em diante seja

comprometida e então o complexo de ataque à membrana não consegue ser formado para causar a lise dos parasitos (PUENTES et al., 1990; CUNNINGHAM, 2002).

Diversas enzimas são mais expressas nas promastigotas metacíclicas, e conseguem fosforilar componentes do sistema complemento, tornando-os inativos (NORONHA et al., 1998). A glicoproteína gp63 é muito abundante nas formas metacíclicas e possui atividade proteolítica, conseguindo clivar o componente C3b em C3bi e impedir a continuidade da cascata de ativação que iria, por fim, provocar a lise das promastigotas (MOSSER; BRITTINGHAM, 1997; CUNNINGHAM, 2002).

Ouakad et al. (2011) demonstraram que promastigotas de *L. donovani* resistentes aos antimonais são também mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento, devido à capacidade de diferenciação em formas metacíclicas duas vezes maior que as cepas sensíveis à droga. Outros estudos também observam maior número de formas metacíclicas nas culturas resistentes a drogas em comparação com as culturas sensíveis (RAI et al., 2013; TURNER et al., 2015).

Acredita-se que a maior resistência de AF(R) e JCTS(R) à lise mediada pelo sistema complemento observada no presente estudo esteja correlacionada com uma maior capacidade de diferenciação em formas metacíclicas. Os achados morfológicos (item 4.5) e o fato de que a diferença na susceptibilidade à lise entre os isolados sensíveis e resistentes apenas ocorreu após a metaciclologênese *in vitro* sugerem que esse pode ser um dos fatores que contribuem para maior resistência à lise por parte dessas cepas.

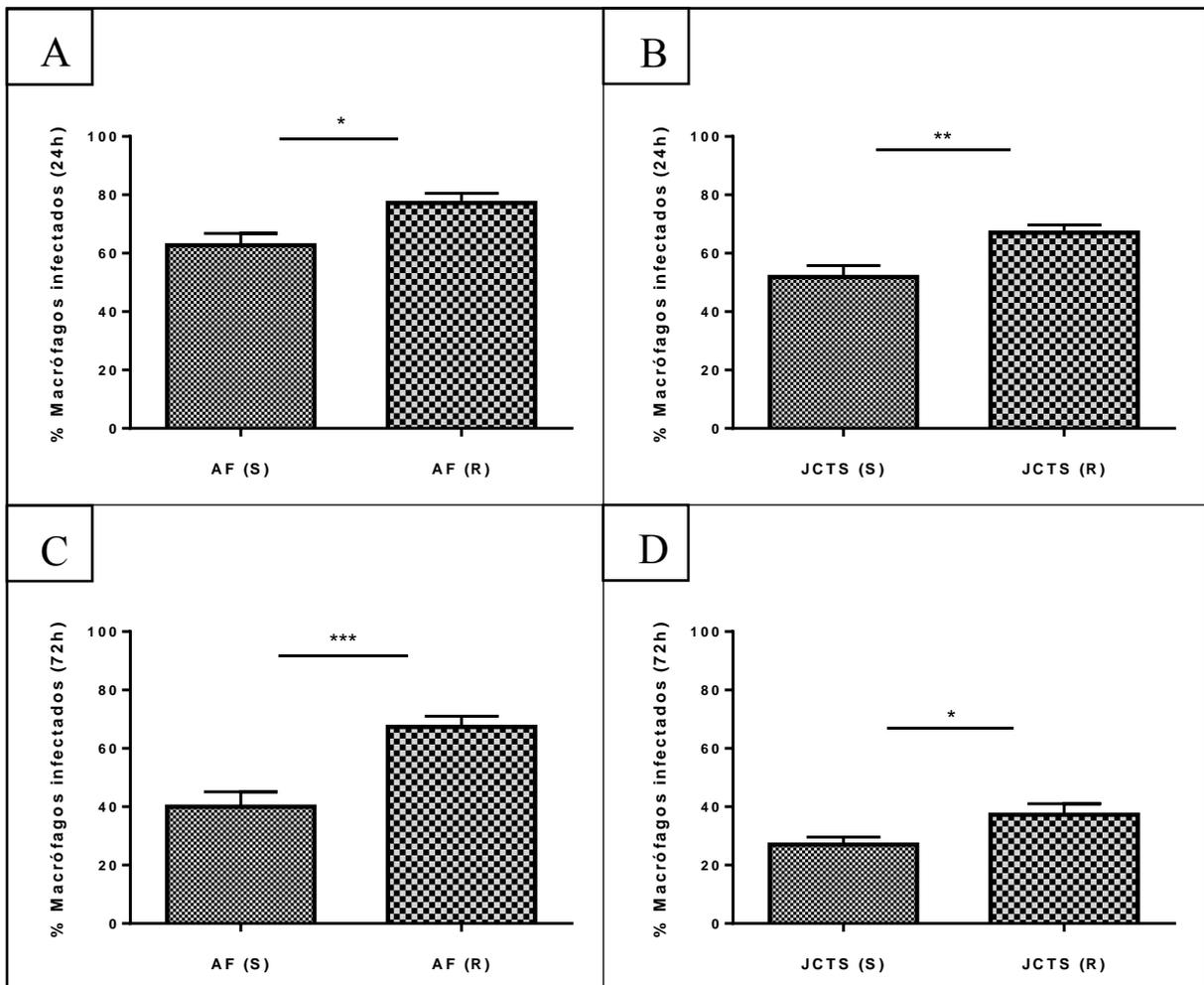
4.7 Infecção de macrófagos murinos

Para avaliar a virulência *in vitro* das culturas sensíveis e resistentes ao SbIII, macrófagos murinos foram infectados com formas promastigotas de AF e JCTS. Foi possível observar diferenças significativas entre o comportamento das formas sensíveis (S) e resistentes (R) durante a infecção (Gráfico 9). Em 24h de infecção, a porcentagem média de macrófagos infectados por AF(S) foi de 62,7% e por AF(R) foi de 77,1%. Já para os isolados clínicos JCTS(S) e JCTS(R) foi de 51,8% e 67,0%, respectivamente. Após 72h de infecção, a

porcentagem média de macrófagos infectados por AF(S) foi de 40,0% e por AF(R) foi de 67,4%. Já para os isolados clínicos JCTS(S) e JCTS(R) foi de 27,0% e 37,3%, respectivamente.

Portanto, verificou-se que as cepas resistentes ao SbIII, tanto do isolado clínico AF quanto do isolado clínico JCTS, infectaram uma porcentagem maior de macrófagos após 24 horas de infecção, em comparação com as formas sensíveis, conforme mostrado no gráfico 9 (A e B). Essa diferença manteve-se presente após 72 horas de infecção, conforme demonstrado em C e D no gráfico 9.

Gráfico 9 – Porcentagem de macrófagos infectados pelos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente



