



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



DAIANA KARLA GOMES FRADE

**O IMPACTO DA RESISTÊNCIA AO ANTIMONIAL TRIVALENTE NA BIOLOGIA
E RESISTÊNCIA À LISE PELO COMPLEMENTO EM *Leishmania (Leishmania)*
*amazonensis***

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

João Pessoa – PB

2016



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



DAIANA KARLA GOMES FRADE

**O IMPACTO DA RESISTÊNCIA AO ANTIMONIAL TRIVALENTE NA BIOLOGIA
E RESISTÊNCIA À LISE PELO COMPLEMENTO EM *Leishmania (Leishmania)*
*amazonensis***

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: Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira

João Pessoa – PB

2016



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



DAIANA KARLA GOMES FRADE

Dissertação de Mestrado avaliada em 02/ 03/ 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
 Paraíba – Orientadora

Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira

Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Morfologia – Universidade Federal da
 Paraíba – Examinadora Externa

Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
 Paraíba – Examinadora Interna

Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
 Paraíba – Suplente Externo

Prof. Dr. Juscelio Donizete Cardoso

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
 Paraíba – Suplente Interno

A meus pais,
Antonia Silene Gomes Frade e
José Frade

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar
seria menor se lhe faltasse uma gota.
(Madre Teresa de Calcutá)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por guiar minhas escolhas, especialmente nos momentos de dificuldades.

Agradeço de forma especial a meus pais José Frade e Silene Frade, meus incentivadores eternos, e a meus irmãos Rosimira e Luciano, que sempre acreditaram em mim e me ajudaram muito para que eu chegasse até aqui, me dando muito amor e carinho. Sei que posso contar com vocês sempre que necessário.

A meu namorado Erick Silva, pelo amor, estímulo e força, pelas palavras de incentivo imprescindíveis, sempre acreditando em mim e ficando ao meu lado. Sem ele nada disso seria possível!

À Márcia Rosa de Oliveira, por tudo que aprendi no laboratório ao longo do mestrado, pelo auxílio, paciência respeito e dedicação. Jamais esquecerei a oportunidade que me dera.

A minhas amigas do laboratório, Mayara, Vanessa, Patrícia e Laísa, pela convivência, pelos momentos agradáveis, de apoio, de conversas, brincadeiras, paciência e pela força. Agradeço também a todos os colegas da turma do mestrado, pelas discussões e contribuições para o aprendizado durante as aulas e seminários, em especial à Sâmia, também pela amizade.

Um agradecimento especial ao Klinger, que me ajudou em muitos momentos durante o mestrado, pela amizade, companheirismo, auxílio nos experimentos, pela paciência e incentivo.

A todos os professores do mestrado pela indiscutível contribuição para minha formação.

A Rosângela e Bosco, pelo auxílio prestado em cada dia de trabalho no laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E aos demais que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação acadêmica.

RESUMO

A droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil é um antimonial pentavalente, considerado uma pró-droga por ser convertido na forma trivalente (SbIII) durante o tratamento, o qual apresenta várias limitações, incluindo o crescente surgimento de parasitos resistentes. Buscando compreender os efeitos desta resistência em *Leishmania (L.) amazonensis*, formas promastigotas foram cultivadas em concentrações crescentes de SbIII e selecionados dois mutantes, SbIII 1 e SbIII 2, que adquiriram, respectivamente, um nível de resistência 15,8 e 22,5 vezes maior que o apresentado pelas culturas selvagens. A análise morfológica mostrou diferenças significativas no tamanho e formato dos mutantes em relação ao tipo selvagem, visto que estas apresentaram corpo celular alongado, delgado e com flagelo longo, enquanto que a maioria dos mutantes, com um nível de resistência 6,42 (SbIII 1) e 5,62 (SbIII 2) vezes maior, apresentaram um corpo celular arredondado, com flagelo alongado. Curiosamente, quando os mutantes adquiriram um nível de resistência 15,8 (SbIII 1) e 22,5 (SbIII 2) vezes maior, esta diferença morfológica diminuiu. O fenótipo de resistência ao SbIII se manifestou também nas formas amastigotas axênicas derivadas dos dois mutantes. O mutante SbIII 2 apresentou um perfil de resistência mais estável que o SbIII 1 quando cultivado na ausência da droga, o que pode indicar diferenças nos mecanismos de resistência. Não foi observada resistência cruzada com o fármaco Anfotericina B. As formas promastigotas dos dois mutantes mostraram-se significativamente mais resistentes à lise pelo sistema complemento, comparado aos selvagens, sugerindo que os parâmetros resistência a antimoniais e virulência podem estar correlacionados em *Leishmania (L.) amazonensis*.

Palavras chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Resistência. Antimonial trivalente. Lise pelo complemento.

ABSTRACT

The first-line drugs in Brazil for leishmaniasis treatment is the pentavalent antimonial, considered a prodrug because it is converted in trivalent (SbIII) during the treatment which presents many limitations, including the rising of the resistant parasite. Seeking to understand of these resistance effects in *Leishmania (L.) amazonensis*, promastigotes forms were cultured in growing concentrations of SbIII then 2 mutants were selected, SbIII 1 and SbIII2 that gain resistance, respectively, 15,8 and 22,5 times bigger than wild cultures'. The morphological analysis show significant differences in mutant's form and size when compared with the wild ones, once it has a long and slender cell body and with a long flagellum, while the majority mutants, with a resistance level 6,42 (SbIII 1) and 5,62 (SbIII 2) times bigger, presented a rounded cell body, with long flagellum. Curiously, when the mutants obtain a resistance level 15,8 (SbIII 1) e 22,5 (SbIII 2) times bigger, the morphological difference diminishes. The resistance phenotype to the SbIII manifested itself also in the amastigote like derived of both mutants. The SbIII 2 mutant presented a more stable profile of resistance than SbIII 1 one's when cultured in the absence of the drug, which denote differences in the resistance mechanism. There was not observed cross-resistance to Amphotericin B. The promastigote forms of both mutants showed themselves significantly more resistant to lysis through the complement system, compared to the wild one's, suggesting that the parameter to the resistance to the antimonials and virulence might be correlated in *Leishmania (L.) amazonensis*.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Resistance. Trivalent antimonial. Lysis by complement.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – *ATP-binding cassette*

Fator B – Serina protease

Fator P – Properdina

GP63 – Glicoproteína de 63 KDaltons

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% do crescimento

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

LPG – Lipofosfoglicano

MAC – Complexo de Ataque à Membrana

PgpA – *P-glycoprotein A*

PBS – Tampão fosfato salino

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SbV – Antimônio pentavalente

SbIII – Antimônio trivalente

SBF – Soro bovino fetal

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico do parasito do gênero <i>Leishmania</i>	19
Figura 2 – Insetos vetores das diferentes espécies do gênero <i>Leishmania</i>	20
Figura 3 – Principais formas celulares dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	21
Figura 4 – Fases de desenvolvimento de <i>Leishmania</i> spp. no trato gastrointestinal do inseto vetor.....	23
Figura 5 – Entrada e ação do antimonial pentavalente na forma amastigota de <i>Leishmania</i>	27
Figura 6 – Interação dos promastigotas de <i>Leishmania</i> com os componentes do complemento e com o macrófago.....	34
Figura 7 – Formas promastigotas no segundo (fase logarítmica) e no quinto dia (fase estacionária) de cultivo.....	47
Figura 8 – Morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII e meio de cultura.....	54
Figura 9 – Morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII em meio de cultura.....	55
Figura 10 – Formas promastigotas das culturas selvagens e dos mutantes SbIII 1 e SbIII 2 após o décimo nono repique sem o antimônio trivalente.....	57
Figura 11 – Formas amastigotas axênicas das culturas resistentes ao SbIII em comparação com as culturas selvagens.....	59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Níveis de resistência ao SbIII de diferentes culturas de *L. amazonensis* selecionadas após a exposição a crescentes concentrações do antimônio.....52
- Tabela 2** – IC₅₀ das culturas resistentes em comparação com a cultura selvagem cultivadas sem a presença do SbIII.....56
- Tabela 3** – Sensibilidade de formas promastigotas em fase logarítmica e estacionária de crescimento à ação do Sistema Complemento presente em soro humano.....62
- Tabela 4** – Porcentagem de sobrevivência dos promastigotas dos mutantes e da cultura selvagem à ação do Sistema Complemento presente em soro humano.....63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	46
Gráfico 2 – Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (SbIII) em <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	48
Gráfico 3 – Atividade antipromastigota da Anfotericina B em <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	49
Gráfico 4 – Porcentagem de inibição da droga em formas amastigotas axênicas dos mutantes SbIII 1 e SbIII 2 em comparação com a cultura selvagem.....	60
Gráfico 5 – Atividade antipromastigota da Anfotericina B em uma cultura selvagem e em mutantes de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia e formas clínicas das leishmanioses.....	17
1.2 Ciclo biológico e metaciclogênese.....	19
1.3 Tratamento das leishmanioses.....	23
1.4 Resistência aos antimoniais e virulência do parasita.....	25
1.5 O Sistema Complemento.....	27
1.5.1 Via Alternativa.....	28
1.5.2 Via Clássica.....	29
1.5.3 Via das Lectinas.....	30
1.5.4 Funções Biológicas do Sistema Complemento.....	31
1.5.5 Papel do Sistema Complemento na infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	32
2 OBJETIVOS	36
2.1 Geral	36
2.2 Específicos	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Parasitos e manutenção das culturas <i>in vitro</i>.....	38
3.2 Curva de crescimento de <i>L. (L.) amazonensis</i>.....	38
3.3 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC₅₀)	39
3.4 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente.....	39

3.5 Análise da morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII.....	40
3.6 Análise da estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio dos mutantes de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....	40
3.7 Obtenção das formas amastigotas axênicas.....	40
3.8 Avaliação da atividade anti-<i>Leishmania</i> do antimonial trivalente sobre formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....	41
3.9 Teste de lise pelo sistema complemento.....	41
3.9.1 Obtenção de soro a partir de sangue humano.....	41
3.9.2 Sensibilidade dos mutantes de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao SbIII à lise pelo complemento.....	42
3.10 Análise de resistência múltipla às drogas.....	42
3.11 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Perfil de crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....	45
4.2 Sensibilidade das formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> ao SbIII e à Anfotericina B.....	47
4.3 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente.....	50
4.4 Morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII.....	53
4.5 Estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio dos mutantes de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....	55
4.6 Análise da transferência de resistência da forma promastigota para a forma amastigota.....	58

4.6.1 Transformação de promastigotas em amastigotas axênicas.....	58
4.6.2 Sensibilidade das formas amastigotas axênicas ao SbIII.....	59
4.7 Análise da correlação entre resistência ao SbIII e resistência à lise pelo complemento.....	61
4.7.1 Padronização do ensaio de lise pelo sistema complemento.....	61
4.7.2 Sensibilidade à lise pelo complemento de mutantes de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao SbIII.....	63
4.8 Sensibilidade à Anfotericina B dos mutantes resistentes ao SbIII.....	65
5. CONCLUSÕES.....	69
6. REFERÊNCIAS.....	71
7. ANEXO.....	82

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e formas clínicas das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários de mais de vinte espécies do gênero *Leishmania* que são patogênicas ao homem (FRAGA et al., 2010), os quais estão classificados filogeneticamente na ordem Trypanosomatidae e na classe Kinetoplastida. Os protozoários dessa família são seres unicelulares flagelados, que têm como característica principal a presença de uma mitocôndria única, o cinetoplasto, caracterizada por possuir uma grande massa de DNA mitocondrial (kDNA) (D'AVILA-LEVY et al., 2015).

Atualmente, as leishmanioses afetam aproximadamente 12 milhões de pessoas, tendo ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (BRASIL, 2014), sendo endêmicas em 88 países (WHO/TDR, 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as seis maiores doenças tropicais presentes nos países em desenvolvimento, por possuírem altos índices de morbidade e mortalidade.

A incidência anual das leishmanioses é de cerca de 1,3 milhões de novos casos, tendo como estimativa de 20.000 a 30.000 mortes ocorrendo anualmente (WHO/TDR, 2015). No Brasil, no período de 2000 a 2013, foram notificados 24.694 casos anuais de leishmaniose tegumentar e, atualmente, as leishmanioses estão registradas todos os estados, apresentando transmissão autóctone em cerca de 1.684 municípios em 2013 (BRASIL, 2015).

As leishmanioses apresentam diferentes manifestações clínicas, relacionadas com a espécie do parasito e com a resposta imune do hospedeiro, podendo ocorrer lesões simples com cura clínica, porém podem também evoluir para formas mais graves, que podem causar a morte do indivíduo quando não tratadas. Elas são caracterizadas por duas formas principais da doença: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). A LT pode apresentar diferentes manifestações clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (GOTO; LINDOSO, 2012).

A LCL desenvolve uma única ou múltiplas lesões típicas, localizada inicialmente no local da picada, onde ocorreu a inoculação dos parasitos, apresentando úlcera de borda elevada e fundo granuloso, de crescimento lento. Na LD ocorre o desenvolvimento de uma lesão única, que posteriormente ocorre uma disseminação hematogênica ou linfática, que

promove o aparecimento de múltiplas lesões não ulceradas por toda a pele, encontradas principalmente em pacientes imunodeprimidos. Essas formas clínicas são provocadas especialmente pelas espécies *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni* e *L. (Leishmania) amazonensis* (MURBACK et al., 2011).

A LCD é causada principalmente por *L. (L.) amazonensis*. Embora seja uma forma rara de leishmaniose tegumentar, é um tipo bastante grave da doença, sendo caracterizada por apresentar uma cronicidade progressiva, com uma riqueza parasitária e um grande comprometimento dérmico. Esta doença se manifesta de forma disseminada, com lesões não ulcerativas na pele e ocorre especialmente em indivíduos com deficiência em resposta imune celular. As consequências dessa infecção são bastante graves para o paciente por conta do tipo das lesões, que são bastante severas e não cicatrizam espontaneamente, estando sujeitas a recidivas após o tratamento com drogas atualmente disponíveis (DESJEUX, 2004; COSTA et al., 2009).

A LMC caracteriza-se pelo surgimento de lesões mucosas do nariz, dos lábios e faringe, apresentando-se de forma bastante agressiva, que surge geralmente de uma lesão primária, tipicamente ulcerativa, que pode ser única ou múltipla, e possivelmente progredir em profundidade e em extensão, levando a uma destruição da região em que se encontra, tendo como principal agente etiológico a *L. (Viannia) braziliensis* (DAVID; CRAFT, 2009).

Estas infecções, portanto, representam sérios problemas de saúde no mundo, fazendo parte do grupo de doenças negligenciadas, visto que ocorrem, principalmente, em países com baixo índice sócio econômico, tal como o Brasil, e não despertam interesse das indústrias farmacêuticas para que sejam utilizados medicamentos mais eficientes para o tratamento destas enfermidades. Entre as doenças negligenciadas clássicas, as leishmanioses têm um grande impacto, tanto na magnitude da morbidade e mortalidade a ela associados, como também por sua ampla distribuição geográfica (WHO, 2015).

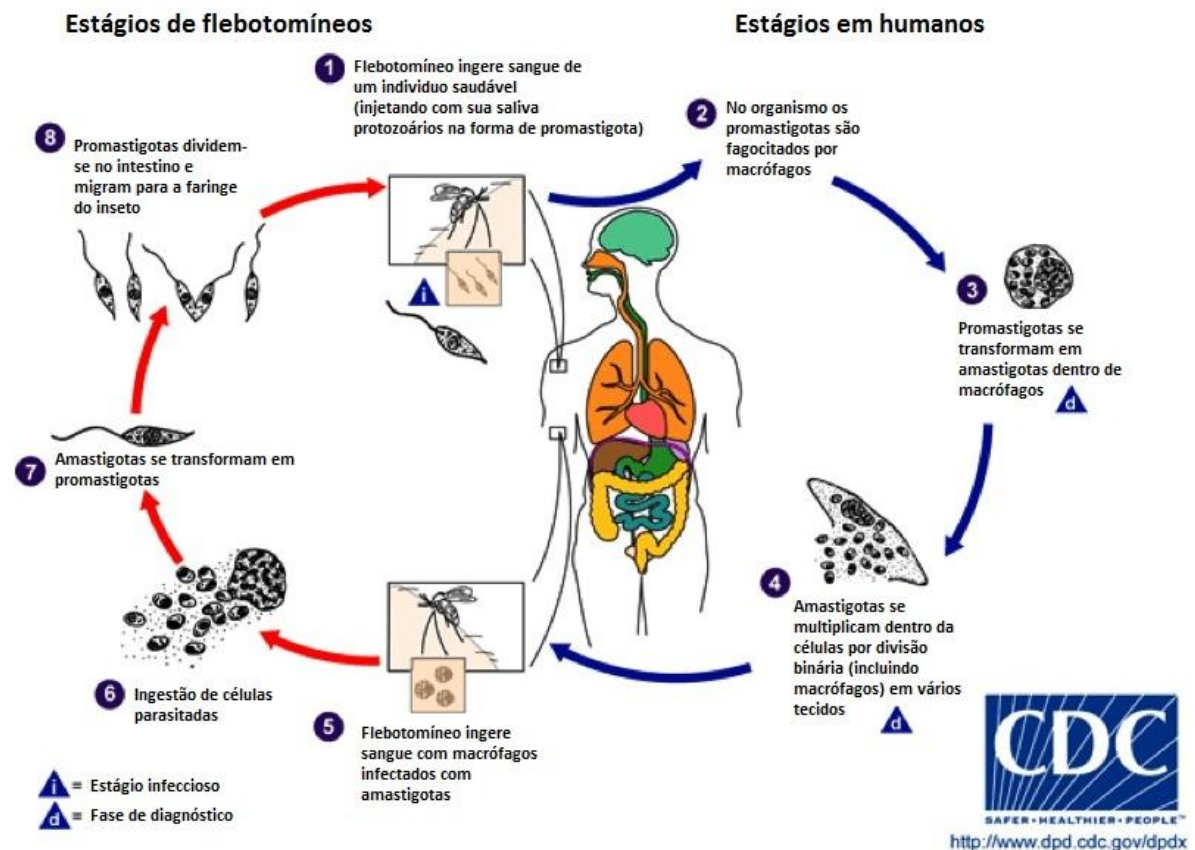
As drogas atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses são muito tóxicas, sendo que a busca por novos medicamentos altamente necessária, para que hajam tratamentos mais eficazes e menos tóxicos para os pacientes (FEASEY et al., 2010).