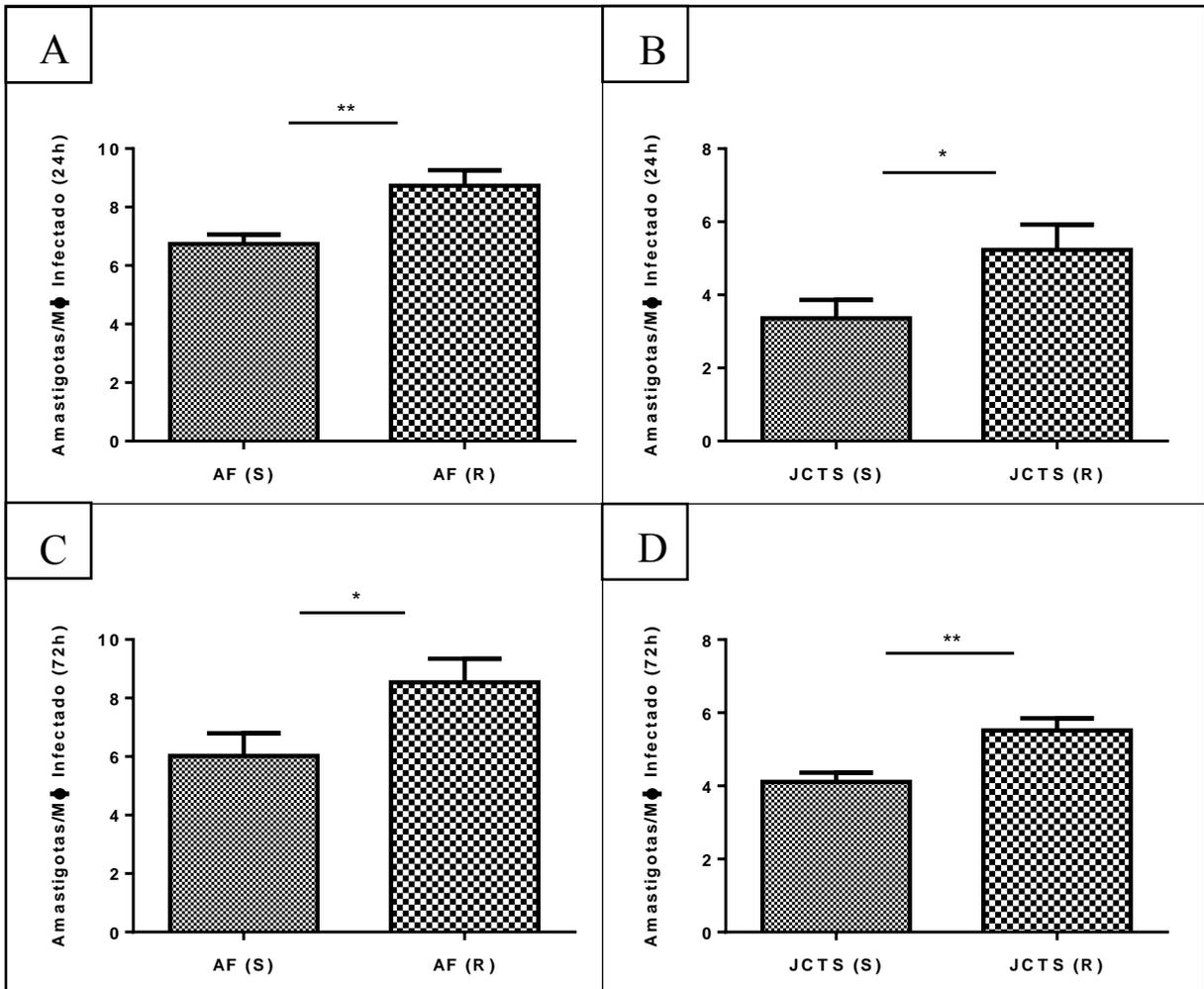
Fonte: CORDEIRO, L.V. Macrófagos murinos foram infectados com formas promastigotas (proporção de 10 promastigotas: 1 macrófago) dos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente e incubados durante 24 e 72 horas em estufa de CO₂ a 35°C. Em seguida, as células foram coradas com coloração hematológica rápida Panótico após 24 horas e 72 horas de infecção e a porcentagem de macrófagos infectados foi quantificada sob microscopia óptica. Porcentagem de

macrófagos infectados após 24h de incubação com as formas promastigotas do isolado clínico (A) AF sensível e resistente e (B) JCTS sensível e resistente. Porcentagem de macrófagos infectados após 72h de incubação com as formas promastigotas do isolado clínico (C) AF sensível e resistente e (D) JCTS sensível e resistente. Cada gráfico representa a média \pm o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram analisados através do *teste t*, com significância de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, comparando a porcentagem de macrófagos infectados pelas formas sensíveis com aqueles infectados pelas formas resistentes.

Com relação ao número médio de amastigotas por macrófago (Gráfico 10), em 24h de infecção com o isolado clínico AF(S) foi observada uma média de 6,7 amastigotas/macrófago, enquanto que a infecção com AF(R) resultou em uma média de 8,7 amastigotas/macrófago. O isolado clínico JCTS(S) obteve uma média de 3,3 amastigotas/macrófago e JCTS(R) 5,2 amastigotas/macrófago em 24h de infecção. Após 72h de infecção, observou-se 6,0 amastigotas/macrófago para AF(S) e 8,5 amastigotas/macrófago para AF(R). Já para JCTS(S) e (R) as médias obtidas foram 4,1 e 5,5 amastigotas/macrófago, respectivamente.

Observa-se, portanto, que as formas resistentes dos isolados clínicos AF e JCTS apresentaram números significativamente maiores (*teste t*: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) em comparação as suas respectivas formas sensíveis ao SbIII, em ambos os tempos de infecção (24 e 72h), conforme evidenciado no gráfico 10.

Gráfico 10 – Número de amastigotas por macrófagos infectados pelos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente

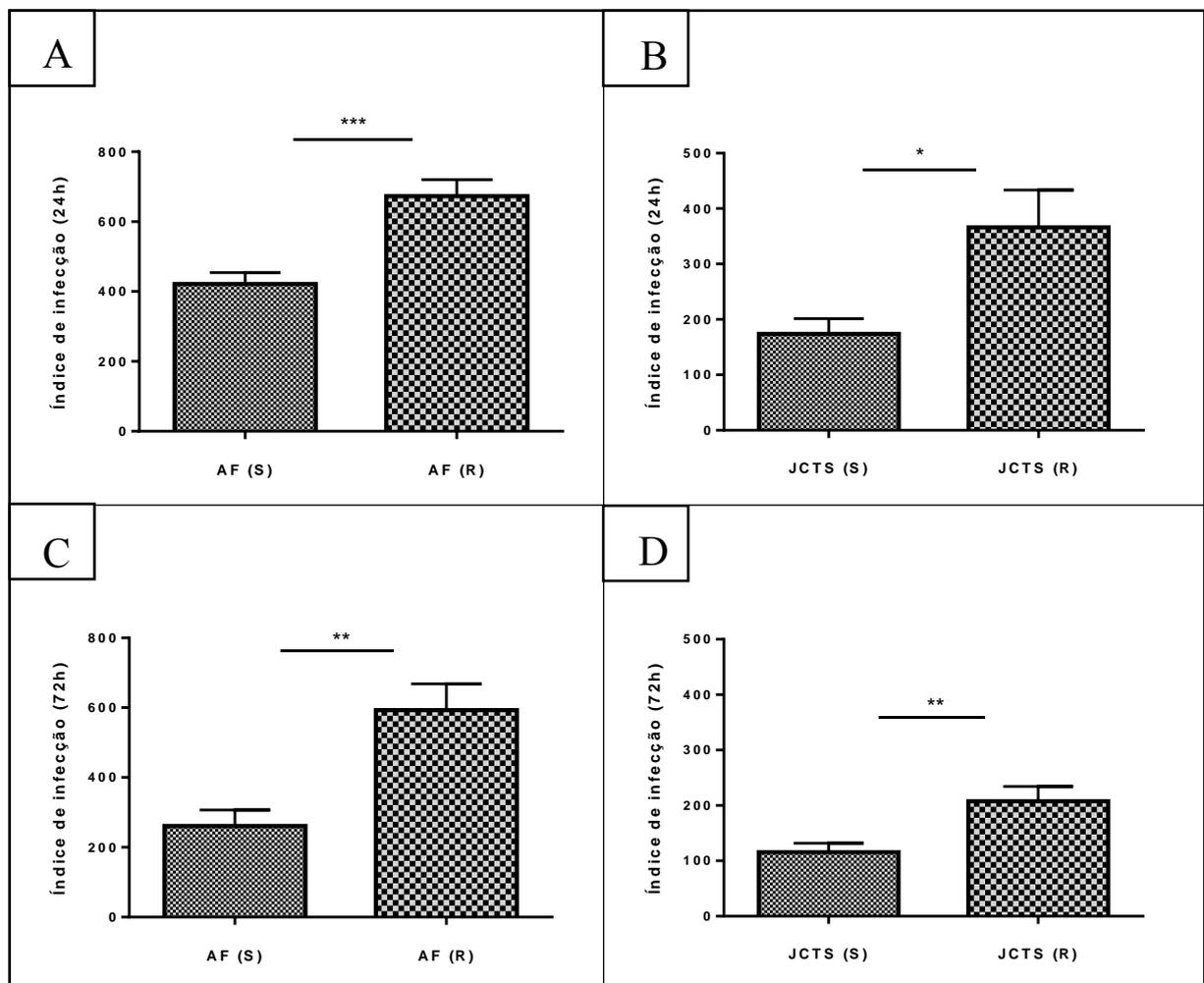


Fonte: CORDEIRO, L.V. Macrófagos murinos foram infectados com formas promastigotas (proporção de 10 promastigotas: 1 macrófago) dos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente e incubados durante 24 e 72 horas em estufa de CO₂ a 35°C. Em seguida, as células foram coradas com coloração hematológica rápida Panótico após 24 horas e 72 horas de infecção e o número de amastigotas presentes em cada macrófago infectado foi quantificado sob microscopia óptica. Número de amastigotas por macrófagos após 24h de infecção com o isolado clínico (A) AF sensível e resistente e (B) JCTS sensível e resistente. Número de amastigotas por macrófagos após 72h de infecção com o isolado clínico (C) AF sensível e resistente e (D) JCTS sensível e resistente. Cada gráfico representa a média ± o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os resultados foram analisados através do teste t, com significância de * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01, comparando o número de amastigotas por macrófagos das formas sensíveis com relação às formas resistentes.

O índice de infecção, que leva em consideração tanto a porcentagem de macrófagos infectados quanto o número de amastigotas por macrófago, determinado para AF(S) e AF(R) após 24h de infecção foi de 421 e 673, respectivamente. Para JCTS(S) e JCTS(R) esses índices foram de 173 e 365, respectivamente, em 24h de infecção. Após 72h de infecção, o índice obtido

para AF(S) e AF(R) foi de 260 e 593. Já para JCTS(S) e JCTS(R) o índice calculado foi de 115 e 207, respectivamente (Gráfico 11). Esses resultados mostram que os parasitos resistentes ao SbIII, de ambos os isolados clínicos (AF e JCTS), apresentaram índices de infecção significativamente maiores quando comparados àqueles apresentados pelas respectivas formas sensíveis ao SbIII. Essa diferença pôde ser evidenciada tanto em 24 quanto em 72 horas de infecção.

Gráfico 11 - Índice de infecção de macrófagos murinos infectados pelos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente

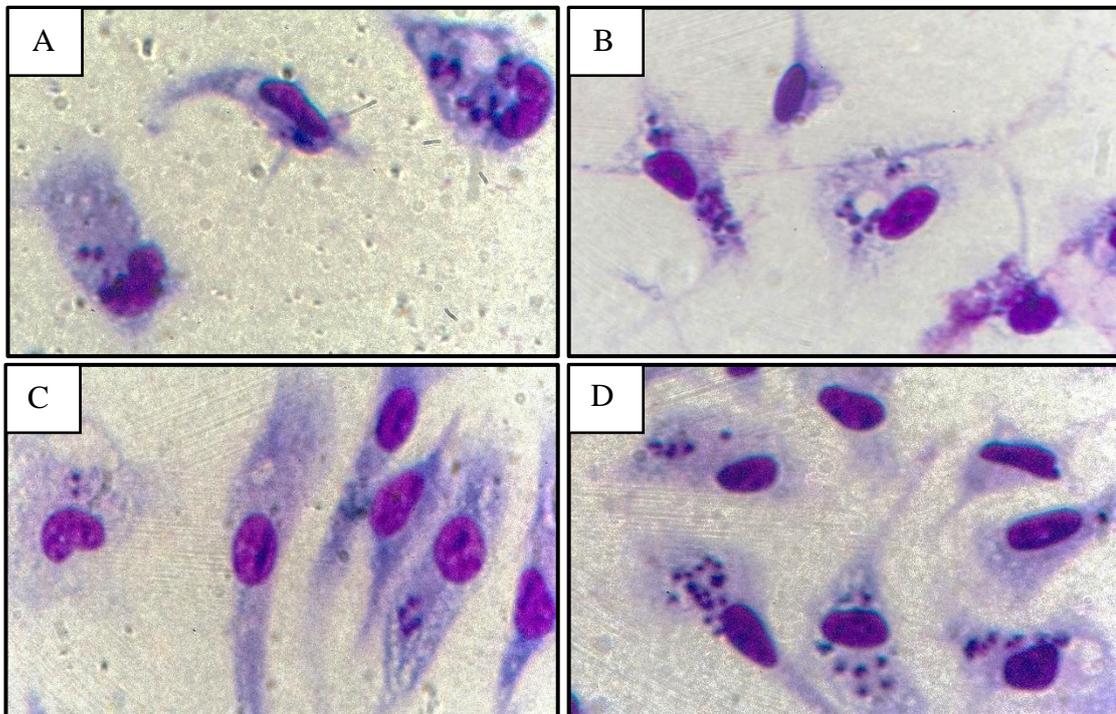


Fonte: CORDEIRO, L.V. Macrófagos murinos foram infectados com formas promastigotas (proporção de 10 promastigotas: 1 macrófago) dos isolados clínicos AF sensível e resistente e JCTS sensível e resistente e incubados durante 24 e 72 horas em estufa de CO₂ a 35°C. Em seguida, as células foram coradas com coloração hematológica rápida Panótico após 24 horas e 72 horas de infecção e quantificadas sob microscopia óptica. Índice de infecção após 24h de infecção com o isolado clínico (A) AF sensível e resistente e (B) JCTS sensível e resistente. Índice de infecção após 72h de infecção com o isolado clínico (C) AF sensível e resistente e (D) JCTS sensível e resistente. Cada gráfico representa a média ± o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os

resultados foram analisados através do *teste t*, com significância de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, comparando o índice de infecção das formas sensíveis com relação às formas resistentes.

Na figura 12 é mostrada uma representação dos resultados da infecção *in vitro* através de fotomicrografias de macrófagos murinos infectados com o isolado clínico AF, nas formas sensíveis e resistentes ao SbIII, após 24 horas (A e B) e 72 horas de infecção (C e D) (aumento 1000x). É possível observar um maior número de amastigotas por macrófago no quadrante B em comparação com o quadrante A da figura, os quais são correspondentes à infecção com a forma AF resistente e sensível, respectivamente, após 24 horas de infecção. Já nos quadrantes C e D da figura 12, é possível observar um maior número de macrófagos infectados no campo visualizado no quadrante D em comparação ao quadrante C, os quais correspondem à infecção com a forma AF resistente e sensível, respectivamente, após 72 horas de infecção.

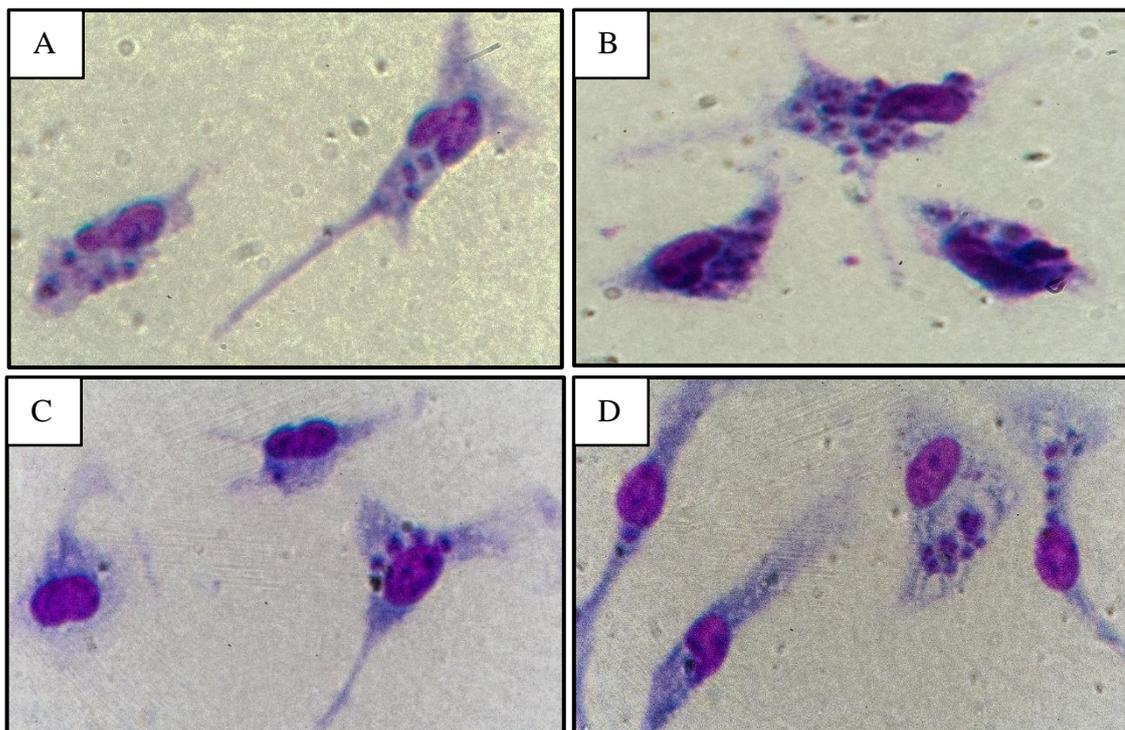
Figura 12 – Macrófagos murinos infectados com isolado clínico de *Leishmania braziliensis* AF sensível e resistente ao antimônio trivalente