1.2 Ciclo biológico do parasito e metaciclogênese

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida heteroxênico (**Figura 1**), onde há alternância entre dois estágios morfológicos, as formas amastigotas, presentes no

hospedeiro vertebrado (mamíferos) e as formas promastigotas, presentes no hospedeiro invertebrado (inseto vetor) (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

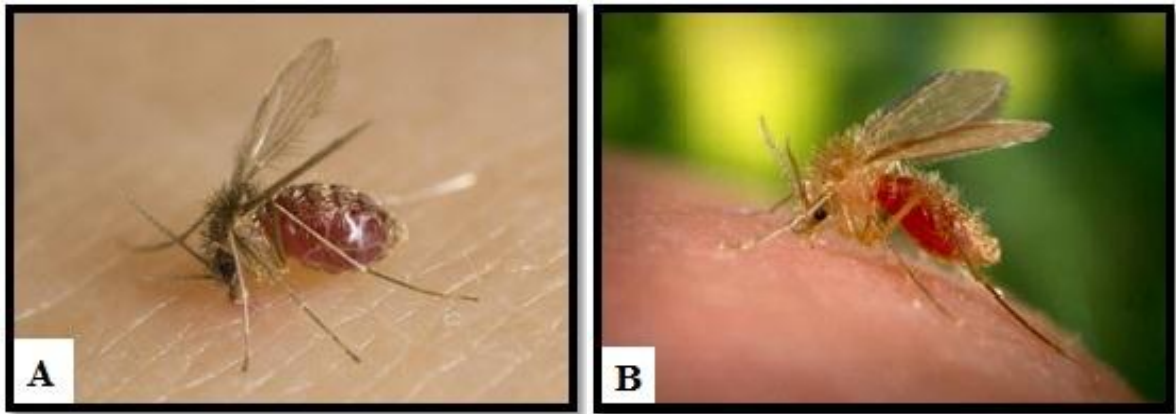
Figura 1: Ciclo biológico do parasito do gênero *Leishmania*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. 2015.

Os insetos vetores de *Leishmania* spp. são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Na família Psychodidae, cerca de 900 espécies foram descritas (READY, 2013). Dois gêneros específicos se destacam, que são os gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (KAMHAWI, 2006) (**Figura 2**). Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas, em que no momento da picada regurgitam os parasitos na derme do hospedeiro vertebrado, juntamente com a sua saliva, facilitando o processo de infecção do parasito (GOMES; OLIVEIRA, 2012).

Figura 2: Insetos vetores das diferentes espécies do gênero *Leishmania*.

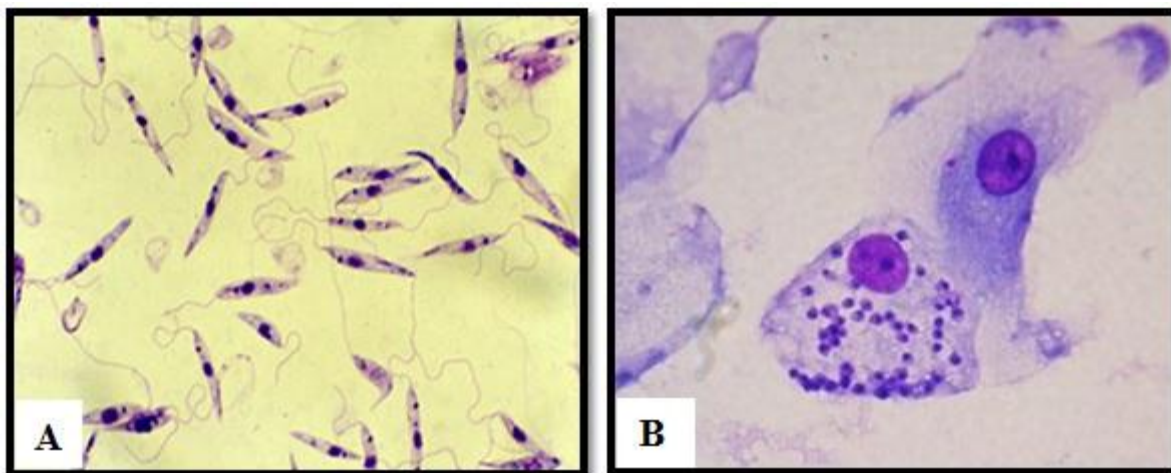


Fonte: Vector base. Disponível em: <www.vectorbase.org>. 2015. (A) *Lutzomyia longipalpis*. (B) *Phlebotomus papatasi*.

A forma amastigota, encontrada nos hospedeiros mamíferos, que não possuem flagelo, são arredondadas e imóveis, que se multiplicam obrigatoriamente dentro de células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente em macrófagos. Por outro lado, as formas promastigotas presentes no interior do trato digestivo de flebotomíneos, vivem em um meio extracelular (**Figura 3**) (KILLICK-KENDRICK; MOLINEUX, 1981). No inseto vetor, as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, que posteriormente se diferenciam em promastigotas metacíclicas, quando então podem ser novamente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada do inseto, reiniciando o ciclo (ARRUDA, 2010).

No interior do inseto vetor a diferenciação de formas promastigotas procíclicas em metacíclicas é um processo natural denominado metaciclogênese. Contudo, este processo pode ser reproduzido *in vitro* por crescimento das formas promastigotas do parasita em meio de cultura onde é verificada uma fase logarítmica de crescimento seguida de uma fase estacionária. As culturas em fase logarítmica são as formas promastigotas procíclicas e as em fase estacionária as metacíclicas, tendo como principais estímulos para esta diferenciação a acidificação do meio de cultura e a escassez de nutrientes, que normalmente se estabelece na fase estacionária do crescimento (BATES; TETLEY, 1993).

Figura 3: Principais formas celulares dos parasitos do gênero *Leishmania*.



Fonte: Fundação Oswaldo Cruz. <www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32>. 2015. (A) Formas promastigotas; (B) Formas amastigotas (aumento 1000x).

Durante o processo natural de metaciclogênese as promastigotas procíclicas passam por uma série de mudanças no tubo digestivo do inseto, resultantes de alterações na expressão gênica, envolvendo, dentre outras, alterações em moléculas na superfície que as transformam em promastigotas metacíclicas, as quais são as formas mais virulentas do parasito (SOARES et al., 2004). Dentre as modificações, são observadas alterações quantitativas e qualitativas nos carboidratos que compõem os lipofosfoglicanos que revestem a superfície do parasito, bem como um aumento na expressão da glicoproteína de superfície gp63. Estas alterações são fundamentais para uma adequada internalização e sobrevivência dos parasitos no interior dos macrófagos (PUENTES et al., 1989; BRITTINGHAM et al., 1995). As promastigotas resultantes deste processo são as metacíclicas que não mais realizam divisão celular. Durante um novo repasto sanguíneo, o inseto vetor pode então transmitir as formas infectivas a outro hospedeiro e assim dar continuidade ao ciclo de vida destes parasitos.

Logo após a picada do inseto e consequente inoculação das formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro mamífero, existirá um breve momento extracelular do parasita na corrente sanguínea em que o mesmo estará sujeito à lise pelo complemento. Este mecanismo da resposta imune inata é responsável por eliminar grande parte dos parasitos, exceto as formas promastigotas que conseguem evitar a lise pelo complemento (DOMINGUEZ et al., 2002). Franke e colaboradores (1985) demonstraram que promastigotas em fase estacionária (metacíclicas) de *L. panamensis* e *L. donovani* apresentaram-se mais resistentes à lise pelo complemento do que em promastigotas em fase logarítmica de crescimento (procíclicas),

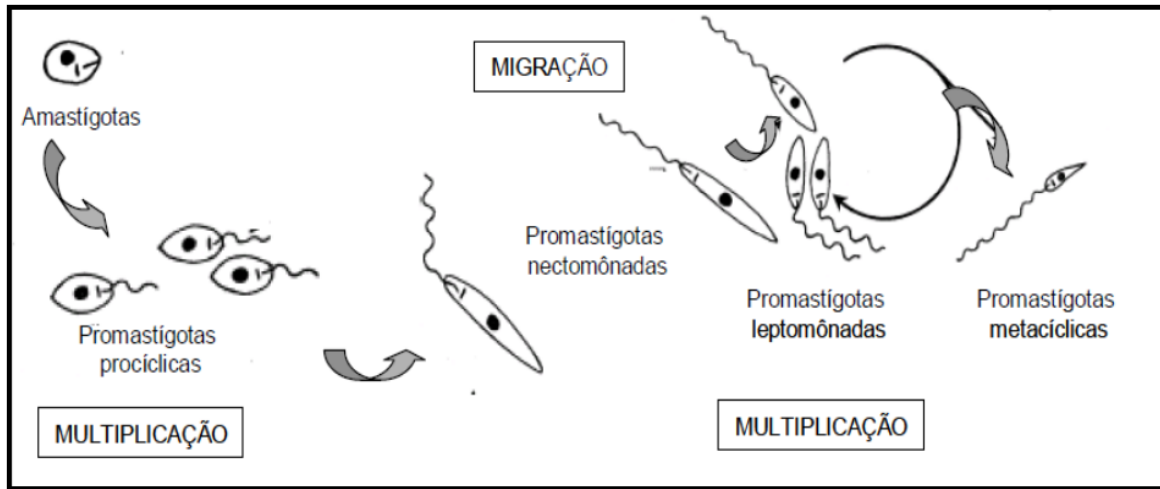
indicando que a metaciclogênese é um processo preponderante para a resistência dos parasitos à lise pelo complemento.

Por conta da agressão que é causada no momento em que o inseto realiza o repasto sanguíneo, além da ação do sistema complemento, as células responsáveis pela defesa do hospedeiro montam um mecanismo que promove a fagocitose do parasita pelas células fagocíticas do sistema imunológico, especialmente neutrófilos e macrófagos (SILVEIRA et al., 2009). As primeiras células a migrar para o local da infecção são principalmente os neutrófilos. Desse modo, os neutrófilos fagocitam o parasito, posteriormente sofrem apoptose, e estes corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos. Nesse contexto, neutrófilos e macrófagos são capazes de fagocitar as células do parasito *Leishmania*, porém apenas o macrófago é quem possui as condições necessárias para a sobrevivência e diferenciação do parasito (JOCHIM; TEIXEIRA, 2009). No interior do macrófago, ocorre a diferenciação da forma promastigota em amastigota, não flagelada, dentro de um compartimento intracelular ácido denominado fagolisossomo. Neste local, o parasito pode encontrar as condições favoráveis para sua multiplicação por divisão binária (BURCHMORE; BARRETT, 2001). Quando a quantidade de parasitos intracelulares excede a capacidade de suporte das células fagocíticas, ocorre a lise celular e as formas amastigotas liberadas na corrente sanguínea podem infectar outros fagócitos.

Durante a metaciclogênese no interior do inseto além das formas promastigotas procíclicas e metacíclicas, pequenas alterações são observadas na morfologia dos parasitos, sendo que os estágios intermediários podem receber outras denominações. Segundo alguns relatos, as formas promastigotas procíclicas se diferenciam em formas promastigotas nectomonadas, as quais migram do trato digestivo posterior para o anterior do inseto vetor. Posteriormente, ocorre a diferenciação em promastigotas leptomonadas, que por sua vez multiplicam-se e dão origem as formas promastigotas metacíclicas, que são consideradas infectivas, completando o ciclo (GOSSAGE et al., 2003; BATES; ROGERS, 2007), como pode ser observado na Figura 4.

A infecção humana por *Leishmania* spp. pode causar uma variedade de manifestações clínicas, cuja evolução depende da espécie do parasita, como também da genética do hospedeiro e fatores ambientais que poderão influenciar na capacidade do indivíduo em montar uma resposta imunológica que seja adequada para o controle da infecção (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

Figura 4: Fases de desenvolvimento de *Leishmania* spp. no trato gastrointestinal do inseto vetor.



Fonte: Adaptado de Gossage et al., 2003.

1.3 Tratamento das leishmanioses

Embora hoje se tenha um notável progresso nos estudos de biologia molecular, da fisiologia e da bioquímica das mais diversas espécies de *Leishmania*, ainda há uma ausência de vacinas e programas com maior eficácia para o controle dos vetores.

Pelo fato de não haver uma vacina anti-*Leishmania* em uso clínico, o controle das diversas formas da doença se baseia quase que exclusivamente na quimioterapia. A droga de primeira escolha no Brasil para o tratamento humano são os antimoniais pentavalentes (SbV), na forma de antimoniato de N-meglumina (Glucantime), que são utilizados há mais de meio século como uma droga de primeira linha (FRÉZARD et al., 2009). Este antimonial é comumente a droga de primeira escolha indicada para o tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, contudo existem diversos relatos de falhas nesta terapêutica devido ao aparecimento de parasitos resistentes aos antimoniais (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Esta droga apresenta também outras limitações, incluindo a administração parenteral e a sua alta toxicidade, resultando em vários efeitos colaterais (THAKUR et al., 2001).

Ainda não está claro o mecanismo de ação dos antimoniais utilizados no tratamento das leishmanioses, porém acredita-se que o antimonial pentavalente atua como uma pró-droga, que precisa ser reduzida biologicamente a antimonial trivalente para que esta tenha atividade anti-*Leishmania* mais efetiva. No entanto, ainda não está esclarecido o local em que ocorre a redução, porém estudos mostram que ela pode ocorrer na forma amastigota

(SHAKED-MISHANT et al., 2001) ou no macrófago (HANSEN et al., 2011). Quanto ao mecanismo de redução, pode ser enzimático (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004) ou não enzimático (SANTOS FERREIRA et al., 2003). A atividade anti-*Leishmania* desta droga ocorre provavelmente por inibição da biossíntese de macromoléculas, por meio do desequilíbrio do metabolismo energético da célula, por conta da inibição da glicólise e β -oxidação de ácidos graxos (BERMAN; GALLALEE; BEST, 1987), entretanto os mecanismos envolvidos nesta via ainda não foram totalmente elucidados.

Em casos de resistência aos antimoniais ou quando não se obtém resposta ao tratamento, a Anfotericina B e a Pentamidina são as drogas de segunda escolha no Brasil.

A Anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico, que vem sendo utilizado para o tratamento da doença desde 1960. A seletividade desta droga ocorre devido a maior afinidade da Anfotericina B ao ergosterol, que é o principal esterol da membrana celular do parasito. Quando ocorre a interação com o ergosterol da membrana celular, ocorre a formação de poros que alteram o balanço iônico e a permeabilidade da célula, provocando a morte da mesma. Esta droga é considerada mais eficaz no tratamento de lesões mucosas, porém também apresenta uma alta toxicidade, baixa tolerância e pode selecionar parasitos resistentes (MISHRA et al., 1992).

A Pentamidina é uma diamidina aromática, que tem sido usada contra um grande número de protozoários patogênicos, incluindo espécies de *Leishmania*, e vem sendo utilizada no tratamento das leishmanioses como segunda escolha (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Os mecanismos de ação anti-*Leishmania* da Pentamidina ainda não estão totalmente esclarecidos, mas sabe-se que ela interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas em sítios de ligação aos ácidos nucleicos, bem como também pode ligar-se ao DNA do cinetoplasto. Desse modo, a mitocôndria é um importante alvo da droga, estando envolvida na ligação e desintegração de DNA do cinetoplasto do parasito (BASSELIN et al., 2002; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Enzimas topoisomerases estão envolvidas na modulação do DNA nuclear e do cinetoplasto (kDNA) e a Pentamidina provavelmente atua como um inibidor de topoisomerase I (JEAN-MORENO et al., 2006).

A eficácia do tratamento é um fenômeno complexo que envolve diversos fatores, como características genéticas do hospedeiro mamífero e do parasito. Fatores como espécie e virulência do parasito, assim como aquisição de mecanismos de resistência às drogas utilizadas no tratamento influenciam consideravelmente no resultado da terapêutica (YARDLEY et al., 2006).

1.4 Resistência aos antimoniais e virulência do parasito

Entre os problemas que dificultam o tratamento das leishmanioses com os antimoniais estão os diversos efeitos colaterais para o hospedeiro, bem como o desenvolvimento de resistência pelo parasito (THAKUR et al., 2001). Estes fatores confirmam o fato de que o uso de antimoniais como drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses está ameaçado em muitas partes do mundo. O surgimento de parasitos resistentes é um problema que vem se agravando, e por exemplo na Índia, a maior parte da população não responde mais ao tratamento com os antimoniais (MOHAPATRA, 2014).

Cepas resistentes para quase todas as drogas existentes podem ser obtidas em condições de laboratório. Curiosamente, os parasitos que possuem resistência a uma determinada droga podem apresentar um aumento na virulência, como vem sendo estudado em *Leishmania* spp., o que apoia a ideia de que existe uma relação entre virulência e resistência a drogas neste parasito (GAGANDEEP; BHAWANA, 2014). Desse modo, alguns trabalhos têm sido realizados a fim esclarecer esta possível associação entre a resistência aos medicamentos com a virulência do parasito e embasar cientificamente esta hipótese.

As espécies do gênero *Leishmania* são parasitos altamente adaptáveis e, por este motivo, não é difícil acreditar que eles possam desenvolver, dentre outros mecanismos de defesa, a resistência aos medicamentos, sem, entretanto, pagar um custo adaptativo em troca. Em um estudo relacionando a resistência ao antimônio durante a metaciclologênese em *L. donovani*, foi estabelecido que a capacidade de diferenciação de formas procíclicas para metacíclicas foi significativamente maior em promastigotas resistentes ao antimônio quando comparado a células sensíveis (AIT-OUAKAD et al., 2011).