Fonte: CORDEIRO, L.V. Macrófagos infectados com formas amastigotas do isolado clínico de *Leishmania braziliensis*: AF sensível (A e C) e resistente (B e D), e coradas com coloração hematológica rápida Panótico após 24 horas (A e B) e 72 horas de infecção (C e D) (aumento 1000x).

Na figura 13 observa-se fotomicrografias de macrófagos murinos infectados com o isolado clínico JCTS, nas formas sensíveis e resistentes ao SbIII, após 24 horas (A e B) e 72 horas de infecção (C e D) (aumento 1000x). É possível verificar um maior número de amastigotas por macrófago no quadrante B em comparação com o quadrante A da figura, os quais são correspondentes à infecção com a forma JCTS resistente e sensível, respectivamente, após 24 horas de infecção. Já nos quadrantes C e D da figura é possível observar um maior número de macrófagos infectados no campo visualizado no quadrante D em comparação ao quadrante C, os quais correspondem à infecção com a forma JCTS resistente e sensível, respectivamente, após 72 horas de infecção.

Figura 13 – Macrófagos murinos infectados com isolado clínico de *Leishmania braziliensis* JCTS sensível e resistente ao antimônio trivalente



Fonte: CORDEIRO, L.V. Macrófagos infectados com formas amastigotas do isolado clínico de *Leishmania braziliensis*: JCTS sensível (A e C) e resistente (B e D), e coradas com coloração hematológica rápida Panótico após 24 horas (A e B) e 72 horas de infecção (C e D) (aumento 1000x).

Diante do exposto, conclui-se que ambos os isolados clínicos aos quais se induziu resistência ao SbIII possuem maior capacidade de infectar e manter a infecção em macrófagos murinos *in vitro* do que as respectivas cepas sensíveis. Portanto, observa-se que a resistência ao

SbIII está relacionada com uma maior virulência das cepas utilizadas neste trabalho para macrófagos murinos *in vitro*.

Holzmuller, Sereno e Lemesre (2005) observaram que amastigotas de *L. infantum* resistentes ao antimonial trivalente possuíam maior índice de infecção em macrófagos murinos e eram resistentes ao NO. Recentemente, Moura et al. (2016) também analisaram cepas de *L. infantum* isoladas de pacientes responsivos e não responsivos ao tratamento com antimonial. Eles observaram que os parasitos resistentes ao tratamento com antimonial apresentavam resistência ao NO. Essas mesmas cepas também alcançaram índices de infecção em macrófagos murinos superiores àqueles observados pelas cepas responsivas à ação do antimonial. O estudo observou ainda que as formas amastigotas dos parasitos resistentes ao SbV foram capazes de proliferar e sobreviver no interior dos macrófagos mesmo na presença de LPS e IFN- γ , os quais ativam os mecanismos microbicidas dessas células fagocíticas. Os autores sugerem que a resistência ao antimonial possivelmente leva a alterações bioquímicas nos parasitos que os torna capazes de inibir a ativação de mecanismos microbicidas dos macrófagos.

Análises de metaboloma e proteoma em espécies de *Leishmania* resistentes a drogas têm demonstrado que esses parasitos apresentam alterações relacionadas a uma maior fluidez da membrana, conferindo uma possível resistência ao estresse oxidativo dos macrófagos. Também demonstram maior biossíntese de fosfolipídeos, de modo que pode interferir em sua virulência e também aumentar a proteção contra o estresse oxidativo. É observada ainda uma maior quantidade de alguns aminoácidos, que podem servir como fonte alternativa de energia para sobrevivência no interior das células fagocíticas, onde os nutrientes são escassos, e assim aumentar a sobrevivência do parasito. Os níveis de purina são elevados, servindo como um “kit de sobrevivência” com os fatores necessários para a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas no estágio inicial da infecção (BERG et al., 2013; CARNIELLI et al., 2014).

Rai et al. (2013) analisaram isolados clínicos de *L. donovani* obtidos de pacientes com leishmaniose visceral resistentes ao tratamento com miltefosina e observaram que estes apresentaram capacidade de diferenciação em formas metacíclicas significativamente maior do que aquela observada nos isolados de pacientes com boa resposta clínica ao tratamento. Também foi observado que os isolados resistentes à miltefosina infectaram maior porcentagem de macrófagos *in vitro* do que os isolados sensíveis ao fármaco. Hendrickx et al. (2016b) mostraram que cepas de *L. donovani* resistentes à miltefosina são mais infectantes *in vitro*, com

maior capacidade de multiplicação de amastigotas e maior resistência ao estresse oxidativo provocado por macrófagos.

Vanaerschot et al. (2010) e Ouakad et al. (2011) observaram que cepas de *L. donovani* resistentes aos antimoniais eram mais infectantes que as cepas sensíveis aos antimoniais, conseguindo estabelecer maiores níveis de infecção em macrófagos murinos *in vitro*. Gómez et al. (2014) reforçaram essa correlação entre resistência ao Sb e virulência *in vitro* ao verificaram maior capacidade de sobrevivência dos isolados clínicos de *L. panamensis* de pacientes que foram refratários ao tratamento com antimonial no interior dos macrófagos em comparação com aqueles que responderam bem ao tratamento.

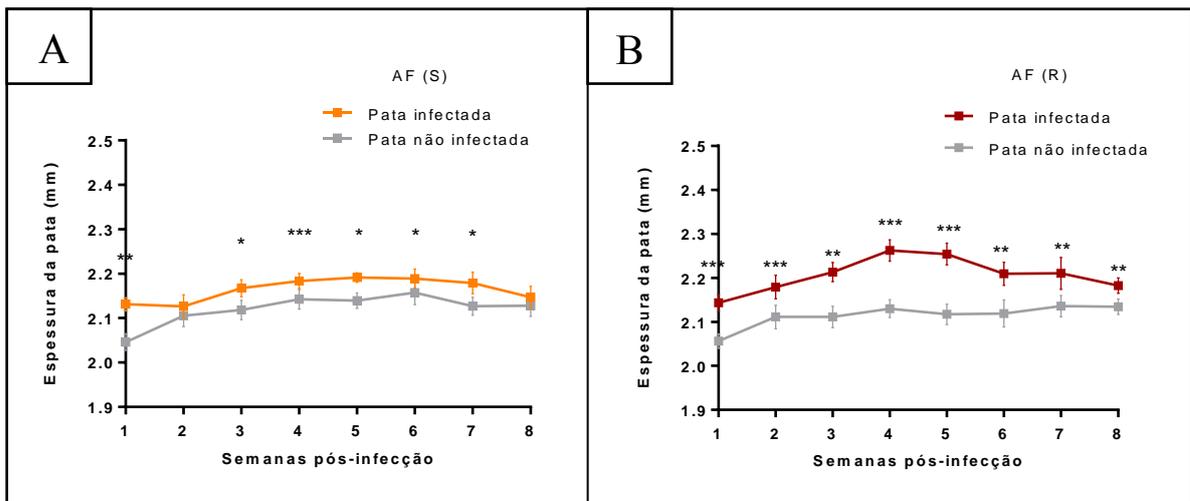
Dessa forma, os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os recentes dados publicados na literatura, que demonstram que cepas de *Leishmania* resistentes aos antimoniais apresentam maior virulência em modelos de infecção *in vitro*. É possível que a indução de resistência à droga leve a alterações bioquímicas que tornam as formas amastigotas mais resistentes aos mecanismos microbicidas dos macrófagos. Entretanto, ainda não estão elucidadas quais alterações ocorrem nos parasitos e como elas podem levar a esse comportamento. Considerando a significância destas evidências para a terapêutica das leishmanioses, é de grande importância que os mecanismos envolvidos com esta correlação sejam melhor investigados.