Estudos de isolados clínicos obtidos a partir de cepas de *L. donovani* de pacientes nepaleses e indianos mostrou que as células resistentes continham um número maior de metacíclicos, bem como eram mais resistentes à lise mediada pelo complemento (OUAKAD et al., 2011). Outros estudos também realizados com *L. donovani*, mostraram que os parasitos resistentes tiveram a capacidade de atingir uma densidade parasitária mais elevada e possuíam maior capacidade de infecção *in vivo* do que em células sensíveis (VANAERSCHOT et al., 2010; VANAERSCHOT et al., 2011).

O processo de resistência aos antimoniais consiste na diminuição de sensibilidade à droga devido a uma redução da sua eficácia contra uma população de parasitos, os quais eram previamente sensíveis ao composto (NATERA et al., 2007).

Um fenômeno que está associado com resistência a drogas é a amplificação gênica, que ocorre em alguns microrganismos (GRONDIN et al., 1993), bem como em *Leishmania* spp., sendo um fator muito importante para a resistência a uma determinada droga, especialmente em processos de indução de resistência *in vitro* (BEVERLEY, 1991; BORST; OUELLETTE, 1995).

Entre os mecanismos de resistência induzida pelo uso de antimoniais está a amplificação do gene que codifica um transportador do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), que é uma família de proteínas bastante conservadas evolutivamente, responsável pela extrusão da droga em organismos eucariotos (HAIMEUR; OUELLETTE, 1998; DASSA; BOUIGE, 2001), que representa um conjunto de proteínas envolvidas na resistência a drogas por meio do efluxo ou do sequestro da droga (GROS; BUSCHMAN, 1993).

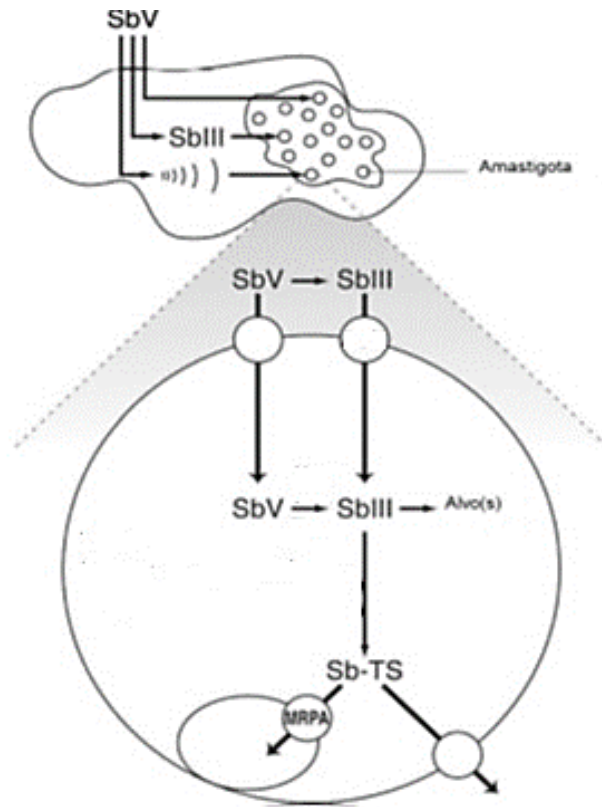
A amplificação gênica extracromossomal é um mecanismo bastante comum em *Leishmania* spp., sendo este um mecanismo que pode levar a uma superexpressão de genes resistentes à uma determinada droga. Isso pode explicar, em parte, o fato de que muitos genes de transportadores ABC tenham sido observados em parasitos resistentes de maneira amplificada (GRONDIN et al., 1996). Alguns pesquisadores demonstraram que o gene *mrpa* é responsável por conferir resistência dos parasitos ao SbV e ao SbIII (EL FADILI et al., 2005), e que o mesmo está amplificado em isolados clínicos de pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais (MUKHERJEE et al., 2007).

Vários estudos mostraram que o gene *mrpa*, formalmente conhecido como PgpA (*P-glycoprotein A*), um membro dos transportadores ABC, está amplificado em linhagens de *Leishmania* resistentes (CALLAHAN; BEVERLEY, 1991; OUELLETTE; BORST, 1991). Em *Leishmania tarentolae*, a primeira proteína ABC identificada foi a PgpA (OUELLETTE et al., 1990), a qual é um membro da subfamília ABCC, que pode conferir resistência do parasito aos antimoniais. Estes receptores têm sido associados com resistência a drogas em várias doenças, porém mais estudos são necessários para entender a identidade da bomba de efluxo dos parasitos resistentes e o seu papel na resistência aos antimoniais, contudo, estudos identificaram o gene PgpA tem o papel de sequestrar a droga em um compartimento intracelular em *Leishmania* (MOREIRA et al., 2013).

Na Figura 5 estão representadas as possíveis formas de entrada do antimonial pentavalente e trivalente na forma amastigota, bem como a atuação do SbV como uma pró-droga, a qual pode ser convertida no interior do parasito ou na célula do hospedeiro, e ainda o mecanismo de resistência do parasito a esta droga, por meio do sequestro em um

compartimento intracelular, ou é realizada a extrusão da droga possivelmente por outro transportador.

Figura 5: Entrada e ação do antimonial pentavalente na forma amastigota de *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Ouellette et al., 2004.

Por conta do crescente aparecimento de cepas resistentes à drogas das mais diversas espécies de *Leishmania*, é evidente a necessidade de novas pesquisas a fim de compreender melhor a respeito das mudanças ocorridas no parasito que promovem os mecanismos de resistência, que podem resultar em uma maior virulência dos parasitos, sendo então necessário que se busquem novas modalidades terapêuticas com estudos em parasitos resistentes (PONTE-SUCRE, 2003).

1.5 O Sistema Complemento

O sistema complemento envolve mais de trinta proteínas que são produzidas principalmente no fígado, e estão presentes na forma inativa ou em baixo estado de ativação

no plasma sanguíneo e em superfícies celulares. Este sistema faz parte da resposta imune inata e é ativado por meio de cascatas proteolíticas, iniciadas com a identificação de molécula de superfície dos patógenos e em seguida promovem uma série de reações que mediam um potente processo inflamatório, a opsonização da superfície de patógenos e a formação de poros por meio do complexo de ataque à membrana (MAC), que provoca o influxo de água e íons e, por fim, a lise celular. Em vista disso, o complemento consiste em um dos primeiros mecanismos extracelulares responsáveis pela ação inicial de combate a organismos patogênicos (bactérias, vírus, parasitos), compreendendo um componente vital que representa um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata. Este sistema pode ser ativado por meio de três vias principais: a via alternativa, a via clássica e a via das lectinas (DUNKELBERGER; SONG, 2010).

As moléculas do sistema complemento foram primeiramente identificadas na via clássica, possuindo como nomenclatura a letra C e enumerada de acordo com a sua ordem de descoberta: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 e C9. O componente C1 possui as unidades C1q, C1r e C1s que formam a unidade de reconhecimento da via clássica, enquanto que as moléculas C2, C3 e C4 são os principais componentes que levam a formação do poro e as moléculas C5 a C9 formam o complexo de ataque a membrana (MAC) (MERLE et al., 2015).

1.5.1 Via Alternativa

A via alternativa ocorre de maneira bastante rápida para a eliminação de organismos estranhos presentes na corrente sanguínea, sendo ativada diretamente por estruturas presentes na membrana dos antígenos. Em condições fisiológicas normais no plasma ocorre a hidrólise espontânea de C3, em níveis basais, que é uma proteína do complemento bastante abundante no plasma. A hidrólise de C3 produz um análogo de C3b, o C3(H₂O), o qual na presença de certos agentes patogênicos, como fungos, bactérias, vírus e parasitos, é capaz de ligar-se a superfície desses patógenos, promovendo a ativação dessa via (GÖTZE, 1988; DUNKELBERGER; SONG, 2010). Um segundo componente, denominado Fator B (serina protease presente em estado ativado na corrente sanguínea), liga-se ao C3(H₂O) na presença de íons Mg, favorecendo a clivagem do Fator B em Bb e Ba, por meio do Fator D, formando o complexo C3(H₂O)Bb, denominado de C3 convertase da via alternativa. A geração desta enzima é crucial para o sucesso da ativação desta via. A C3 convertase cliva novas moléculas de C3 em C3a e C3b, sendo o C3b capaz de ligar-se a superfície celular dos patógenos e

associar-se ao Fator B para formar C3bBb, uma molécula lábil, porém a mesma torna-se mais estável pela associação de uma molécula de properdina (Fator P), formando a C3 convertase de amplificação da via alternativa, a qual permite a produção em elevados níveis de C3a e C3b, sendo este último responsável por associar-se em diferentes regiões na superfície do patógeno, podendo atuar como ponto de partida para novas cascatas de ativação da via, um processo chamado de “alça de amplificação” (SILVA; KIPNIS, 1984; GÖTZE, 1988; JANEWAY et al., 2005).

O componente C3b pode também ligar-se a enzima C3 convertase, formando C3bBb(C3b), denominado de C5 convertase da via alternativa. Esta nova enzima converte o componente C5 em C5a e C5b, sendo este capaz de se ligar com moléculas de C6, que se associam frouxamente a membrana celular. Em seguida, o componente C7 se associa a C5bC6, tornando-se altamente lipofílico e se insere na membrana, possuindo uma grande afinidade pelo componente C8, formando um complexo com uma capacidade limitada de promover a lise de algumas células, que somente é aumentada com a associação de pelo menos 4 moléculas de C9, que será então capaz de provocar a lise osmótica da célula. Desse modo, o componente C5b é o responsável pelo recrutamento dos componentes C6, C7, C8, e C9, culminando na formação do complexo de ataque a membrana (MAC). O componente C9 tem uma característica bastante importante que é a capacidade de formar polímeros, que é essencial para a formação do poro na membrana (PODACK; TSCHOPP, 1982; ABBAS, 2008).

1.5.2 Via Clássica

A via clássica do complemento necessita da presença de anticorpos para iniciar a cascata de ativação de suas proteínas. Ela envolve a ativação inicial do componente C1 e, posteriormente das outras proteínas do complemento, que resultarão na formação do complexo de ataque a membrana. O termo “via clássica” foi denominado por conta desta ter sido a primeira via a ser descoberta, porém atualmente está bem compreendido que a via alternativa é mais antiga, apesar de ter sido descoberta em seguida. As imunoglobulinas pré-existentes, presentes na corrente sanguínea, podem ligar-se a organismos estranhos, podendo promover uma rápida ativação do sistema complemento (ABBAS, 2008).

O primeiro componente desta via a ser ativado é o C1, o qual é um complexo molecular multimérico, formado por uma subunidade C1q (que se liga ao anticorpo), que

estabelece um complexo com duas moléculas C1r e duas moléculas C1s (serinas proteases), que formam um tetrâmero por meio de ligações dependentes de íons cálcio (ZICCARDI, 1983). A ligação do componente C1 com a região Fc das imunoglobulinas (IgM e IgG, geralmente) presentes na superfície de patógenos resulta na ativação da proteína e inicia a cascata de ativação dessa via. A ativação autocatalítica de C1r e C1s, por sua vez, promove a clivagem dos componentes C4 e C2 e, como resultado, ocorre a geração dos fragmentos C4a, C4b, C2a e C2b. O componente C4b adere-se à superfície da membrana, o qual associa-se ao C2a, formando dessa forma o C4bC2a na membrana do patógeno, denominado de C3 convertase, uma enzima que, por sua vez, possui a capacidade de clivar o componente C3 em dois fragmentos denominados C3a e C3b, que tem a função de anafilatoxina e de opsonina, respectivamente (JANEWAY et al., 2005; DUNKELBERGER; SONG, 2010). Em seguida, C3b se liga a C3 convertase, formando um complexo denominado C5 convertase, capaz de realizar a clivagem de C5 em C5a e C5b. O C5b é responsável de recrutar os outros componentes do complemento C6, C7, C8 e C9, que polimeriza para formar o MAC (MERLE et al., 2015).

1.5.3 Via das Lectinas

A via das lectinas funciona de maneira bastante semelhante a via clássica, porém independente de imunoglobulinas. Enquanto que a via clássica necessita do reconhecimento inicial de patógenos por meio de anticorpos, a via das lectinas inicia a sua cascata de ativação por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (JANEWAY et al., 2005), os quais são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como a lectina ligadora de manose (MBL – *Mannose binding lectin*) ou a lectinas que reconhecem a N-acetilglicosamina (ficolinas). A molécula que promove o reconhecimento de alvos mais bem caracterizada nesta via é a MBL, que inicia a ativação do complemento pelo reconhecimento de carboidratos (MATSUSHITA et al., 1996). Esta proteína possui uma estrutura similar a C1q da via clássica, a qual é associada a serino proteases MASPs (-1, -2 e -3), em que as duas primeiras são similares estruturalmente e funcionalmente, mas não idênticas, a C1r e C1s, que são ativadas pela ligação a superfície de patógenos e MASP-3 também influencia na ativação desta via (MERLE et al., 2015). Em condições fisiológicas, MASP-1 é necessário para a ativação de MASP-2 e as duas serino proteases ativadas podem clivar o componente C2, ao passo que MASP-2 também pode clivar C4. Desse modo, ocorre a

formação de C4bC2a (C3 convertase) na superfície do patógeno, e o restante da cascata acontece de maneira semelhante à via clássica (DUNKELBERGER; SONG, 2010).

1.5.4 Funções Biológicas do Sistema Complemento

Entre as principais funções do sistema complemento estão: promover a lise celular e a opsonização. A lise celular mediada pelo complemento é um dos principais mecanismos de defesa que confere a morte de um grande número de microrganismos extracelulares, impedindo a sua proliferação, por provocar a formação de poros nas membranas, promovendo a saída de material citoplasmático e entrada de líquido e sais para o interior da célula, o que leva ao rompimento das membranas por lise osmótica. As bactérias podem ativar o sistema complemento de acordo com as moléculas expressas em sua membrana, assim como protozoários (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Ao longo da cascata de ativação do complemento são produzidas opsoninas, que constituem outra função de grande importância, visto que as proteínas deste sistema, quando ativadas, recobrem a superfície dos microrganismos, para que estes sejam reconhecidos por células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos, que possuem receptores específicos para as moléculas do sistema complemento. As principais moléculas que promovem a opsonização são C3b e C4b, que se ligam principalmente ao receptor CR1, e C3bi, que se liga ao receptor CR3 e CR4. Quando há a interação do fragmento opsonizante com o seu receptor, pode então ocorrer a fagocitose (ABBAS, 2008).

Os componentes C3a e C5a atuam como anafilatoxinas, ou seja, são capazes de promover um aumento da permeabilidade vascular e da resposta inflamatória no local, pois se associam a receptores que induzem a liberação de histamina por basófilos (KRETZSCHMAR et al., 1993) e (EL-LATI et al., 1994). O componente C5a é o mais potente promotor da liberação da histamina, atuando também na liberação de citocinas pelos mastócitos, como fator quimiotático para neutrófilos, eosinófilos, basófilos e macrófagos, e aumentando a atividade de opsonização nos fagócitos. O componente C4a também parece possuir uma atividade de anafilatoxina, porém ainda não foi relatado nenhum receptor para este componente, o que torna difícil determinar o seu papel fisiológico, sendo necessário que se tenham mais estudos para entender se C4a é uma anafilotoxina e qual o seu mecanismo de ação (MERLE et al., 2015).

O sistema complemento ainda desempenha outras funções efetoras de grande importância para a imunidade natural e humoral específica, como opsonizar complexos antígeno-anticorpo da circulação, para que sejam posteriormente eliminados pelos fagócitos, bem como regular a resposta imune humoral, por meio da proteína C3d, gerada de C3, que permite que as células B se ativem com mais facilidade, induzindo a produção de anticorpos (DUNKELBERGER; SONG, 2010).

1.5.5 Papel do Sistema Complemento na infecção por *Leishmania* spp.

Um dos primeiros eventos ocorridos após a entrada do parasito no hospedeiro mamífero é seu contato com as proteínas presentes no plasma. O soro humano normal fresco pode causar a lise das diversas espécies de *Leishmania* spp. (PEARSON; STEIGBIGEL, 1980; FRANKE et al., 1985), principalmente por meio da via alternativa do sistema complemento (MOSSER; EDELSON, 1984; MOSSER et al., 1986; BRITTINGHAM et al., 1995), bem como podem ativar a via clássica (MOSSER et al., 1986; DOMÍNGUEZ et al., 2002). Estudos realizados com camundongos que possuíam o sistema complemento depletado, mostrou que quando infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* mostravam uma diminuição significativa da resposta inflamatória, bem como um aumento no número de parasitos, evidenciando o papel do sistema complemento no controle do número de parasitos na lesão, assim como na ativação de uma resposta inflamatória (LAURENTI et al, 2004).

No momento do repasto sanguíneo do inseto vetor, em que ocorre a entrada dos parasitos na corrente sanguínea, há uma rápida ativação do complemento e, por conta disso, os promastigotas devem montar estratégias a fim de conseguir sobreviver e estabelecer a infecção (SACKS, 1988). No entanto, a resistência das espécies de *Leishmania* aos componentes do complemento depende essencialmente da fase de desenvolvimento em que o parasito se encontra, visto que, quando os mesmos se encontram em uma fase logarítmica (formas procíclicas), *in vitro*, são mais susceptíveis à lise mediada pelo complemento em comparação com as provenientes de uma cultura em fase estacionária de crescimento (formas metacíclicas).

As formas encontradas na fase estacionária de crescimento são especialmente promastigotas metacíclicas, que resultam em várias alterações bioquímicas essenciais para sua virulência e consequente capacidade de evadir da ação do sistema complemento do hospedeiro mamífero. Puentes e colaboradores (1988), realizando estudos com *L. major*,

associaram o aumento da resistência ao complemento às modificações estruturais do lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície do parasito, isto porque esta é a molécula dominante presente na superfície dos promastigotas e é essencial para que ocorra o estabelecimento da infecção, pois ele atua na defesa do parasito em meio extracelular, impedindo a lise pelo complemento, e intracelular, tendo papel no estabelecimento da infecção no interior do macrófago (SPÄTH et al., 2003).

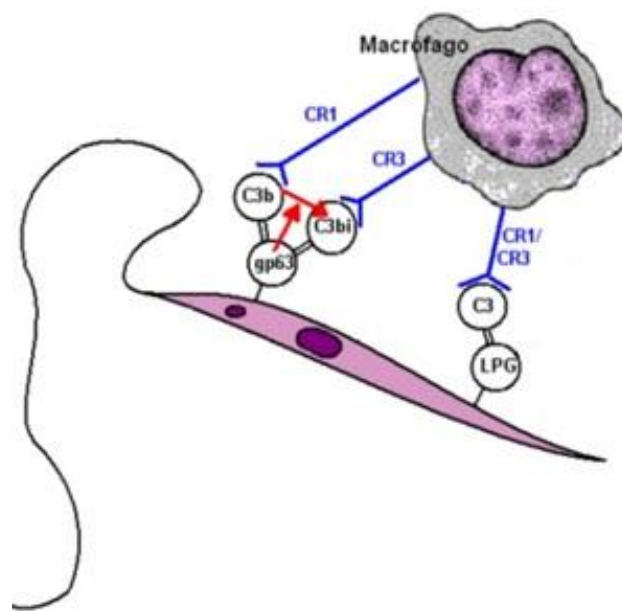
Durante a metaciclogênese é observado um aumento na espessura da camada de revestimento formada pelo LPG destes parasitos, e este aumento tem sido correlacionado a uma maior resistência das formas metacíclicas a lise pela ação do sistema complemento por, entre outras razões, dificultar o acesso e a formação do complexo de ataque à membrana, protegendo o parasito da lise (PUENTES et al., 1989). Foi demonstrado também que o LPG de superfície pode atuar retardando a maturação do fagossomo, ou seja, aumentando o tempo para que ocorra a fusão entre este e o lisossomo, e com isto, esta molécula poderia fornecer um tempo adicional para a diferenciação das promastigotas em amastigotas (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997).

Cerca de 40 proteíno-quinases são expressas na superfície do parasito, as quais apresentam-se em grande quantidade em formas metacíclicas e podem fosforilar componentes do complemento, provocando a sua inibição (NORONHA et al., 1998). Uma das moléculas mais expressas é a glicoproteína gp63, que também confere resistência das promastigotas à lise pelo complemento, visto que a expressão de gp63 parece influenciar na virulência do parasito, por meio da capacidade de promover a opsonização do parasito para ser rapidamente fagocitado (BRITTINGHAM et al., 1995). Este mecanismo de resistência ocorre pela atividade proteolítica de gp63, que é capaz de clivar C3b em C3bi, que é a forma inativa da proteína, impedindo a continuidade da cascata de ativação do complemento. Adicionalmente a C3bi formada opsoniza os parasitos, facilitando a fagocitose por provendo uma rápida internalização dos parasitos por receptores CR1 e CR3 presentes nos macrófagos. A internalização por estes receptores não promove a ativação dos macrófagos (MOSSER; BRITTINGHAM, 1997). A interação das moléculas da superfície do parasito com os componentes do complemento e o macrófago estão expressos na figura 6.

Desse modo, no momento em que os parasitos se encontram na corrente sanguínea, as formas metacíclicas conseguem impedir, por meio do LPG, a inserção dos componentes do complemento na superfície, impedindo a formação do complexo de ataque a membrana. Ainda, o gp63 permite que ocorra uma rápida fixação e clivagem do componente C3 em sua superfície, para a formação de C3bi, que promove, juntamente com o LPG, a opsonização

para a fagocitose, facilitando assim sua entrada e o estabelecimento da infecção. A interação dos receptores do macrófago com os componentes do complemento não ativam os mecanismos oxidativos microbicidas dos macrófagos, outro fator que facilita a entrada na célula (WRIGHT; SIVERSTEIN, 1983).

Figura 6: Interação dos promastigotas de *Leishmania* com os componentes do complemento e com o macrófago.



Fonte: Adaptado de Bogdan e Rölinghoff, 1998.

Existem evidências de que formas promastigotas de *L. donovani* resistentes ao antimônio são mais resistentes à lise mediada pelo complemento (OUAKAD et al., 2011) e também mais virulentas *in vivo* (VANAERSCHOT et al., 2011), sugerindo que estes dois parâmetros, resistência a drogas e virulência possam estar relacionados. Diante destas evidências e as diversas falhas com o uso de antimoniais na terapêutica das leishmanioses, é pertinente que esta possível correlação seja melhor investigada ampliando os estudos também em outras espécies de *Leishmania*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o impacto da resistência ao antimonial trivalente em aspectos da biologia e virulência de *Leishmania (L.) amazonensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar formas promastigotas resistentes ao antimônio trivalente da espécie *L. (L.) amazonensis*;
- Comparar a morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao antimônio trivalente;
- Analisar a estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio trivalente em mutantes de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Investigar a possível transferência do fenótipo de resistência ao antimônio trivalente das formas promastigotas para formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Avaliar se a resistência ao antimônio trivalente interfere na susceptibilidade à lise pelo complemento em formas promastigotas *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar se a resistência ao antimônio trivalente interfere na susceptibilidade à Anfotericina B.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos e manutenção das culturas *in vitro*

Neste trabalho foram utilizadas as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) procedentes do Banco de Culturas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram cultivadas, *in vitro*, em tubos de ensaio contendo meio líquido Schneider, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico [estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 U.I./ml)]. As células foram incubadas a 25°C e repicadas semanalmente, a fim de manter a viabilidade celular. As formas amastigotas axênicas foram obtidas por meio do cultivo das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, em meio Schneider com pH 5,5 a 32°C.

Para utilizações futuras, 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 e após 15 minutos alíquotas de 1 ml foram distribuídas em tubos apropriados para criopreservação, os quais foram mantidos em freezer a -80° e em nitrogênio líquido.

3.2 Curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis*

A fim de avaliar a cinética de crescimento do parasito e assim poder estabelecer as fases logarítmica (formas promastigotas procíclicas) e estacionária (formas promastigotas metacíclicas) da cultura, foram feitos repiques da cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* em erlenmeyer contendo meio Schneider suplementado. Estes repiques foram feitos em duplicata e partindo de um 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 a cultura alcançou sua fase estacionária de crescimento.

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

A determinação da inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foi realizada utilizando tubos de ensaio rosqueados contendo meio líquido Schneider suplementado. Nos tubos de ensaio foram adicionados 1×10^6 promastigotas/ml de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase logarítmica de crescimento, na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações das substâncias avaliadas.

As culturas de *L. (L.) amazonensis* foram avaliadas quanto à sensibilidade ao antimônio trivalente (SbIII) e a Anfotericina B (Cristália), utilizadas como drogas de referência. As drogas foram diluídas em meio Schneider suplementado, de acordo com as concentrações testadas, que foram de 2, 4, 8, 16, 32, 64 µg/mL de SbIII e 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 µg/mL de Anfotericina B.

Após 72 horas de incubação a 25°C, alíquotas das culturas foram retiradas, diluídas em solução de Isoton na proporção adequada para a quantificação, em microtubos, os quais, foram homogeneizados em agitador Vortex por aproximadamente trinta segundos. As células foram quantificadas e analisadas através da microscopia óptica comum diretamente em câmara de Neubauer. A contagem do número de parasitos/ml de cultura foi realizada utilizando a fórmula: N° de parasitos = média dos quatro (04) quadrantes x inverso da diluição da amostra x 10^4 . Alíquotas das culturas também foram colocadas em lâminas de vidro, cobertas com lamínulas e observadas quanto à morfologia em microscópio óptico.

3.4 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente (SbIII)

A seleção do parasito foi realizada de acordo com o proposto por Liarte e Murta (2010). Inicialmente, os parasitos foram expostos a concentração de SbIII que foi determinada como correspondente ao IC₅₀ (concentração inibitória de 50% do crescimento) da cultura de *L. (L.) amazonensis*. Um aumento gradual na concentração da droga foi realizado somente quando as culturas expostas ao fármaco alcançaram uma taxa de crescimento semelhante às das culturas de tipo selvagem (controle). Este aumento foi continuado até que os parasitos fossem capazes de crescer em um meio com uma concentração de quinze vezes o valor do IC₅₀. As espécies de *Leishmania* do tipo selvagem (controle) foram cultivadas em meio Schneider suplementado sem qualquer droga.

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

Para o estudo da morfologia dos parasitos, células em cultura em fase logarítmica e estacionária de crescimento foram analisadas. Para isto, foram realizados esfregaços em lâminas e, posteriormente coradas com o kit de coloração Panótico rápido e fotografadas, sob microscopia de luz (aumento 1000x). Também foram analisadas culturas de parasitos que foram colocados diretamente sobre lâminas e posteriormente observadas em microscopia óptica. Dentre os parâmetros analisados, foram considerados o tamanho e formato celular, bem como do tamanho do flagelo.

3.6 Análise da estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio dos mutantes de *Leishmania (L.) amazonensis*

Após a seleção dos mutantes resistentes ao SbIII de *L. (L.) amazonensis*, os parasitos foram cultivados, juntamente com o tipo selvagem, em meio Schneider suplementado na ausência da droga por dezenove repiques. Após o segundo, décimo e décimo oitavo repique, o IC₅₀ dessas culturas foi determinado, como descrito anteriormente, a fim de monitorar sua sensibilidade ao SbIII (AMORIM et al., 2013).

3.7 Obtenção das formas amastigotas axênicas

Para a obtenção das formas amastigotas axênicas foi realizado um repique, com inóculo inicial de 1×10^6 promastigotas para cada mL de meio Schneider suplementado, com pH 7,0. As células foram incubadas a 25°C até atingirem a fase estacionária de crescimento (RODRIGUES et al., 2015), em seu quinto dia de cultivo. Em seguida, essas células foram centrifugadas em tubos de polipropileno durante 10 minutos a 112 x g [2000 rpm (centrífuga PARSEC CT0603)], o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspenso em meio Schneider suplementado (100UI/mL estreptomicina-penicilina + SBF 5%) com pH 5,5. Essas células foram incubadas durante 2 dias a uma temperatura de 32°C, mimetizando-se, assim, as condições *in vivo* (HODGKINSON et al., 1996; CALLAHAN et al., 1997). Após este

período, as células foram analisadas qualitativamente sob microscopia óptica, a fim de verificar a morfologia celular característica de formas amastigotas.

3.8 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do antimonial trivalente sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania (L.) amazonensis*

A atividade anti-*Leishmania* sobre formas amastigotas axênicas foi avaliada utilizando o teste do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio). O MTT é um corante amarelo, que é reduzido principalmente por enzimas desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas de células viáveis a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). As formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* dos mutantes e das culturas selvagens obtidas conforme item 3.8, foram ajustadas para quantidade de 1×10^8 células/mL, e adicionados 100 µL da cultura em placas de cultivo celular de 96 poços contendo 100 µL de meio Schneider, com pH 5,5 e suplementado a 5% de SFB, bem como foram adicionadas diferentes concentrações de SbIII. As placas foram incubadas em estufa BOD na temperatura de 32°C por 24 h. Ao final da incubação foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS a uma concentração final de 5 mg/mL e incubadas por mais 4 h. Em seguida foram adicionados 50 µL de uma solução a 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e mantido *overnight* para completa dissolução do formazan. Por último, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo ELx800) a 540 nm (RODRIGUES et al., 2015).

3.9 Teste de lise pelo sistema complemento

3.9.1 Obtenção de soro a partir de sangue humano

Para os ensaios de lise pelo complemento foram coletadas amostras de sangue humano (cerca de 10 mL) por punção de voluntários adultos e saudáveis, sendo utilizado material estéril adquirido comercialmente (Aglhas e Seringas BD Plastipak®) e colhidos em tubos à vácuo (Greiner Bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil).

Para obtenção do soro, após a coleta o sangue foi mantido à temperatura ambiente por 1 hora para retração do coágulo. Posteriormente, foi feita a separação do soro utilizando centrífuga, a 1.500 rpm (rotações por minuto), por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um microtubo estéril e seco para ser utilizado. Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - UFPB, com protocolo número 0503/15, CAAE: 48947415.2.0000.5188 (ANEXO).

3.9.2 Sensibilidade dos mutantes de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao SbIII à lise pelo complemento

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram avaliadas quanto a sua resistência à lise, conforme descrito em Gamboa e colaboradores (2008), com modificações. As culturas foram centrifugadas (2000 rpm – 10 min), lavadas em PBS e as formas promastigotas foram ajustadas a uma concentração de 2×10^6 células/mL. Em seguida, foi adicionado 100 µL da cultura em placas de cultivo celular com 96 poços, em que foram realizadas diluições em série de soro humano de um indivíduo saudável a partir de 1:1 a 1:64 em 100 µL de meio Schneider suplementado, sendo o experimento realizado em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 25°C durante 1 hora. Após o período de incubação, os parasitos foram coletados e colocados diretamente em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos foram expressos de acordo com a percentagem de parasitos vivos em comparação com os controles que não foram expostos ao soro. Para estimar a porcentagem de sobrevivência de parasitos, foi realizada a análise do movimento flagelar dos parasitos.

3.10 Análise de resistência múltipla às drogas

Após a seleção de parasitos resistentes ao SbIII, foi realizado um ensaio visando observar se promastigotas resistentes ao SbIII também desenvolveram resistência à droga de referência Anfotericina B. Para isso, as culturas sensíveis e resistentes ao SbIII foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de Anfotericina B e foram determinados os valores de IC₅₀ como descrito anteriormente.

3.11 Análise estatística

Os dados obtidos em cada experimento foram avaliadas 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 5.0. Apenas os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. Para o cálculo de IC_{50} , foi utilizado o modelo de análise de regressão Probit utilizando o programa SPSS 13.0 para Windows.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Para um estudo inicial, primeiramente foi necessário conhecer o perfil de crescimento das formas promastigotas no meio de cultivo utilizado, analisando uma curva de crescimento, a fim de determinar as diferentes fases de crescimento dos parasitos: logarítmica e estacionária. É conhecido que os parasitos em fase logarítmica são equivalentes à formas procíclicas de crescimento, enquanto que as formas metacíclicas são equivalentes aos parasitos em fase estacionária de crescimento. Desse modo, sabe-se que em meio de cultivo é possível mimetizar o desenvolvimento do parasito, tal como ocorre no inseto vetor (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

O crescimento das formas promastigotas da cepa de referência de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), cultivadas em meio Schneider suplementado com 20% de SBF, foi acompanhado diariamente por meio da observação e da quantificação de pequenas alíquotas da cultura, a fim de analisar as diferentes fases de crescimento do parasito (Gráfico 1).

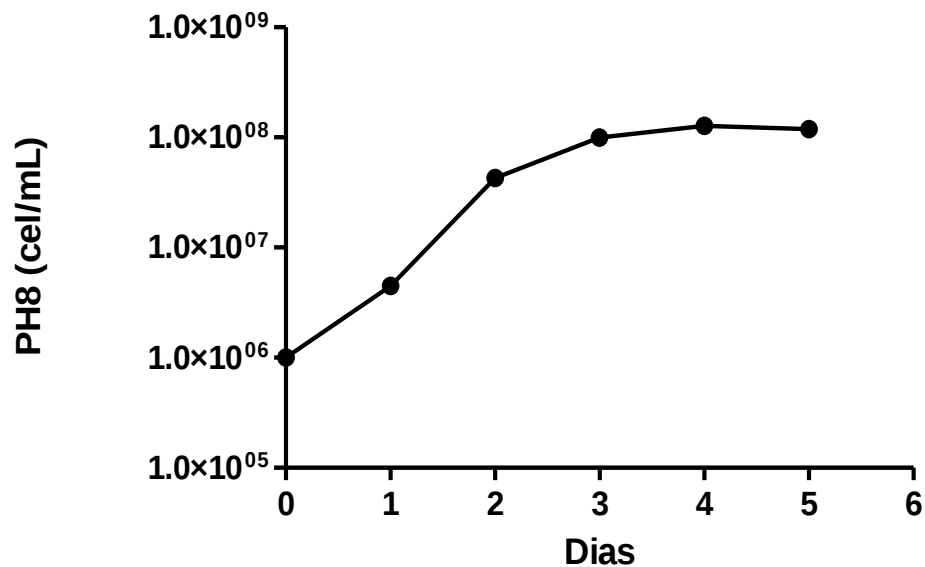
Nas condições de cultivo utilizadas neste trabalho, a cultura permaneceu em fase logarítmica de crescimento entre o primeiro e o terceiro dia de incubação, seguido de uma atenuação do crescimento após o terceiro dia (Gráfico 1). Como tem sido descrito, no cultivo *in vitro* dos parasitos é possível detectar claramente duas fases de crescimento, que são a logarítmica, em que predominam as formas procíclicas, e a fase estacionária, em que contém principalmente as formas metacíclicas (PINTO-DA-SILVA et al., 2002).

O perfil de crescimento foi característico, com as fases logarítmica e estacionária bem estabelecidas, tal como observado por Da Silva e colaboradores (2015). Na fase estacionária de crescimento ocorre em grande número a diferenciação de promastigotas procíclicas em metacíclicas *in vitro*, pois esta é uma fase caracterizada pela escassez de nutrientes e acidificação do meio de cultura, dentre outros fatores (BATES; TETLEY, 1993).