4.8 Infecção *in vivo* em camundongos suíços

Para avaliar se a resistência ao antimônio interfere na virulência *in vivo* de *L. braziliensis*, formas promastigotas das culturas AF(S) e AF(R) foram inicialmente inoculadas por via subcutânea na pata posterior de camundongos suíços, conforme realizado anteriormente por Rocha (2014). Neste último trabalho, foi observado que a cultura AF recentemente isolada de paciente com leishmaniose disseminada, foi capaz de infectar camundongos suíços, desenvolvendo um pequeno edema no sítio de inoculação após duas semanas de infecção, que não demonstrou resolução durante o período de observação, de 17 semanas. Rocha (2014) também identificou a permanência de parasitos nos linfonodos destes animais.

No presente estudo, a infecção com AF(S) e AF(R) foi acompanhada durante 8 semanas e as espessuras das patas dos camundongos foram mensuradas (Gráfico 12). Observou-se que um pequeno edema de pata tanto no grupo de camundongos infectados com AF(S) (Gráfico 12A) quanto no grupo infectado com AF(R) (Gráfico 12B).

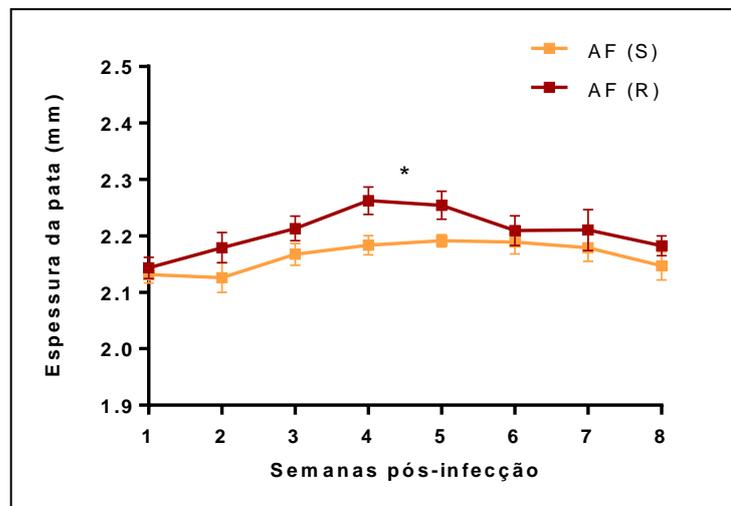
Gráfico 12 – Espessura das patas de camundongos suíços infectados pelo isolado clínico de *Leishmania braziliensis* AF em comparação com as espessuras das patas não infectadas



Fonte: CORDEIRO, L.V. Camundongos suíços foram infectados na pata por via subcutânea com o isolado clínico de *L. braziliensis* AF, culturas sensível e resistente ao SbIII. (A) O primeiro grupo, com dez animais infectados por AF(S), teve a espessura das patas infectadas (patas direitas) e não infectadas (patas esquerdas) medidas durante oito semanas. (B) O segundo grupo foi infectado por AF(R) e também teve a espessura das patas infectadas (patas direitas) e não infectadas (patas esquerdas) medidas durante oito semanas. A diferença significativa entre as patas indica presença de lesão/edema. A comparação foi feita utilizando o teste *t*, com significância de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Cada ponto do gráfico representa a média \pm erro padrão da média das espessuras das patas de cada grupo.

Comparando a média das espessuras das patas infectadas por AF(S) com aquelas infectadas por AF(R) observa-se que, excetuando-se a quarta semana de infecção, não foi identificada uma diferença significativa entre os grupos nos demais tempos analisados (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Espessura das patas de camundongos suíços infectadas pelo isolado clínico de *Leishmania braziliensis* AF sensível em comparação com as espessuras das patas infectadas por AF resistente



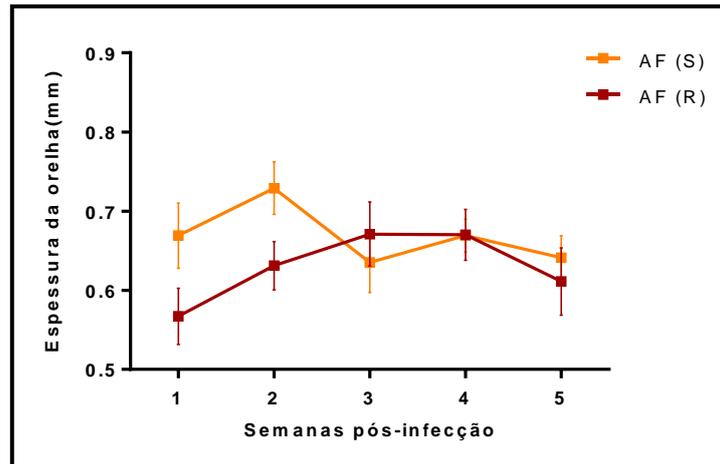
Fonte: CORDEIRO, L.V. Camundongos suíços foram infectados na pata por via subcutânea com o isolado clínico de AF sensível e resistente. Os grupos, com dez animais infectados cada, tiveram a espessura das patas infectadas (patas direitas) medidas durante oito semanas. Foi feita a comparação da espessura das patas infectadas por AF sensível com relação àquelas infectadas por AF resistente. Essa comparação foi feita utilizando o teste *t*, com significância de * $p \leq 0,05$. Cada ponto do gráfico representa a média \pm erro padrão da média das espessuras das patas de cada grupo.

É bem conhecido o fato de que grande maioria das linhagens de camundongos demonstra ser resistente à infecção por *L. braziliensis*, não existindo um modelo murino que mimetize a infecção observada em humanos (CHILDS et al., 1984; SAMUELSON et al., 1991). Contudo, Moura et al. (2005) propuseram um modelo de infecção *in vivo* em camundongos Balb/c que se assemelha aos achados clínicos da leishmaniose tegumentar americana causada por *L. braziliensis*. Estes autores observaram que a inoculação de cepas de *L. braziliensis* na região dérmica da orelha dos camundongos levou a uma lesão ulcerada após cinco semanas de observação.

Com base nos resultados obtidos por Moura et al. (2005), que demonstraram ser um modelo *in vivo* mais sensível para infecção com *L. braziliensis*, decidiu-se então verificar se as culturas AF(S) e (R) apresentavam capacidade de promover lesão nas orelhas de camundongos suíços e se havia diferença significativa entre os grupos infectados. Os resultados mostraram que durante até cinco semanas de infecção, não foi possível detectar qualquer edema ou sinal de lesão na região da inoculação nos camundongos ou próxima a ela. Portanto, a espessura

média das orelhas infectadas por AF(S) manteve-se equivalente à observada nos animais infectados por AF(R) (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Espessura das orelhas de camundongos suíços infectadas pelo isolado clínico de *Leishmania braziliensis* AF sensível em comparação com as espessuras das orelhas infectadas por AF resistente



Fonte: CORDEIRO, L.V. Camundongos suíços foram infectados na orelha com o isolado clínico de AF sensível e resistente. Os grupos, com dez animais cada, tiveram a espessura das orelhas infectadas medidas durante cinco semanas. Foi feita a comparação da espessura das orelhas infectadas por AF sensível com relação àquelas infectadas por AF resistente. Essa comparação foi feita utilizando o teste *t*, porém não foram encontradas diferenças significativas. Cada ponto do gráfico representa a média \pm erro padrão da média das espessuras das orelhas do grupo.

É importante realçar a necessidade de mais estudos que possibilitem uma melhor compreensão da virulência *in vivo* destas culturas no modelo estudado. É pertinente, por exemplo, que se investigue a carga parasitária presente nos animais infectados, o que poderá ajudar a esclarecer se essas culturas, que demonstraram maior virulência em modelo de infecção *in vitro*, são também mais virulentas em modelos *in vivo*.

Conclusão

5. Conclusão

Foi observada uma correlação entre resistência ao antimônio trivalente e virulência *in vitro* em isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis*, visto que os parasitos resistentes ao antimônio foram também mais resistentes à lise pelo complemento e mais virulentos em modelo de infecção *in vitro* de macrófagos murinos.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDELRAOUF, K.; KABBARA, S.; LEDESMA, K. R.; POOLE, K.; TAM, V. H. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, pp. 1311–17, 2011.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. v. 112, n.18, pp. 2993-3002, 1999.

ALMEIDA, M.C.; CUBA, C. A.; DE SÁ, C. M.; PHAROAH, M. M.; HOWARD, K. M.; MILES, M. A. Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* *in vitro*: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 87, n. 3, pp. 325–29, 1993.

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P.; Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. v. 61, pp. 223-74, 2006.

AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; BARBOSA, T. P.; NÉRIS, P. L. N.; CALDAS, J. P. A.; SOUSA, S. C. O.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; OLIVEIRA, M. R. Morita-Baylis-Hillman adduct shows *in vitro* activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**. v. 140, pp. 29-38, 2013.

ANDRADE, B. B.; de OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 66, n. 2-3, pp. 122–127, 2007.

ASHUTOSH; GUPTA, S.; RAMESH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in *in vitro* drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, pp. 3776-83, 2005.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, pp. 143-53, 2007.

BABIKER, H. A.; HASTINGS, I. M.; SWEDBERG, G. Impaired fitness of drug-resistant malaria parasites: evidence and implication on drug-deployment policies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 7, pp. 581–93, 2009.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**. v. 30, n. 4, pp. 435-43, 1998.

BANDYOPADHYAY, P.; GHOSH, D. K.; ALOKE; GHOSH, K. N.; CHAUDHURI, P. P.; DAS, P.; BHATTACHARYA, A. Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: species-specific in vitro transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profile. **Journal of Parasitology**. v. 77, n. 3, pp. 411-16, 1991.

BARBOSA, R. I.; COSTA, I. C. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Scientia Medica**. v. 23, n.1, pp. 5-11, 2013.

BATES, P. A.; TETLEY, L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. **Experimental Parasitology**. v. 76, pp. 412–23, 1993.

BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**. v. 11, n. 4, pp. 340-344, 2008.

BEETHAM, J.; DONELSON, J.; DAHLIN, R. Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 131, pp. 109–17, 2003.

BERG, M.; VANAERSCHOT, M.; JANKEVICS, A.; CUYPERS, B.; MAES, I.; MUKHERJEE, S.; KHANAL, B.; RIJAL, S.; ROY, S.; OPPERDOES, F.; BREITLING, R.; DUJARDIN, J. Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. **Molecular Microbiology**. v. 90, n. 2, pp. 428-42, 2013.

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 27 pp. 916-20, 1985.

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, pp.197-201, 1987.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 10, n. 3, pp. 560–86, 1988.

BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology**. v. 204, n. 6, pp. 619-34, 2015.

BOTTAZZI, B.; DONI, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annual Review of Immunology**. 28, pp. 157–83, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2a ed., 180p. Brasília, 2007.

BRASIL, SINAN/SVS/MS. Dados Epidemiológicos Sinan. **Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Paraíba**. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/ltapb.def>>. Acesso em: 24/12/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN/SVS/MS. **Leishmaniose Visceral. Situação Epidemiológica – Dados**. 2014a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 24/12/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN/SVS/MS. **Leishmaniose Tegumentar Americana. Situação Epidemiológica – Dados**. 2014b. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 24/12/2016.

BRITTINGHAM, A.; MILLER, M. A.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 112, pp. 51–59, 2001.

BURCHMORE, R. J.S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, vol. 31, pp. 1311–1320, 2001.

CARNIELLI, J.; ANDRADE, H.; PIRES, S.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; MONTI-ROCHA, R.; CARVALHO, S.; RIBEIRO, L.; DIETZE, R.; FIGUEIREDO, S.; LEMOS, E. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. **Journal of Proteomics**. v. 108, pp. 198-208, 2014.

CARVALHO, M.L.R.; de ANDRADE, A. S. R.; FONTES, C. J. F.; HUEB, M.; SILVA, S. O.; MELO, M. N. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta Tropica**. v. 98, pp. 277-285, 2006.

CHARMOY, M.; AUDERSET, F.; ALLEBACH, C.; TACCHINI-COTTIER, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, pp. 1-8, 2010.

CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Decatenation of kinetoplastid DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 26 pp. 215-24, 1987.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 1, pp. 111–26, 2010.

CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L. K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M. G.; PRICE, E. E.; HENDRICKS., L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and

susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 78, pp. 25–34, 1984.

CLARKSON, S. Dissecting the role of LPG in *Leishmania* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 8, 2003.

COSTA, J.M.L.; COSTA, A.A.U. M. L.; ELKHOURY, A.N.; BEZERRIL, A.C.R.; BARRAL, A.; SALDANHA, A. C. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 79, n. 3, pp., 16-24.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 1, pp. 111-26, 2006.

CULLEY, F. J.; HARRIS, R. A.; KAYE, P. M.; MCADAM, K. P.; RAYNES, J. G. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. **Journal of Immunology**. v. 156, pp. 4691–96, 1996.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 72, pp. 132-41, 2002.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R.; ALVES, F.; LEON, L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental Parasitology**. v. 89, pp. 58–62, 1998.

DA SILVA, I. A.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B. L.; PEREIRA, L. I. A.; DORTA, M. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; HORTA, M. F.; RIBEIRO-DIAS, F. *In vitro* metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. **BioMed Research International**. v. 2015, 2015.

DASSONI, F.; ABEBE, Z.; NAAFS, B.; MORRONE, A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tuberculoid leprosy: a new clinical presentation? **Acta dermato-venereologica**. v. 93, n. 1, pp. 74-77, 2013.

DAULATABAD, D.; SINGAL, A.; DHAWAN, A, PANDHI, D., SHARMA, S. Mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* infection in an Indian man. **International Journal of Dermatology**. v. 54, pp. 680–684, 2015.

DAVID, C. V. CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**. v. 22. pp. 491-502, 2009.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochemical Journal**. v. 381 pp. 405-12, 2004.

DOGANIS, D.; MAVRIKOU, M.; TSOLIA, M.; READ, P. D. F. Post Kala Azar dermal leishmaniasis in a 15-month-old Greek boy. **Hippokratia**. v. 19, n. 1, pp. 93-93, 2015.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**. v. 20, n. 1, pp. 34–50, 2010.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**. v. 93, pp. 179-200, 2010.

FILARDY, A. A.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; KOELLER, C. M.; GUIMARÃES-PINTO, K.; RIBEIRO-GOMES, F. L. R.; LOPES, M. F.; HEISE, N.; FREIRE-DE-LIMA, C.; NUNES, M. P.; DOSREIS, G. A. Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. **Plos ONE**. v. 9, n.1, p. e85715, 2014.

FRADE, D. K. G. **O impacto da resistência ao antimonial trivalente na biologia e resistência à lise pelo complemento em *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2016. 82p. Dissertação de Mestrado – Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2016.

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

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance**. v. 2, pp. 11-19, 2012.

GAGANDEEP, K.; BHAWANA, R. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. **Journal of Parasitology Research**. v. 2014, 2014.

GAMBOA, D.; TORRES, K.; DE DONCKER, S.; ZIMIC, M.; AREVALO, J.; DUJARDIN, J. C. Evaluation of an in vitro and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. **Parasitology**. v. 135, pp. 319–326, 2008.