Além da cinética de crescimento, outro parâmetro capaz de avaliar as diferentes fases do parasito é por meio da observação das diferenças em sua morfologia. O processo de metaciclogênese é onde ocorre a diferenciação de formas promastigotas procíclicas, que são pouco virulentas, para promastigotas metacíclicas, que são as formas mais virulentas (BATES; TETLEY, 1994). Esta diferenciação é acompanhada por mudanças na expressão de

moléculas de superfície, como LPG e gp63, bem como diferenças em sua morfologia, que incluem o tamanho do corpo celular, a forma e o tamanho do flagelo (MUSKUS; MARÍN VILLA, 2002).

Gráfico 1: Curva de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

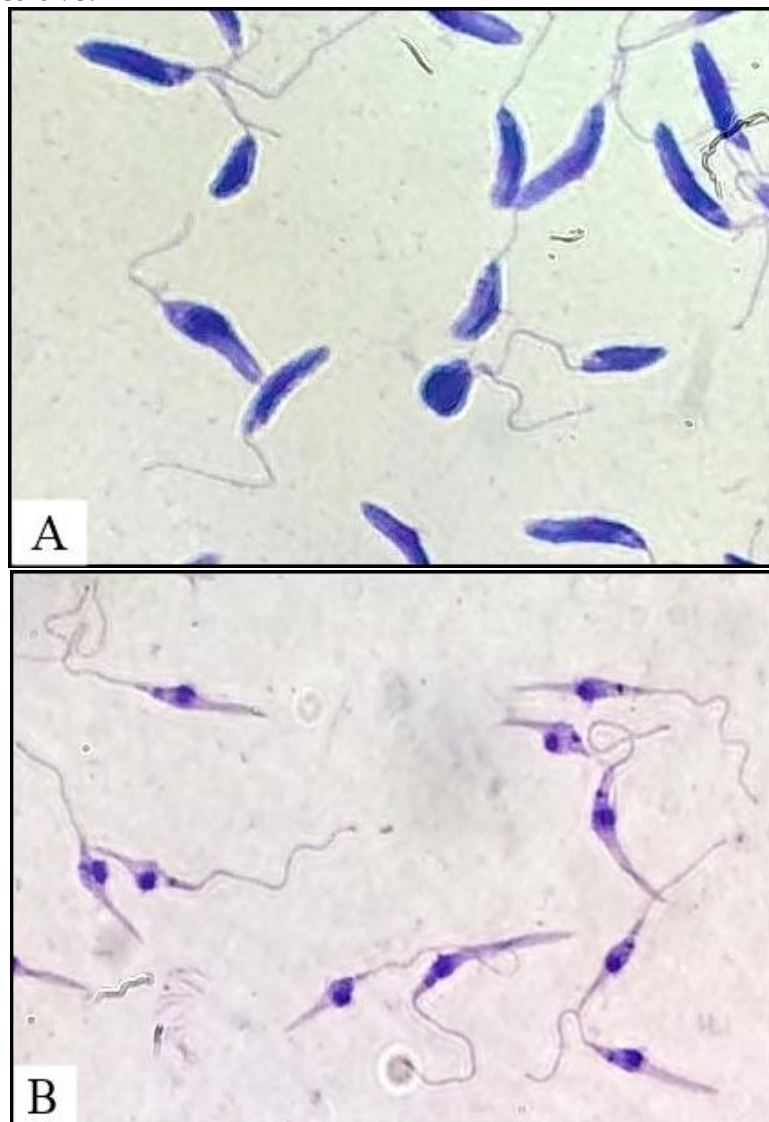


Fonte: FRADE, D.K.G. Os parasitos (1×10^6 promastigotas/mL) foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 20% de SBF e incubadas à temperatura de 25°C e examinadas qualitativa e quantitativamente ao microscópio óptico diariamente. Estes dados representam a média de duplicata de um experimento.

Com relação a morfologia das formas promastigotas, foram observadas diferenças morfológicas nas fases procíclicas (logarítmica) e metacíclicas (estacionária), as quais podem ser diferenciadas por meio da observação das culturas em microscopia óptica (Figura 7). As culturas procíclicas apresentam células com corpo celular ligeiramente arredondado, com um flagelo geralmente do tamanho da célula, enquanto que as formas metacíclicas sofreram uma diminuição no comprimento do corpo celular, apresentando-se geralmente menor e mais delgado, em relação as formas procíclicas, com um flagelo mais longo, que pode medir até duas vezes o comprimento do corpo celular.

Estas alterações foram características das formas metacíclicas, como já descrito anteriormente em *L. (L.) amazonensis* (SARAIVA et al., 2005; FELIZARDO et al., 2007; Da SILVA et al., 2015), bem como em outras espécies de *Leishmania* (BATES; TETLEY, 1993; ZAKAI et al., 1997).

Figura 7: Formas promastigotas no segundo (fase logarítmica) e no quinto dia (fase estacionária) de cultivo.



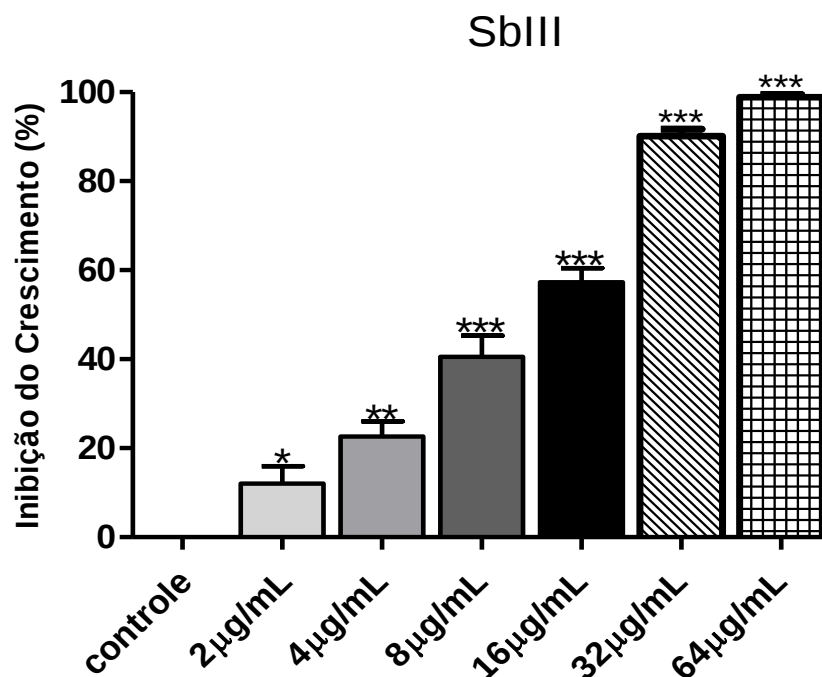
Fonte: FRADE, D.K.G. Formas promastigotas em seu segundo (A) e quinto (B) dia de cultivo, coradas com coloração hematológica rápida Panótico (aumento 1000x).

4.2 Sensibilidade das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* ao SbIII e à Anfotericina B

No presente estudo, foi avaliada a sensibilidade das formas promastigotas às principais drogas utilizadas para o tratamento das leishmanioses. A análise da atividade antipromastigota do antimônio trivalente (SbIII), bem como do fármaco Anfotericina B, sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* está representada nos gráficos 2 e 3, respectivamente. Os resultados foram obtidos a partir de uma análise comparativa entre as culturas tratadas

com as diferentes concentrações das drogas e os controles (sem droga), de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.

Gráfico 2: Atividade antipromastigota do antimônio trivalente (SbIII) em *Leishmania (L.) amazonensis*.

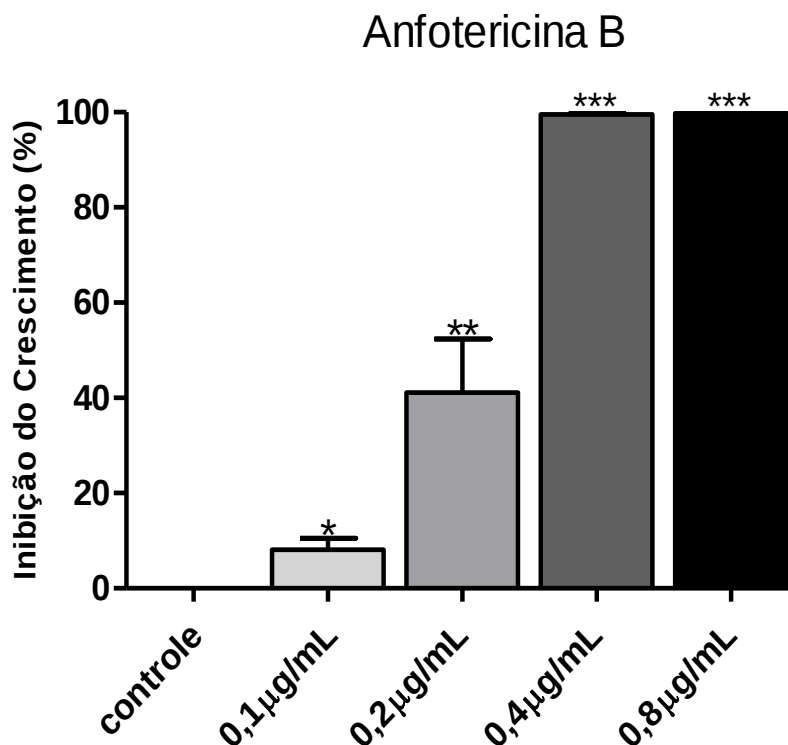


Fonte: FRADE, D.K.G. Os resultados apresentados são as médias de três experimentos em duplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer, sendo comparados com o tipo selvagem (sem droga), incubados por 72 horas à 25°C. Foi realizada uma análise de regressão utilizando o software Probit SPSS 13.0. Os dados foram comparados utilizando o teste *t*, com significância de *($p < 0,05$); **($p < 0,01$); ***($p < 0,001$).

O Gráfico 2 mostra que a concentração de 2, 4 e 8 µg/ml do SbIII foram capazes de reduzir de maneira significativa o crescimento dos parasitos. A concentração de 16 µg/ml mostrou um percentual de inibição elevado, promovendo a morte da maior parte dos parasitos. Nas maiores concentrações da droga, de 32 e 64 µg/ml foi observado que a droga promoveu a morte de quase 100% dos parasitos.

Por outro lado, a Anfotericina B mostrou uma grande redução no crescimento dos parasitos ainda na concentração de 0,2 µg/ml, apresentando uma porcentagem de inibição de cerca de 50% dos parasitos, sendo bastante sensíveis a concentrações superiores a 0,2 mg/mL, apresentando uma inibição proporcional ao aumento da droga.

Gráfico 3: Atividade antipromastigota da Anfotericina B em *Leishmania (L.) amazonensis*.



Fonte: FRADE, D.K.G. Os resultados apresentados são as médias de três experimentos em duplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer, sendo comparados com o tipo selvagem (sem droga), incubados por 72 horas à 25°C. Foi utilizando o software Probit SPSS 13.0. Os dados foram comparados utilizando o teste *t*, com significância de **p*<0,05; ***p*<0,01; *** *p*<0,001.

A partir da análise do percentual de inibição foi possível calcular a concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC₅₀) do SbIII e da Anfotericina B sobre as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, em que foi realizada uma análise de regressão, utilizando o programa Probit SPSS 13.0. Os resultados obtidos mostraram uma IC₅₀ de 9,02 µg/ml e de 0,19 µg/ml, para o SbIII e para a Anfotericina B, respectivamente. Por meio dos resultados, é possível observar que as culturas são mais susceptíveis a Anfotericina B em sua forma promastigota, em comparação ao SbIII.

As drogas de primeira escolha no Brasil usadas para o tratamento humano das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (SbV), na forma de antimoniato de meglumina (Glucantime), que são utilizados há mais de meio século como uma droga de primeira linha (FRÉZARD et al., 2009). Este é o fármaco indicado para o tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, porém ele apresenta várias limitações, incluindo a sua alta toxicidade, a administração parenteral, e o crescente surgimento de resistência dos

parasitos (THAKUR et al., 2001). Nos casos de resistência ao antimonial ou impossibilidade de uso, a Anfotericina B é geralmente o fármaco de segunda escolha. A Anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico de reconhecida ação leishmanicida (MISHRA et al., 1992), porém o tratamento com esta droga também apresenta limitações, incluindo a alta toxicidade, a administração parenteral, e o surgimento de resistência ao tratamento (THAKUR et al., 2001).

De acordo com o que é relatado na literatura, as formas promastigotas de *Leishmania* spp. são pouco susceptíveis a ação do SbV. Foi demonstrado que o SbV, que é a forma prescrita clinicamente, atua como uma pró-droga, que requer que seja reduzido após a sua administração para formar o SbIII, para que se tenha uma atividade anti-*Leishmania* (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; FRÉZARD; MONTE-NETO; REIS, 2014), porém este mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Portanto, para este estudo foi utilizado o SbIII, que é a forma biologicamente ativa da droga, bem como apresenta uma maior toxicidade quando comparado ao SbV (HALDAR; SEM; ROY, 2011).

4.3 Seleção de parasitos resistentes ao antimônio trivalente

No presente estudo, foram selecionados *in vitro* parasitos resistentes ao antimonial trivalente (SbIII). Foi utilizada a cepa de referência de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) para que fossem realizadas análises em diferentes aspectos, dentre eles, as diferenças morfológicas das formas promastigotas em seus diferentes estágios, o nível de resistência adquirido após determinados tempos de cultivo na presença da droga, a transmissão do fenótipo de resistência para as formas amastigotas e a resistência à lise pelo complemento.

O processo de seleção de parasitos resistentes ao SbIII, nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, iniciou utilizando a concentração da droga correspondente ao IC₅₀ (9,02 µg/mL). Duas culturas selvagens foram cultivadas separadamente, seguindo a mesma metodologia de indução de resistência de forma independente, em que foram realizados repiques sucessivos do parasito em concentrações crescentes da droga. No final, foram selecionados dois mutantes (SbIII 1 e SbIII 2). Visto que se tratam de culturas distintas, estes podem ou não possuir mecanismos de resistência diferentes.

Inicialmente, foram selecionados mutantes com três vezes o valor do IC₅₀, após um mês de cultivo, que alcançaram valores de 26,4 µg/mL (SbIII 1) e 25,7 µg/mL (SbIII 2), em

comparação com o selvagem que obteve um valor de 12,8 µg/mL (*teste t*; $p < 0,01$). Após três meses de repiques sucessivos, os mutantes cultivados com seis vezes o valor do IC₅₀ alcançaram valores de 56,2 µg/mL (SbIII 1) e 49,8 µg/mL (SbIII 2), comparado com a cultura selvagem que obteve o valor de 14,8 µg/mL (*teste t*; $p < 0,05$).

Posteriormente, após quatro meses de cultivo em crescentes concentrações de antimônio e um total de trinta e três repiques, foram selecionados mutantes com dez vezes a concentração do IC₅₀. Estes apresentaram um IC₅₀ de 93,28 µg/mL (SbIII 1) e 81,67 µg/mL (SbIII 2), enquanto que a cultura selvagem apresentou um valor de 14,5 µg/mL (*teste t*; $p < 0,01$). Ainda, após um total de cinquenta e cinco repiques e seis meses de cultivo, foram selecionados parasitos capazes de crescer em um meio com quinze vezes o valor do IC₅₀, os quais apresentaram valores de 202,63 µg/mL (SbIII 1) e 288,15 µg/mL (SbIII 2), e o tipo selvagem obteve um valor de 12,8 µg/mL (*teste t*; $p < 0,001$). Portanto, os mutantes SbIII 1 e SbIII 2 adquiriram níveis de resistência 15,8 e 22,5 vezes maior do que o apresentado pelas culturas selvagens, respectivamente.

Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1, em que está sendo comparado o valor do IC₅₀ das culturas resistentes ao SbIII com a cultura selvagem.

Ainda pode ser notado, a partir dos resultados obtidos, que o IC₅₀ das culturas selvagens não sofreram alterações significativas com o número crescente de repiques realizados, apresentando um IC₅₀ semelhante ao inicial mesmo após cinquenta e cinco repiques. Portanto pode-se afirmar que os repiques sucessivos não interferiram na resistência de *L. (L.) amazonensis* ao SbIII. Contudo, não se pode inferir quanto a virulência dos parasitos. Moreira et al. (2012) observaram que ocorre uma perda de virulência dos parasitos após um longo período de cultivo *in vitro*, demonstrando que culturas axênicas apresentaram uma diminuição da virulência após longo período de cultivo *in vitro*.

As diferenças no nível de resistência da cultura selvagem com os mutantes cultivados com 15 vezes o valor do IC₅₀ são bastante significativas, pois os mutantes apresentaram uma resistência mais de 15 vezes superior ao exibido pelo tipo selvagem, disponibilizando assim mutantes para serem investigados quanto aos mecanismos de resistência e possível associação com a virulência.

Tabela 1: Níveis de resistência ao SbIII de diferentes culturas de *L. (L.) amazonensis* selecionadas após a exposição a crescentes concentrações do antimônio.

	Culturas		Mutantes	
	Selvagem (inicial)	Selvagem*	SbIII 1	SbIII 2
Número de repiques	2	10	10	10
Nível de resistência	0	0	3 x IC ₅₀	3 x IC ₅₀
IC ₅₀ Gerado	9,02 µg/mL (7,3 ± 11,1)	12,8 µg/mL (10,07 ± 16,4)	26,4 µg/mL (23,5 ± 29,4)	25,7 µg/mL (22,1 ± 29,3)
	Selvagem (inicial)	Selvagem*	SbIII 1	SbIII 2
Número de repiques	2	25	25	25
Nível de resistência	0	0	6 x IC ₅₀	6 x IC ₅₀
IC ₅₀ Gerado	9,02 µg/mL (7,3 ± 11,1)	14,8 µg/mL (12,6 ± 17,3)	56,2 µg/mL (34,3 ± 70,8)	49,8 µg/mL (27,5 ± 61,2)
	Selvagem (inicial)	Selvagem*	SbIII 1	SbIII 2
Número de repiques	2	33	33	33
Nível de resistência	0	0	10 x IC ₅₀	10 x IC ₅₀
IC ₅₀ Gerado	9,02 µg/mL (7,3 ± 11,1)	14,5 µg/mL (11,3 ± 18,09)	93,2 µg/mL (78,5 ± 107,7)	81,6 µg/mL (58,5 ± 101,8)
	Selvagem (inicial)	Selvagem*	SbIII 1	SbIII 2
Número de repiques	2	55	55	55
Nível de resistência	0	0	15 x IC ₅₀	15 x IC ₅₀
IC ₅₀ Gerado	9,02 µg/mL (7,3 ± 11,1)	12,8 µg/mL (10,4 ± 15,5)	202,6 µg/mL (161,7 ± 260,5)	288,1 µg/mL (225,7 ± 409,9)

Fonte: FRADE, D.K.G. Os resultados apresentados são as médias de três experimentos independentes em duplicata, realizados por meio de contagens em câmara de Neubauer, sendo comparados os mutantes resistentes ao SbIII com as culturas selvagens (sem droga), incubados por 72 horas à 25°C. *Média das culturas selvagens, realizadas em duplicata. O IC₅₀ foi calculado utilizando o programa Probit SPSS. O teste *t* foi realizado a fim de verificar a significância dos dados dos mutantes em relação com o tipo selvagem.

A resistência à drogas é um dos maiores problemas para o tratamento com os antimoniais pentavalentes, como já vem sendo relatado em diversos países, especialmente na Índia, em que a maior parte da população é resistente aos antimoniais (MOHAPATRA, 2014).

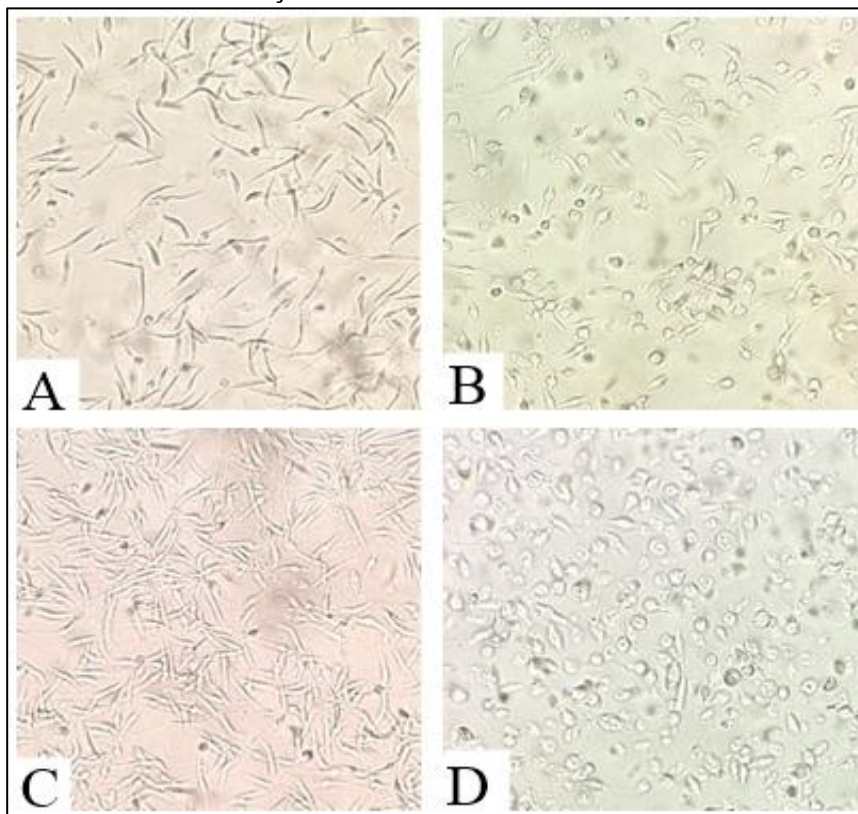
O processo de resistência aos antimoniais em *Leishmania* spp. é altamente complexo, o qual ainda não está totalmente esclarecido, porém sabe-se que pode estar associado a diferentes mecanismos, podendo envolver diversas vias, incluindo a entrada, efluxo e/ou sequestro da droga, o seu metabolismo, transporte e ainda a morte celular mediada pela ação da droga (JEDDI et al., 2011).

4.4 Morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII

As células que foram cultivadas em concentrações crescentes da droga não apresentaram mudanças a respeito de sua cinética de crescimento, tampouco em sua morfologia. No entanto, após a seleção de parasitos capazes de crescer em um meio contendo SbIII, com dez vezes a concentração do IC₅₀, a análise da morfologia das culturas mostrou diferenças morfológicas entre as formas promastigotas sensíveis e resistentes ao antimônio, como documentado na Figura 8.

A análise morfológica das células em cultura mostra diferenças significantes no tamanho e na forma das formas promastigotas dos mutantes e as culturas selvagens. Após o quinto dia de cultivo observa-se que os controles (culturas selvagens) (Fig. 8A e 8C) possuem características semelhantes, com culturas apresentando uma morfologia homogênea, com corpo celular alongado, delgado e com flagelo longo, característico de formas metacíclicas, como mostrado anteriormente (Figura 7), não sendo detectadas diferenças morfológicas significativas após os sucessivos repiques em cultura. Entretanto, apesar de se encontrarem no mesmo dia de cultivo, os mutantes (Fig. 8B e 8D) apresentaram diferenças morfológicas significativas em relação aos controles, como pode ser observado nas imagens, possuindo a maior parte das células com um corpo celular arredondado e flagelo alongado, com poucas células apresentando características semelhantes a cultura selvagem, indicando que o cultivo com quantidades crescentes da droga até dez vezes o IC₅₀ promoveu uma alteração morfológica nas culturas.

Figura 8: Morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII e meio de cultura com dez vezes a concentração do IC₅₀.



Fonte: FRADE, D.K.G. Fotomicrografia das formas promastigotas dos controles e dos mutantes resistentes ao SbIII, em seu quinto dia de cultivo (aumento 400x). (A e C) Culturas selvagens; (B) Mutante SbIII 1; (D) Mutante SbIII 2.

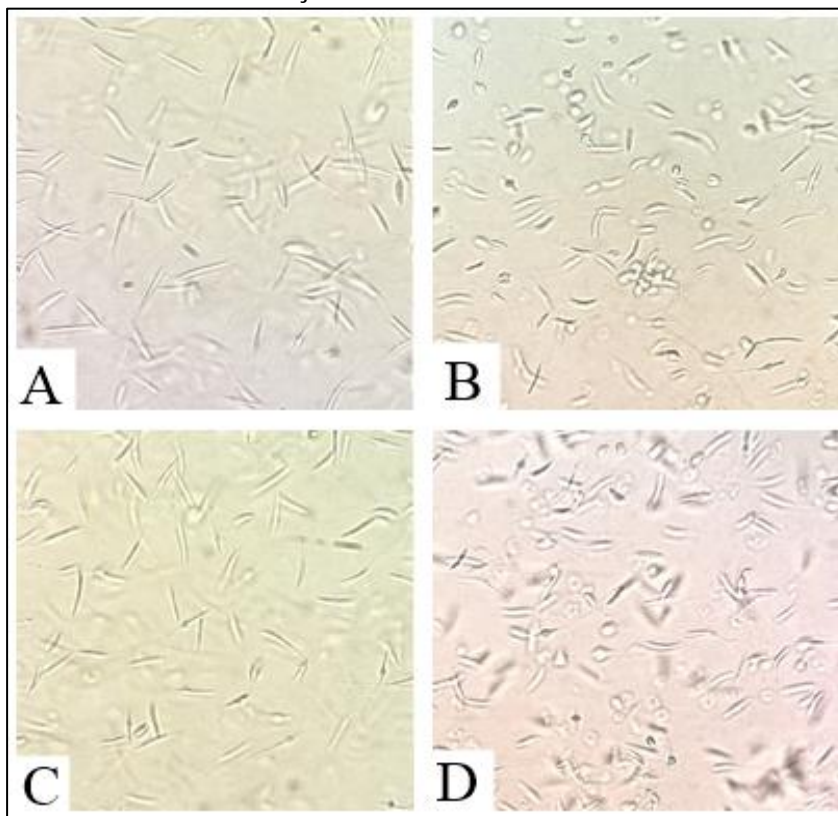
No entanto, com o passar dos repiques, em que foram selecionados mutantes capazes de crescer em um meio com quinze vezes a concentração do IC₅₀, foi observada uma diminuição das diferenças entre sensíveis e resistentes ao antimônio, como pode ser visto na Figura 9, em que muitas células mutantes ainda apresentam formas ovaladas, porém em uma quantidade menor quando comparado aos mutantes de dez vezes o IC₅₀, contendo uma quantidade maior de células alongadas com flagelos longos, típicas das culturas selvagens.

Ainda não há relatos na literatura a respeito de alterações morfológicas provocadas pela resistência à drogas em *Leishmania*. No entanto, Ouakad et al. (2011) relataram que as cepas resistentes desenvolveram cerca de duas vezes mais promastigotas metacíclicos que as cepas sensíveis, observado por meio de análises morfológicas do corpo celular, largura e comprimento do flagelo.

No entanto, observa-se alterações morfológicas significativas em nossas culturas resistentes ao antimônio trivalente, as quais podem ter relação com a resistência a esta droga por conta da diversidade de mecanismos responsáveis pela resistência aos antimônios, em

que um determinado mecanismo de resistência poderia estar provocando estas alterações morfológicas observadas.

Figura 9: Morfologia das formas promastigotas sensíveis e resistentes ao SbIII em meio de cultura com quinze vezes a concentração do IC₅₀.



Fonte: FRADE, D.K.G. Fotomicrografia das formas promastigotas dos controles e dos mutantes resistentes ao SbIII, em seu quinto dia de cultivo (aumento 400x). (A e C) Culturas selvagens; (B) Mutante SbIII 1; (D) Mutante SbIII 2.

4.5 Estabilidade do fenótipo de resistência ao antimônio dos mutantes de *Leishmania (L.) amazonensis*

A fim de verificar a estabilidade da resistência ao SbIII adquirida pelos mutantes capazes de crescer em um meio com quinze vezes o valor do IC₅₀, estes foram cultivados em meio de cultura com ausência da droga, para que após os repiques sucessivos fossem analisadas as IC₅₀ das culturas.

Inicialmente, foi realizada a análise da resistência dos mutantes ao SbIII após o segundo repique sem adicionar a droga. Foi observado que em um dos mutantes, denominado SbIII 2, não houve uma alteração significativa do IC₅₀ com relação a cultura original (*teste t*; $p < 0,001$), apresentando valores equivalentes. Contudo, o mutante SbIII 1 apresentou uma

diminuição da resistência ao SbIII, como observado pelo valor do IC₅₀ (*teste t*; $p < 0,05$). Após o décimo repique sem adicionar a droga, nota-se de uma forma mais significativa a diminuição da resistência do mutante SbIII 1 (*teste t*; $p < 0,01$), diferentemente do que pode ser observado no outro mutante (SbIII 2), que permaneceu com um valor semelhante ao original (*teste t*; $p < 0,001$). Adicionalmente, foi avaliada a estabilidade da resistência desta cultura após o décimo oitavo repique no meio sem a droga, em que a reversão da resistência foi ainda mais acentuada no mutante SbIII 1 (*teste t*; $p < 0,01$), enquanto que o outro mutante, SbIII 2, apresentou uma pequena diminuição no nível de resistência ao antimônio (*teste t*; $p < 0,05$).

Tabela 2: IC₅₀ das culturas resistentes em comparação com a cultura selvagem cultivadas sem a presença do SbIII.

Culturas de 15 vezes o IC ₅₀	IC ₅₀ após o cultivo sem o SbIII		
	Segundo repique	Décimo repique	Décimo oitavo repique
Selvagem (min/máx)	10,45 µg/mL (7,7 /13,5)	12,2 µg/mL (9,9 /14,2)	11,33 µg/mL (9,05 /16,14)
SbIII 1 (min/máx)	179,9 µg/mL (150,5 /188,2)	74,1 µg/mL (21,08 /112,6)	55,52 µg/mL (41,3 /72,7)
SbIII 2 (min/máx)	298,8 µg/mL (237,6 /425,6)	286,2 µg/mL (265,3 /311,5)	240,32 µg/mL (186,02 /322,5)

Fonte: FRADE, D.K.G. Os resultados apresentados são as médias de dois experimentos em duplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer, sendo comparados com a cultura selvagem (sem droga), incubados por 72 horas à 25°C. O IC₅₀ foi calculado utilizando o programa Probit SPSS. O *teste t* foi realizado a fim de verificar a significância dos dados dos mutantes cultivados sem a droga em relação a cultura com nível de resistência de 15 vezes o IC₅₀.

Desse modo, foi possível observar que após 18 passagens sem a pressão da droga, apenas um mutante mostrou um perfil de resistência mais estável (SbIII 2), enquanto o outro mutante (SbIII 1) mostrou uma diminuição do nível de resistência significativo a partir do décimo repique sem utilizar a droga. Estes resultados sugerem que, possivelmente, estes dois mutantes podem ter adquirido mecanismos de resistência ao SbIII distintos, por conta da complexidade deste processo e de poder estar associado a diferentes vias.

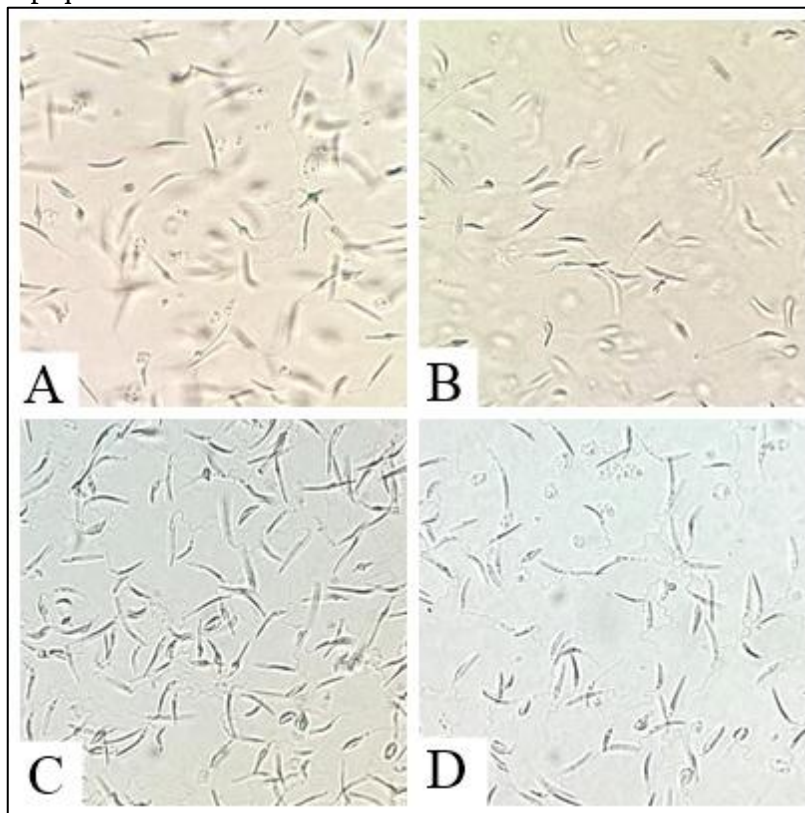
Os resultados obtidos foram semelhantes aos relatados por Monte-Neto et al. (2011) com *L. (L.) amazonensis*, em que obtiveram quatro mutantes resistentes ao SbIII independentes, sendo que após 20 passagens sem a pressão da droga apenas um mutante mostrou um perfil estável de resistência, enquanto os outros três mostraram um decréscimo no nível de resistência.

Um estudo realizado por Liarte e Murta (2010) com parasitos das espécies de *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*L.*) *amazonensis* e *L.* (*L.*) *infantum chagasi*, relatou que após 37 passagens em um meio de cultura sem o SbIII, formas promastigotas de *L.* (*V.*) *braziliensis* e *L.* (*L.*) *amazonensis* resistentes ao SbIII perderam a resistência ao antimônio, mostrando também nestes mutantes uma instabilidade deste fenótipo.

Analisando a morfologia dos mutantes SbIII 1 e SbIII 2 após dezenove repiques sem utilizar a droga, foi possível observar que as culturas não mais apresentaram diferenças morfológicas quando comparadas com as culturas selvagens (Figura 10), como havia observado anteriormente nas culturas cultivadas na presença da droga (Figura 8).

Como mostrado na figura 10, todas as culturas apresentaram uma morfologia mais homogênea, mesmo o mutante que mostrou um perfil de estabilidade maior (SbIII 2). As culturas apresentavam formas promastigotas possuindo um corpo celular delgado e um flagelo alongado, não apresentando células ovaladas, sendo outro indício de que as alterações morfológicas anteriormente observadas podem estar relacionadas a resistência ao SbIII.

Figura 10: Formas promastigotas das culturas selvagens e dos mutantes SbIII 1 e SbIII 2 após o décimo nono repique sem o antimônio trivalente.



Fonte: FRADE, D.K.G. Fotomicrografia das formas promastigotas dos controles e dos mutantes resistentes ao SbIII, em seu quinto dia de cultivo, após dezenove repiques sem utilizar a droga (aumento 400x). (A e C) Culturas selvagens; (B) Mutante SbIII 1; (D) Mutante SbIII 2.

4.6 Análise da transferência de resistência da forma promastigota para a forma amastigota

Foram obtidas formas amastigotas axênicas por meio de um aumento de temperatura e decréscimo do pH do meio, como descrito anteriormente (BATES, 1994), as quais foram derivadas de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes ao SbIII e avaliados os níveis de resistência utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.