GÓMEZ, M. A.; NAVAS, A.; MÁRQUEZ, R.; ROJAS, L. J.; VARGAS, D. A.; BLANCO, V.; KOREN, E.; ZILBERSTEIN, D.; SARAIVA, N. G. *Leishmania panamensis* infection and antimonial drugs modulate expression of macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: Impact on intracellular parasite survival. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 69, n. 1, pp. 139-49, 2014.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**. v. 33, pp. 1027-34, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, pp. 293-307, 2012.

HALDAR, A. K.; SEM, P.; SOY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular biology international**. v. 2011, 2011.

HENDRICKX, S.; LEEMANS, A.; MONDELAERS, A.; RIJAL, S.; KHANAL, B.; DUJARDIN, J.; DELPUTTE, P.; COS, P.; MAES, L. Comparative fitness of a parent *Leishmania donovani* clinical isolate and its experimentally derived paromomycin-resistant strain. **Plos One**. v. 10, n. 10, pp. 1-15, 2015.

HENDRICKX, S.; GUERIN, P. J.; CALJON, G.; CROFT, S. L.; MAES, L. Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: the challenges. **Parasitology**, pp. 1-11, 2016a.

HENDRICKX, S.; BEYERS, J.; MONDELAERS, A.; EBERHARDT, E.; LACHAUD, L.; DELPUTTE, P.; COS, P.; MAES, L. Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in *Leishmania infantum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 71, n. 7, pp. 1914-21, 2016b.

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, n. 10, pp. 4406-09, 2005.

HOOVER, D. L.; BERGER, M.; MACY, C. A.; HOCKMEYER, W. T.; MELTZER, M. S. Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in normal human serum. **Journal of Immunology**. v.132, pp. 893-97, 1984.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, pp. 41-51, 2001.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in parasitology**. v. 22, n. 9, pp. 439-445, 2006.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. **Journal of parasitology research**. v. 2014, 2014.

KAYE, S.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews**. v. 9, pp. 604-15, 2011.

KEMPER, C.; ATKINSON, J. P.; HOURCADE, D. E. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. **The Annual Review of Immunology**. v. 28, pp. 131-55, 2010.

KUMAR, P.; LODGE, R.; RAYMOND, F.; RITT, J.; JALAGUIER, P.; CORBEIL, J.; OUELLETTE, M.; TREMBLAY, M. Gene expression modulation and the molecular mechanisms involved in Nelfinavir resistance in *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Molecular microbiology**. v. 89, n. 3, pp. 565-82, 2013.

LAFFITTE, M. N.; LEPROHON, P.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**. v. 5, 2016.

LAINSON, R., J. J. SHAW. Evolution, classification and geographical distribution, The Leishmaniases In Biology And Medicine. **Academic Press**. pp. 1–120, 1987.

LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P.; SOTTO, M. N.; SINHORINI, I. L.; GOTO, H. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 77, pp. 15-24, 1996.

LAURENTI, M. D.; ORN, A.; SINHORINI, I. L.; CORBETT, C. E. P. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, pp. 427-34, 2004.

LEMAIRE, J.; MKANNEZ, G.; GUERFALI, F. Z.; GUSTIN, C.; ATTIA, H.; SGHAIER, R. M.; SYSCO-CONSORTIUM; DELLAGI, K.; LAOUNI, D.; RENARD, P. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n. 10, p. e2478, 2013.

LEPROHON, P.; LÉGARÉ, D.; RAYMOND, F.; MADORE, E.; HARDIMAN, G.; CORBEIL, J.; OUELLETTE, M. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. **Nucleic Acids Research**. v. 37, pp. 1387–1399, 2009.

LIARTE, D. B.; MURTA, S. M. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. **Parasitology Research**. v. 107, n. 1, pp. 205-12, 2010.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 51, n. 5, pp. 247-253, 2009.

LIRA, R.; MENDEZ, S.; CARRERA, L.; JAFFE, C.; NEVA, F.; SACKS, D. *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. **Experimental Parasitology**. v. 89, pp. 331-42, 1998.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 50, n. 5, pp. 341-52, 2013.

MATOS, D. C.; FACCIOLI, L. A.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LUCA, P. M.; CORTE-REAL, S.; ARMOA, G. R.; LEMES, E. M.; DECOTE-RICARDO, D.; MENDONCA, S. C. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.105, n. 3, pp. 341–47, 2010.

MATRANGOLO, F. S.; LIARTE, D. B.; ANDRADE, L. C.; DE MELO, M. F.; ANDRADE, J. M.; FERREIRA, R. F.; SANTIAGO, A. S.; PIROVANI, C. P.; SILVA-PEREIRA, R. A.; MURTA, S. M. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 190, pp. 63-75, 2013.

MAURER, M.; DONDI, B.; STEBUT, E. V. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**. v. 198, pp. 137-146, 2009.

MCKEAN, P. G.; DENNY, P. W.; KNUEPFER, E.; KEEN, J. K.; KEEN; SMITH, D. F. Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. **Cellular Microbiology**. v. 3, n. 8, pp. 511-523, 2001.

MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**. v. 6, p. 262, 2015.

MOLINA, H.; HOLERS, V. M.; LI, B.; FUNG, Y.; MARIATHASAN, S.; GOELLNER, J.; STRAUSS-SCHOENBERGER, J.; KARR, R. W.; CHAPLIN, D. D. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 93, n. 8, pp. 3357–61, 1996.

MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; LÉGARÉ, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; OUELLETTE, M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, pp. e1167, 2011.

MOREIRA, D.; SANTARÉM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J.; SILVA, A. M.; AMORIM, A. M.; OUAISSI, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; SILVESTRE, R. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 6, n. 1, pp. e1469, 2012.

MOREIRA, E. S.; SOARES, R.M.; PETRILLO-PEIXOTO, M. D. E. L. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. **Parasitology Research**. v. 81, pp. 291-95, 1995.

MOREIRA, E. S.; ANACLETO, C.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. **Parasitology Research**. v. 84, pp. 720-26, 1998.

MOSSER, D. M.; BURKE, S. K.; CONTAVAS, E. E.; WEDGWOOD, J. F.; EDELSON, P. J. *Leishmania* species: Mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. **Experimental Parasitology**. v. 62, pp. 394-404, 1986.

MOSSER, D. M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology**, v. 115, pp. 9-23, 1997.

MOURA, T. R., NOVAIS, F. O., OLIVEIRA, F., CLARÊNCIO, J., NORONHA, A., BARRAL, A., BRODSKYN, C., OLIVEIRA, C. I. Toward a novel experimental model of

infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**. v. 73, n. 9, pp. 5827-34, 2005.

MOURA, T. R.; SANTOS, M. L.; BRAZ, J. M.; SANTOS, L. F.; ARAGÃO, M. T.; OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, P. L.; SILVA, A. M.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R. P. Cross-resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. **Parasitology Research**. v. 115, n. 2, pp. 713-21, 2016.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. v. 366, pp. 1561–1577, 2005.

NÉRIS, P. L. N.; CALDAS, J. P. A.; RODRIGUES, Y. K. S.; AMORIM, F. M.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, M. R. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*. **Experimental Parasitology**. v. 135, pp. 307-13, 2013.

NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. P. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 37, n. 1, pp. 134-140, 2000.

NORONHA, F.; NUNES, A. C.; SOUZA, K.; MELO, M. N.; PINTO, J. R. Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. Promastigotes to complement-mediated lysis: Correlation with the expression of three parasite polypeptides. **Acta Tropica**, v. 69, n. 1, pp. 17-29, 1998.

OHNO, M.; HIRATA, T.; ENOMOTO, M.; ARAKI, T.; ISHIMARU, H.; TAKAHASHI, T. A. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. **Molecular Immunology**. v. 37, pp. 407–12, 2000.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical microbiology reviews**. v. 18, n. 2, pp. 293-305, 2005.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M. T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**. v. 14, pp. 1377-89, 2012.

OUAKAD, M.; VANAERSCHOT, M.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; SPEYBROECK, N.; KESTENS, L.; BOEL, L.; DONCKER, D.; MAES, I.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J. C. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**. v. 138, n. 11, pp. 1392-99, 2011.