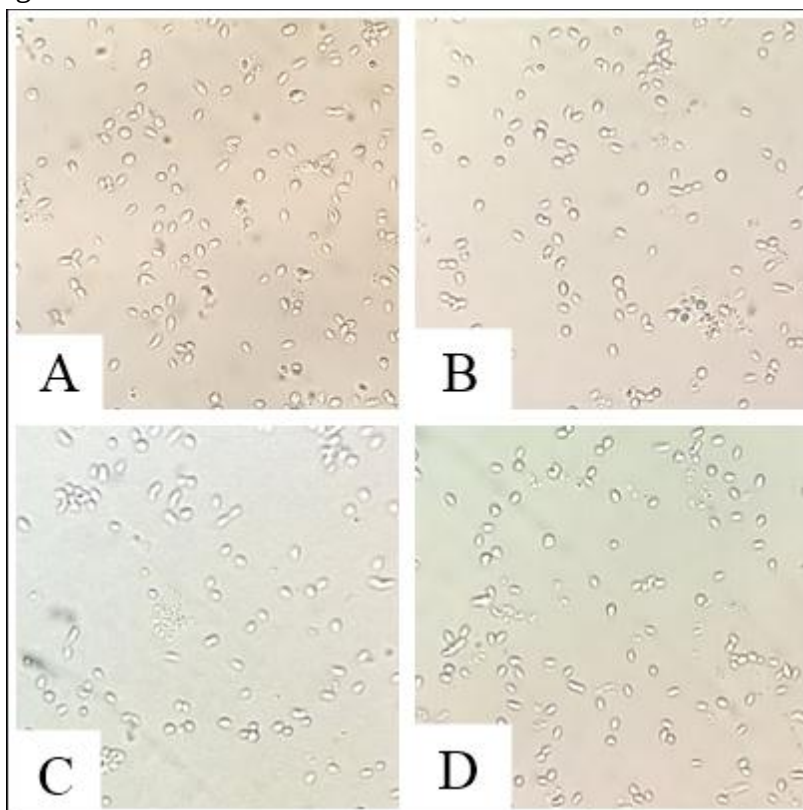
4.6.1 Transformação de promastigotas em amastigotas axênicas

As formas amastigotas axênicas foram obtidas por meio da transformação das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, conforme descrito por Hodgkinson et al., 1996, com modificações, como mostrado no item 3.8. O desenvolvimento das formas amastigotas axênicas *in vitro* foi satisfatório pois, pela análise microscópica, pode-se constatar que praticamente todas as formas promastigotas das culturas selvagens, assim como das resistentes ao antimônio se diferenciaram em amastigotas.

Para a identificação das amastigotas axênicas foi realizada uma análise morfológica em microscopia óptica, em que foi possível observar em todas as culturas, células com ausência de flagelos livres, com o corpo celular arredondado/ovalado, característico das formas amastigotas, após 48h de incubação em meio Schneider (pH 5,5) (Figura 11). Esta morfologia é característica de formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. É pertinente realçar que não foram detectadas diferenças entre as culturas selvagens e mutantes, apesar destas culturas apresentarem diferenças morfológicas quando na forma promastigota, como mostrado anteriormente (Figura 8).

O sucesso no processo de transformação das formas promastigotas para amastigotas axênicas é bastante relevante, principalmente por conta da dificuldade existente nesta conversão, pela necessidade de monitoramento e de uma avaliação cuidadosa das culturas de amastigotas axênicas, bem como na importância de se poder realizar estudos nesta forma do parasito (HODGKINSON et al., 1996; SAAR et al., 1998).

Figura 11: Formas amastigotas axênicas das culturas resistentes ao SbIII em comparação com as culturas selvagens.



Fonte: FRADE, D.K.G. Fotomicrografia das formas amastigotas axênicas das culturas selvagens e dos mutantes, cultivadas em meio Schneider suplementado com 20% SBF e pH 5,5 (aumento 400x). (A e C) Culturas selvagens; (B) Mutante SbIII 1; (D) Mutante SbIII 2.

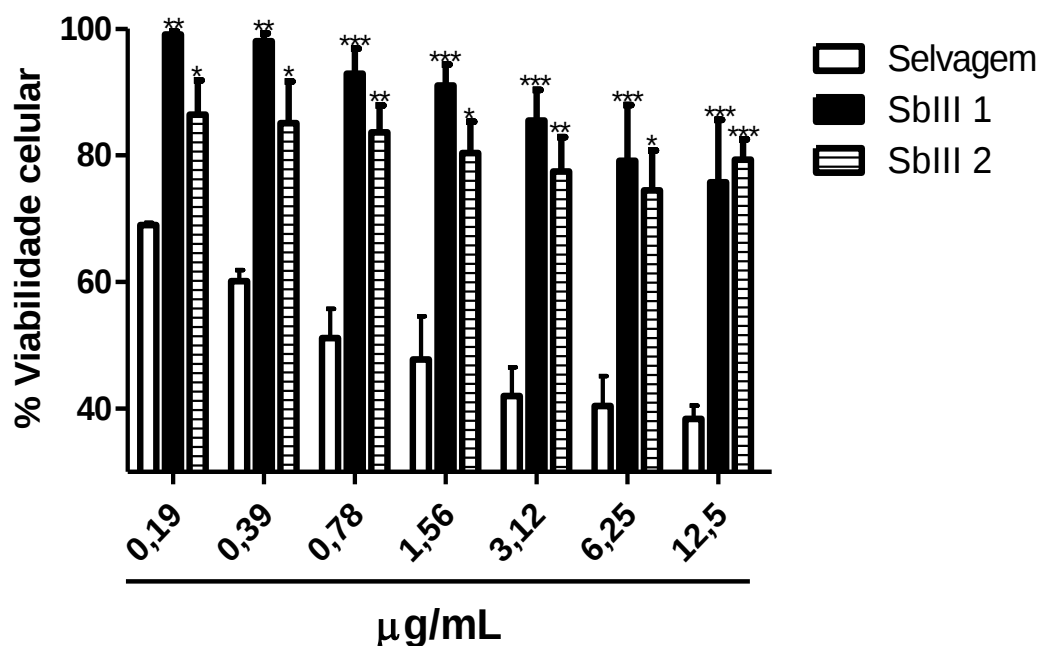
4.6.2 Sensibilidade das formas amastigotas axênicas ao SbIII

As formas amastigotas axênicas obtidas foram testadas quanto a sua sensibilidade ao SbIII, a fim de determinar se o fenótipo de resistência observado nas formas promastigotas se mantinha nas formas amastigotas. Para esta análise, foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando o corante MTT, como descrito no item 3.9, em que os parasitos foram expostos a diferentes concentrações da droga, para em seguida utilizar o corante, buscando avaliar a viabilidade celular. O MTT é um método que tem sido empregado para mensurar a quantidade de formas axênicas viáveis de *Leishmania* presentes na amostra em estudo (SERENO; LEMESRE, 1997).

De acordo com os resultados (Gráfico 4), foi possível observar que em todas as concentrações testadas, as formas amastigotas axênicas obtidas a partir da transformação das culturas resistentes ao SbIII foram significativamente mais resistentes à ação da droga, em

comparação com o tipo selvagem, ou seja, a droga promoveu uma inibição maior nas culturas sensíveis em relação aos mutantes.

Gráfico 4: Porcentagem de viabilidade das formas amastigotas axênicas dos mutantes SbIII 1 e SbIII 2 em comparação com a cultura selvagem.



Fonte: FRADE, D.K.G. As formas amastigotas axênicas foram cultivadas em Schneider suplementado com 20% SBF e pH 5,5, incubadas durante 24 horas para posterior adição do corante MTT, mantendo *overnight* para a realização da leitura. O gráfico representa a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. O teste *t* foi realizado para comparar a porcentagem de viabilidade das células dos mutantes em comparação ao tipo selvagem, sendo ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Entre os dois mutantes, as formas axênicas do mutante SbIII 1 apresentaram maior porcentagem de viabilidade celular, o que indica que possuíam uma maior quantidade de células viáveis desde a primeira concentração testada, de 0,19 µg/ml. O mutante SbIII 2 também mostrou uma viabilidade bastante significativa em relação ao selvagem na primeira concentração testada. Nas outras concentrações, observa-se que a droga promoveu inibição cerca de duas vezes maior nas culturas selvagens em comparação com os mutantes.

Como observado nos resultados e de acordo com a literatura, as formas promastigota e amastigota apresentam diferenças quanto a sua susceptibilidade frente a drogas anti-*Leishmania*, visto que as formas amastigotas são altamente susceptíveis ao antimonial pentavalente e trivalente, em comparação com as formas promastigotas, que apresentam menor sensibilidade aos antimoniais (CALLAHAN et al., 1997; SERENO et al., 1998). No

entanto, apesar de apresentarem maior susceptibilidade, as formas amastigotas axênicas obtidas dos mutantes resistentes ao SbIII, ainda assim exibiram um perfil de resistência superior ao observado em culturas sensíveis.

Como descrito por Loiseau e Bories (2006), a maior resistência ao SbIII observada em formas amastigotas axênicas derivadas de mutantes resistentes pode estar relacionada a redução ou perda de ação da droga. Estudos realizados por Shaked-Mishan et al. (2001) demonstraram que amastigotas axênicas de *Leishmania donovani* resistentes ao SbV, obtidas a partir de promastigotas resistentes selecionados *in vitro*, exibiram uma capacidade diminuída de reduzir o SbV a SbIII, o que as torna mais resistentes a ação da droga por impedir que esta seja transformada em sua forma biologicamente ativa.

Vale ressaltar que no ciclo do parasito, as formas amastigotas são as que se encontram no hospedeiro mamífero e, desse modo, a transferência da resistência das formas promastigotas para as formas amastigotas permite o entendimento de que, possivelmente, em uma infecção utilizando os mutantes, as formas amastigotas seriam mais resistentes ao tratamento, caso seja realizado o tratamento com o SbIII. Isto se deve ao fato de que a utilização das formas amastigotas axênicas apresenta resultados confiáveis e que muitas vezes são semelhantes aos obtidos com as formas intracelulares (CALLAHAN et al., 1997).

4.7 Análise da correlação entre resistência ao SbIII e resistência à lise pelo complemento

A fim de avaliar se a resistência ao SbIII interfere na sensibilidade à lise pelo complemento, foi inicialmente padronizado este ensaio de lise nas condições laboratoriais utilizadas neste trabalho para o cultivo de *L. (L.) amazonensis*, para posteriormente investigar esta possível correlação.

4.7.1 Padronização do ensaio de lise pelo sistema complemento

Como relatado na literatura, as formas promastigotas de *Leishmania* spp. em fase logarítmica de crescimento (procíclicas) são mais sensíveis à lise pelo complemento, quando comparado com as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (FRANKE et al., 1985). Portanto para a padronização do ensaio de lise, foram analisadas culturas de *L. (L.)*

amazonensis em fase logarítmica (dois dias de cultivo) e estacionária (cinco dias de cultivo) de crescimento, de acordo com o perfil de crescimento mostrado anteriormente na Tabela 2.

Para a realização do ensaio de lise pelo complemento foi utilizado soro humano de um indivíduo saudável. Os resultados estão descritos na Tabela 3. Foi observado que a diluição do soro humano em uma proporção de 1:1 provocou a morte de 100% das células. No fator de diluição do soro de 1:2 e 1:4 as culturas apresentaram reduzida taxa de sobrevivência, em ambas as fases de crescimento testadas. A medida que a concentração do soro diminuiu, a taxa de sobrevivência dos parasitos aumentou.

Tabela 3: Sensibilidade de formas promastigotas em fase logarítmica e estacionária de crescimento à ação do Sistema Complemento presente em soro humano.

Fase de crescimento	Fator de diluição do soro						
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Logarítmica	0	0,12	0,63	5,46	28,18	16,03	23,07
Estacionária	0	0,25	0,88	9,66	35,18	30,02	33,33

Fonte: FRADE, D.K.G. Percentagem de sobrevivência calculada com base na concentração da amostra inicial antes da submissão ao teste (1×10^6 promastigotas/mL). Os resultados apresentados são as médias de dois experimentos em triplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer. Só foram contabilizados vivos os promastigotas com movimento. O teste *t* foi realizado para comparar a porcentagem de sobrevivência das células em fase logarítmica e estacionária.

Comparando as duas fases de crescimento dos parasitos, foi observado que as culturas em fase estacionária de crescimento foram significativamente mais resistentes à lise pelo complemento do que as em fase logarítmica (*teste t*; $p < 0,01$), em todas as concentrações de soro analisadas, o que corrobora com resultados descritos anteriormente que demonstram que as formas metacíclicas são mais resistentes à lise que as formas procíclicas (PINTO-DA-SILVA et al., 2002; Da SILVA et al., 2015).

No processo de metaciclologênese ocorre uma série de mudanças no parasito, entre elas alterações morfológicas, tais como diferenças no corpo celular, que se torna mais delgado, e com um flagelo mais alongado, bem como as modificações bioquímicas que são observadas, como o aumento da expressão do LPG e da glicoproteína gp63 na membrana externa do parasito (SACKS et al., 1990; PINTO-DA-SILVA et al., 2002).

A metaciclologênese acompanha outra característica essencial para a sobrevivência dos parasitos no interior do hospedeiro mamífero, que é o aumento da resistência à lise mediada pelo sistema complemento, o qual é um processo também observado em culturas *in vitro*. Por

conta disso, as formas procíclicas são mais susceptíveis à lise pelo complemento do que as formas metacíclicas, presentes especialmente na fase estacionária de crescimento (Da SILVA et al., 2015).

A resistência à lise é atribuída ao aumento do LPG na superfície do parasito, que dificulta a inserção das proteínas do complemento que formam o complexo de ataque na membrana do parasito, dificultando a formação de poros na membrana (PUENTES et al., 1989). Adicionalmente, o aumento da expressão de gp63 (BRITTINGHAM et al., 1995) e gp46 (LINCOLN et al., 2004), também promovem a opsonização, juntamente com o LPG, para que o parasito seja rapidamente fagocitado pelo macrófago, buscando estabelecer uma infecção.

4.7.2 Sensibilidade à lise pelo complemento de mutantes de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao SbIII

Uma vez padronizado o ensaio de lise pelo complemento, foi investigado se os parâmetros resistência ao SbIII das culturas e resistência à lise pelo sistema complemento estão correlacionados em *L. (L.) amazonensis*. Para isto foram testadas culturas sensíveis e resistentes (mutantes SbIII 1 e SbIII 2) ao antimônio trivalente à lise pelo complemento utilizando o soro humano. Os resultados deste ensaio estão mostrados na Tabela 4. Todas as culturas encontravam-se em fase estacionária de crescimento (quinto dia de cultivo).

Tabela 4: Porcentagem de sobrevivência dos promastigotas dos mutantes e da cultura selvagem à ação do Sistema Complemento presente em soro humano.

Culturas	Fator de diluição do soro						
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Selvagem	0	0,18	0,49	2,69	12,54	17,76	15,34
SbIII 1	0	0,73	2,00	6,85	19,67	26,00	17,55
SbIII 2	0	0,64	1,75	5,46	17,00	24,00	16,33

Fonte: FRADE, D.K.G. Porcentagem de sobrevivência calculada com base na concentração da amostra inicial antes da submissão ao teste (1×10^6 promastigotas/mL). Os resultados apresentados são as médias de dois experimentos em triplicata, realizados por meio de contagens independentes em câmara de Neubauer. Só foram contabilizados vivos os promastigotas com movimento. O teste *t* foi realizado para comparar a porcentagem de sobrevivência dos mutantes em relação ao tipo selvagem.

De acordo com os resultados, nota-se que da mesma forma que no experimento anterior, o fator de diluição 1:1 provocou a morte de todas as células. As diluições de 1:2 e 1:4 também apresentaram uma pequena taxa de sobrevivência, contudo, ambos os mutantes apresentaram taxa de sobrevivência significativamente maior que o tipo selvagem, bem como em todas as diluições testadas e de maneira significativa (*teste t*; $p < 0,01$).

Portanto, observa-se que os mutantes apresentaram porcentagem de sobrevivência maior por tornaram-se mais resistentes, com relação a cultura selvagem, as proteínas do complemento presentes no soro, podendo inferir que processo de resistência ao SbIII promoveu alterações nos parasitos que induziram ao aumento da resistência à lise mediada pelo sistema complemento.

Os resultados obtidos corroboram com as recentes pesquisas que relacionam a resistência à drogas com a virulência do parasito, como foi descrito por Ouakad et al. (2011), em que foi demonstrado que parasitos resistentes ao SbV provenientes de isolados clínicos apresentaram um perfil de resistência à lise pelo sistema complemento superior àquele observado em culturas sensíveis de *Leishmania donovani*.