OULELLETE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug resistance update**. v. 7, n. 4-5, pp. 257-66, 2004.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**. v. 321, 2008.

PINTO-DA-SILVA, L. H.; FAMPA, P.; SOARES, D. C.; OLIVEIRA, S. M. P.; SOUTO-PADRON, T.; SARAIVA, E. M. The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania (L.) amazonensis* metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut. **International Journal for Parasitology**. v. 35, n. 7, pp. 757-64, 2005.

PUENTES, S. M.; DA SILVA, R. P.; SACKS, D. L.; HAMMER, C. H.; JOINER, K. A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of Immunology**. v. 145, n. 12, pp. 4311-16, 1990.

RAI, K.; CUYPERS, B.; BHATTARAI, N.; URANW, S.; BERG, M.; OSTYN, B.; DUJARDIN, J.; RIJAL, S.; VANAERSCHOT, M. Relapse after treatment with miltefosine for visceral leishmaniasis is associated with increased infectivity of the infecting *Leishmania donovani* strain. **MBio**, v. 4, n. 5, pp. e00611-13, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, n. 9, pp. 581-96, 2007.

ROCHA, J. C. **Comportamento de camundongos suíços frente à infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* e/ou *Leishmania (L.) amazonensis***. 2014. 90p. Dissertação de Mestrado – Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2014.

RODRIGUES, Y. K. S. **Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de parasitos *Leishmania* sp. de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba**. 2012. 150p. Dissertação de Mestrado – Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2012.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**. v. 69, pp. 100-3, 1989.

SACKS, D. L.; MODI, G.; ROWTON, E.; SPATH, G.; EPSTEIN, L.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The role of phosphoglycans in *Leishmania*- sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 97, n. 1, pp. 406–11, 2000.

SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology**. v. 3, n. 4, pp. 189–96, 2001.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**. v. 3, n. 11, pp. 1041-47, 2002.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **Journal of Experimental Medicine**. v. 173, pp. 49–54, 1991.

SANTOS, L. O.; MARINHO, F. A.; ALTOE, E. F.; VITORIO, B. S.; ALVES, C. R.; BRITTO, C. MOTTA, M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A.; D'AVILA-LEVY, C. M. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. **Plos one**. v. 4, n. 3, p.e. 4918, 2009.

SARAIVA, E. M.; PIMENTA, P. F.; BRODIN, T. N.; ROWTON, E.; MODI, G. B.; SACKS, D. L. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**. v. 111, n. 3, pp. 275–87, 1995.

SHAHIAN, M.; ALBORZI, A. Effect of meglumine antimoniate on the pancreas during treatment of visceral leishmaniasis in children. **Medical Science Monitor**. v. 15, 2009.

SILVA, R.; SACKS, D. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infection and Immunity**. v. 55, n. 11, pp. 2802-06, 1987.

SILVA-ALMEIDA, M.; PEREIRA, B. A. S.; RIBEIRO-GUIMARÃES, M. L.; ALVES, C. R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites & Vectors**. v. 5, pp. 160, 2012.

SILVEIRA, F. T.; MULLER, S. R.; SOUZA, A. A.; LAINSON, R. L.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Parasitologia Médica**. v. 22, n. 1, pp. 9–20. 2008.

SJÖBERG, A. P.; TROUW, L. A.; BLOM, A. M. Complement activation and inhibition: a delicate balance. **Trends in Immunology**. v. 30, n. 2, pp. 83–90, 2009.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 10, n. 2, 2004.

SOARES, R. P. P.; CARDOSO, T. L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M. S. S.; PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation

regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**. v. 35, pp. 245–253, 2005.

SORENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. (2005) Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. **Seminars in Immunopathology**. v. 27, n. 3, pp. 299–319, 2005.

SOUSA, L. M. A.; CARNEIRO, M. B. H.; RESENDE, M. E.; MARTINS, L. S.; SANTOS, L. M.; VAZ, L. G.; MELLO, P. S.; MOSSER, D. M.; OLIVEIRA, M. A. P.; VIEIRA, L. Q. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Parasite Immunology**. v. 36, pp. 13-31, 2014.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca²⁺ 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, n. 27, pp. 25120–32, 2003.

SUNDAR, D.; PAI, K.; KUMAR, R.; PATHAK-TRIPATHI, K.; GAM, A. A.; RAY, M.; KENNEY, R. T. Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 65, n. 3, pp. 193-96, 2001.

THAKUR, C. P.; DEDET, J. P.; NARAIN, S.; PRATLONG, F. *Leishmania* species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 95, n. 2, pp. 187-189, 2001.

TURNER, K. G.; VACCHINA, P.; ROBLES-MURGUIA, M.; WADSWORTH, M.; MCDOWELL, M.; MORALES, M. A. Fitness and Phenotypic Characterization of Miltefosine-Resistant *Leishmania major*. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 9, n. 7, pp. e0003948, 2015.

VANAERSCHOT, M.; MAES, I.; OUKAD, M.; ADAUI, V.; MAES, L.; DONCKER, S.; RIJAL, S.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J.; DECUYPERE, S. Linking *in vitro* and *in vivo* survival of clinical *Leishmania donovani* strains. **Plos one**. v. 5, n. 8, pp. e12211, 2010.

VANAERSCHOT, M.; DONCKER, S.; RIJAL, S.; MAES, L.; DUJARDIN, J.; DECUYPERE, S. Antimonial resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased in vivo parasite burden. **Plos one**. v. 6, n. 8, pp. e23120, 2011.

VANAERSCHOT, M.; DECUYPERE, S.; BERG, M.; ROY, S.; DUJARDIN, J. C. Drug-resistant microorganisms with a higher fitness—can medicines boost pathogens?. **Critical reviews in microbiology**. v. 39, n. 4, pp. 384-94, 2013.

VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, n. 2, pp. 309-322, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp. invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**. v. 8, pp. 297-318, 2002.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MÜELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 173, pp. 6521-6525, 2004.

VIANNA, G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. **Congresso Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, vol. 4, pp. 426–28, 1912.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniases**. 2010. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. 202p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf> Acesso em: 02/01/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis Burden distribution**. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1>. Acesso em: 24/12/2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media centre. Leishmaniasis**. 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em: 22/12/2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Clinical forms of the leishmaniases.** 2016b. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniases/en/index2.html> Acesso em: 22/12/2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update.** 2016c. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf> Acesso em: 24/12/2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. 2016d. **World Health Organization Geneva.** v. 91, n. 22, pp. 285-96, 2016.

ZAGHLOUL, I. Y.; AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** v. 98, pp. 793-800, 2004.

ZERPA O, ULRICH M, BLANCO B, POLEGRE M, AVILA A, MATOS N, MENDOZA I, PRATLONG F, RAVEL C, CONVIT J. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. **Britanic Journal of Dermatology.** v. 156, pp. 1328–1335, 2007.

Anexos

ANEXO A – Cerditão de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Súde da Universidade Federal da Paraíba (CEP/CSS/UFPB)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 9ª Reunião realizada no dia 20/10/2016, o Projeto de pesquisa intitulado: **“INVESTIGAÇÃO SOBRE UMA POSSÍVEL CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA A ANTIMONIAIS E VIRULÊNCIA EM LESHMANIA BRAZILIENSIS”**, da pesquisadora Laisa Vilar Cordeiro. Prot. nº 0468/16. CAAE: 58591416.5.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do relatório final do estudo proposto à apreciação do Comitê.

Andréa M. C. Lima
Andréa Mécia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117910
Secretária de CEP-CSS-UFPB

ANEXO B – Certidão de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Investigação sobre a correlação entre os parâmetros de resistência a antimoniais e virulência em *Leishmania braziliensi*”, protocolo nº 183/2015 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Márcia Rosa de Oliveira – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2015 a 2017
Espécie/linhagem	Camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	120 animais
Idade/Peso	8 semanas/ 30 g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Islania Giselia Albuquerque
 Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
 Coordenadora da CEUA-UFPB

Prof. Dr. Isabela G. A. Gonçalves
 Coordenadora CEUA-UFPB
 SIAPE: 3386301