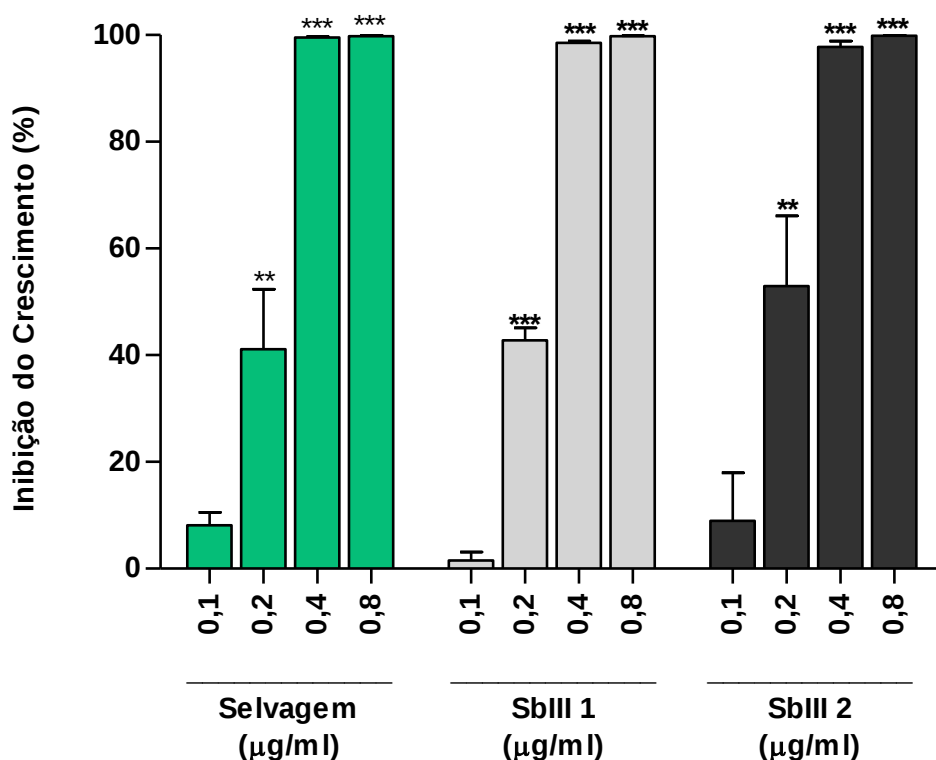
Alguns estudos vem demonstrado que a resistência à drogas pode conferir um aumento da virulência do parasito, porém os mecanismos que envolvem este processo ainda não estão esclarecidos. Contudo, Ouakad et al. (2011) sugerem que ocorre um aumento no *fitness* de mutantes de *L. donovani* resistentes ao SbV, em que foi demonstrado que as cepas resistentes desenvolveram cerca de duas vezes mais promastigotas metacíclicos que as cepas sensíveis, o qual é um processo essencial para a virulência do parasito. Além disso, estudos realizados com linhagens resistentes de *L. donovani* sugerem que estas possuem maior tolerância a diferentes condições de estresse, quando comparadas a culturas sensíveis, o que poderia promover maior taxa de sobrevivência no interior de macrófagos, aumentando a capacidade dos parasitos de lidar com as pressões naturais para estabelecer a infecção (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2015). Samant et al. (2007) mostram que ocorre um aumento da expressão de proteofosfoglicanos na superfície de parasitos de *L. donovani* resistentes ao SbV, que é uma glicoproteína considerada importante no processo de transmissão, invasão e sobrevivência intracelular dos parasitos. Ainda, Vanaerschot et al. (2011) realizaram estudos com cepas de *L. donovani* resistentes ao antimônio, que mostraram maior virulência destes parasitos, comparados com a cepa sensível, uma vez que as cepas resistentes mostraram uma capacidade claramente maior de causar infecção *in vivo* em comparação com as culturas sensíveis.

Esses resultados podem indicar que os parasitos *Leishmania* conseguem se adaptar a pressão de drogas, como os antimoniais, e ainda se tornarem mais virulentos, sugerindo que estes dois parâmetros diferentes podem estar correlacionados.

4.8 Sensibilidade dos mutantes resistentes ao SbIII à Anfotericina B

A fim de verificar se os mutantes resistentes ao SbIII obtidos neste trabalho apresentam resistência a outra droga de referência, buscou-se avaliar se eles também possuem resistência a Anfotericina B. Este ensaio foi realizado com as culturas com um nível de resistência 6,42 (SbIII 1) e 5,62 (SbIII 2) vezes maior do que o apresentado pela cultura selvagem, como mostrado no Gráfico 7.

Gráfico 5: Atividade antipromastigota da Anfotericina B em uma cultura selvagem e em mutantes de *Leishmania (L.) amazonensis*.



Fonte: FRADE, D.K.G. Os resultados apresentados são as médias de três experimentos em duplicata, realizados com as culturas cultivadas com dez vezes o valor do IC₅₀, em contagens independentes em câmara de Neubauer. Cada cultura foi testada com diferentes concentrações de Anfotericina B e incubadas por 72 horas à 25°C. O teste *t* foi realizado para comparar a porcentagem de inibição de crescimento de cada cultura em relação ao seu controle sem droga, sendo ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. O ANOVA foi utilizado para comparar os mutantes com o tipo selvagem (não significativo).

Analisando os resultados obtidos, percebe-se que as porcentagens de inibição da droga na cultura selvagem, foram bastante semelhantes ao que foi observado nos dois mutantes (SbIII 1 e SbIII 2), apresentando valores de IC₅₀ de 0,2 µg/mL (SbIII 1) e 0,16 µg/mL (SbIII 2), em comparação com a cultura selvagem que apresentou um valor de 0,2 µg/mL, não havendo diferenças significativas entre eles, indicando que os mutantes resistentes ao SbIII não apresentaram uma resistência cruzada ao fármaco de referência Anfotericina B.

Estudos mostraram que o gene *mrpa*, um membro dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), está amplificado em linhagens de *Leishmania* resistentes aos antimoniais, o qual é um membro da família de proteínas de multirresistência a drogas, desempenhando um papel importante na resistência a drogas neste parasito (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; MOREIRA et al., 2013). Desse modo, os mutantes resistentes que foram selecionados podem eventualmente apresentar resistência cruzada com outra droga, ou mesmo resistência a múltiplas drogas, uma vez que não se sabe o mecanismo que provoca o fenótipo de resistência.

O mecanismo exato da resistência aos antimoniais que envolve os transportadores ABC ainda não está totalmente esclarecido (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). No entanto, duas vias de eliminação do fármaco foram descritas. A primeira é que os compostos são sequestrados em um compartimento intracelular, e a segunda é que ocorre a eliminação direta por meio da membrana celular (OUELLETTE et al., 2004). Estudos mostram que o mecanismo de resistência exercido pelo *mrpa* está associado ao sequestro do SbIII em um compartimento intracelular em *Leishmania* (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006), porém, os mecanismos de resistência continuam a ser esclarecidos.

Um estudo realizado por Purkait et al. (2011) em isolados clínicos de *L. donovani* demonstrou que os transportadores ABC podem estar envolvidos na resistência dos parasitos à Anfotericina B. Neste estudo, foi observado que o nível de mRNA de *mdr1*, um transportador ABC envolvido no efluxo de drogas, mostrou-se três vezes superior em promastigotas resistentes do que nas formas promastigotas sensíveis à Anfotericina B, indicando uma possível participação deste transportador no mecanismo de resistência. Para a validação deste estudo, foi observado que quando utilizado o verapamil, um inibidor do efluxo de fármacos através de transportadores ABC, ocorreu uma reversão do fenótipo de resistência.

Com base nos dados obtidos, e sabendo que o mecanismo de resistência à Anfotericina B, que foi observado por Purkait et al. (2011), está relacionado ao aumento da expressão de um gene envolvido no efluxo de drogas, e sabendo que neste mesmo estudo não foi observado

diferenças no nível do mRNA do gene PgpA (*mrpa*), o qual diversos estudos demonstram o seu possível envolvimento no sequestro da droga em um compartimento intracelular, que está diretamente envolvido na resistência aos antimoniais, podemos inferir que o mecanismo de ação de resistência ao SbIII dos mutantes possivelmente não está relacionado com o efluxo da droga, mas com o sequestro da mesma.

Dessa forma, no presente estudo foram obtidos dois mutantes resistentes ao SbIII, por meio do cultivo em concentrações crescentes da droga. Houve um impacto na biologia de *L. (L.) amazonensis*, pois foi possível observar alterações morfológicas nos mutantes que eram capazes de crescer em um meio contendo dez vezes o valor do IC₅₀, as quais diminuíram com o passar dos repiques em concentrações crescentes da droga. É pertinente ampliar estes estudos realizando uma análise ultraestrutural destes parasitos e também investigando possíveis alterações bioquímicas e genéticas associados a estas diferenças morfológicas.

Um dos mutantes (SbIII 2) mostrou maior estabilidade em seu fenótipo de resistência, o que pode indicar que os mesmos podem ter adquirido diferentes mecanismos de resistência ao SbIII, sendo um dado promissor para realizar mais estudos a fim de investigar quais os mecanismos de resistência adquiridos pelos mutantes, visto que este é um processo ainda com muitas lacunas em *Leishmania* spp., podendo envolver diferentes vias celulares, como a amplificação gênica (MARY et al., 2010), a redução da capacidade de converter o SbV na forma SbIII (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004), de promover o efluxo (RAI et al., 2013) ou sequestro da droga (JEDDI et al., 2011), entre outras atividades.

Os mutantes resistentes ao SbIII apresentaram maior resistência à lise mediada pelo complemento humano em comparação com o tipo selvagem, mostrando o impacto da resistência ao SbIII em um dos parâmetros que avalia a virulência do parasito. Contudo, estudos de infecção *in vitro* e *in vivo*, utilizando os parasitos resistentes obtidos neste estudo, são necessários para esclarecer se estes parâmetros estão correlacionados em *L. (L.) amazonensis*, sendo um dado capaz de contribuir no entendimento do processo de resistência a drogas relacionado com a virulência do parasito, que implicaria em maiores dificuldades no tratamento das leishmanioses.

Conclusões

5. Conclusões

- Formas promastigotas da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* adquirem altos níveis de resistência quando expostos a crescentes concentrações de antimônio trivalente (SbIII);
- A resistência adquirida ao SbIII pode levar a alterações na morfologia de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- O fenótipo de resistência ao SbIII adquirido por formas promastigotas de *L. amazonensis* pode se expressar também nas formas amastigotas axênicas dos parasitos;
- A exposição de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* a crescentes concentrações de SbIII pode selecionar mutantes resistentes com diferentes níveis de estabilidade;
- As formas promastigotas resistentes ao SbIII mostraram-se significativamente mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento humano, quando comparado às culturas selvagens, sugerindo que os parâmetros resistência a antimoniais e virulência podem estar correlacionados em *Leishmania (L.) amazonensis*.
- Os mutantes que são resistentes ao SbIII não apresentaram resistência cruzada ao fármaco de referência Anfotericina B.

Referências

6. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular & molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AIT-LOUDHIA, K.; GAZANION, E.; OURY, B.; VERGNES, B.; SERENO, D. The fitness of antimony-resistant *Leishmania* parasites: Lessons from the field. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 141–142, 2011.
- 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, p. 29-38, 2013.
- ARRUDA, M. M. de. Leishmanioses. In: Conselhos Regionais de Medicina Veterinária dos estados do PR, SC e RS. (Org.). **Manual de Zoonoses**. 2ed. Curitiba - PR: Conselhos Regionais de Medicina Veterinária, v. I, p. 68-90, 2010.
- BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 3731-3738, 2002.
- BATES, P. A. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. **Parasitology**, v. 108 (Pt 1), p. 1-9, 1994.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **National Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097–1106, 2007.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission. Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, p. 601-609, 2004.
- BATES, P. A.; TETLEY, L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. **Experimental Parasitology**, v. 76, p. 412–423, 1993.
- BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 197–201, 1987.
- BEVERLEY, S. M. Gene amplification in *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 417-444, 1991.
- BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 427-460, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Recomendações para o Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento de Pacientes com a Coinfecção *Leishmania*-HIV**. 1.ed., Brasília, DF, 109p., 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1.ed., Brasília, DF, 122p., 2014.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K.-P.; MOSSER, D. M. Role of *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of Immunology**, v. 155, p. 3102–3111, 1995.

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

CALLAHAN, H. L.; BEVERLEY, S. M. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 18427-18430, 1991.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167-176, 2010.

COSTA, J. M. L.; COSTA, M. L. AF A. U.; ELKHOURY, A. N.; BEZERRIL, A. C. R.; BARRAL, A.; SALDANHA, A. C. R. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79 (Supl.3), p. 16-24, 2009.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 111-126, 2006.

DASSA, E.; BOUIGE, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 211-229, 2001.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491-502. 2009.

D'AVILA-LEVY, C. M.; BOUCINHA, C.; KOSTYGOV, A.; SANTOS, H. L. C.; MORELLI, K. A.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 8, p. 956-965, 2015.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

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, n. 2, p. 405–412, 2004.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 12, p. 2061-2068, 1997.

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

DOMINGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRASCASA, M.; TORAÑO A. Complement Interaction with Trypanosomatid Promastigotes in Normal Human Serum. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 451-459, 2002.

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

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

EL-LATI, S. G.; DAHINDEN, C. A.; CHURCH, M. K. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 803-6, 1994.

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

FELIZARDO, T. C.; TOMA, L. S.; BORGES, N. B.; LIMA, G. M. C.; ABRAHAMSOHN, I. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. **Parasitology**, v. 134, p. 1699–1707, 2007.

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

FRANKE, E. D.; MCGREEVY, P. B.; KATZ, S. P.; SACKS, D. L. Growth cycle dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Immunology**, v. 134, p. 2713-2718, 1985.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, p. 2317–2336, 2009.

FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. Antimony transport mechanisms in resistant *Leishmania* parasites. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 1, p. 119-132, 2014.

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, Article ID 726328, 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, p. 319–326, 2008.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; MANZANO, J. I.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, e1974, 2012.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The Immune Response to Sand Fly Salivary Proteins and Its Influence on *Leishmania* Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 110, 2012. doi:10.3389/fimmu.2012.00110.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** [online], v.36, n.1, p. 71-80. ISSN 0037-8682, 2003.

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, p. 1027-1034, 2003.

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

GÖTZE, O. The alternative pathway of activation *In*: Rother K, Till GO ed. **The complemente system**. 1ª ed. Berlin, Springer-Verlag, p. 154-67, 1988.

GRONDIN, K.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 1895-1901, 1993.

GRONDIN, K.; ROY, G.; OUELLETTE, M. Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, p. 3587-3595, 1996.

GROS, P.; BUSCHMAN, E. The mouse multidrug resistance gene family: structural and functional analysis. **International Review of Cytology**, v. 137C, p. 169-97, 1993.

HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1689-1694, 1998.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**. p. 23, 2011.

HANSEN, C.; HANSEN, E. W.; HANSEN, H. R.; et al. Reduction of Sb(V) in a human macrophage cell line measured by HPLCICP-MS. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1, p. 234-243, 2011.

HODGKINSON, V. H.; SOONG, L.; DUBOISE, S. M.; MCMAHON-PRATT, D. *Leishmania amazonensis*: Cultivation and Characterization of Axenic Amastigote-like Organisms. **Experimental parasitology**, v. 83, n. 53, p. 94-105, 1996.

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, p. 41-51, 2001.

JANEWAY, C. A. JR; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 6. ed. New York: Garland Publishing, 2005.

JEAN-MORENO, V.; ROJAS, R.; GOYENECHE, D.; COOMBS, G. H.; WALKER, J. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, v. 112, p. 21-30, 2006.

JEDDI, F., PIARROUX, R., MARY, C. Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. **Journal of Tropical Medicine**, 2011:695382, 2011.

JOCHIM, R. C.; TEIXEIRA, C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 145–147, 2009.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLINEUX, W. Transmission of leishmaniasis by the bite of a phlebotomine, possible mechanisms. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 152-154, 1981.

KRETZSCHMAR, T.; JEROMIN, A.; GIETZ, C.; BAUTSCH, W.; KLOS, A.; KÖHL, J.; et al. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 558–61, 1993.

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**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 427-434, 2004.

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, p. 205-12, 2010.

LINCOLN, L. M.; OZAKI, M.; DONELSON, J. E.; BEETHAM, J. K. Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 137, p. 185–189, 2004.

LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 539-550, 2006.

MARY, C.; FARAUT, F.; DENIAU, M.; et al. Frequency of Drug Resistance Gene Amplification in Clinical *Leishmania* Strains. **International Journal of Microbiology**, v. 2010, Article ID 819060, 8 pages, 2010.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; TAIRA, S.; SATO, Y.; FUJITA, T.; ICHIKAWA, N.; et al. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 2448–54, 1996.

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.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunology Reviews**, v. 201, p. 206-224, 2004.

MISHRA, M.; BISWAS, U. K.; JHA, D. N.; KHAN, A. B. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. **The Lancet**, v. 340, p. 1256-1257, 1992.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 2014.

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, e1167, 2011.

MOREIRA, D. S.; SANTARÉM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J.; SILVA, A. M.; et al. Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, e1469, 2012.

MOREIRA, D. S.; MONTE-NETO, R. L.; ANDRADE, J. M.; SANTI, A. M. M.; REIS, P. G.; FRÉZARD, F.; MURTA, S. M. F. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania spp.* susceptible and resistant to antimony. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 3, p. 143-153, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55-53, 1983.

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

MOSSER, D. M., EDELSON, P. J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: Parasite lysis and attachment to macrophages. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 1501–1505, 1984.

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

MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SINGH, S.; ROY, G.; GIRARD, I.; CHATTERJEE, M.; OUELLETTE, M.; MADHUBALA, R. Role of ABC transporter MRPA, γ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 204-211, 2007.

MURBACK, N. D. N.; NASCIMENTO, R. A. F.; DORVAL, M. E. M. C.; HANS FILHO, G.; NAKAZATO, K. K. O. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.

MUSKUS, C. E.; MARÍN VILLA, M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. **Biomedica**, v. 22, n. 2, p. 167-77, 2002.

NATERA, S.; MACHUCA, C.; PADRÓN-NIEVES, M.; ROMERO, A.; DÍAZ E.; PONTE-SUCRE, A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 6, p. 637–642, 2007.

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, p. 17-29, 1998.

OUAKAD, M.; VANAERSCHOT, M.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; SPEYBROECK, N.; KESTENS, L.; BOEL, L.; DE DONCKER, S.; MAES, I.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J.-C. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**, v. 138, p. 1392–1399, 2011.

OUELLETTE, M.; BORST, P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. **Research in Microbiology**, v. 142, p. 737-746, 1991.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 257-266, 2004.

OUELLETTE, M.; FASE-FOWLER, F.; BORST, P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. **The EMBO Journal**, v. 9, p. 1027–1033, 1990.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. **Journal of Immunology**, v. 125, p. 2195–2201, 1980.

PINTO-DA-SILVA, L. H.; CAMURATE, M.; COSTA, K.; OLIVEIRA, S. M. P.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SARAIVA, E. M. B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages *in vitro* and hamsters *in vivo*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1371-1377. 2002.

PODACK, E. R.; TSCHOPP, J. Polymerization of the ninth component of complement (C9): Formation of poly (C9) with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 574-78, 1982.

PONTE-SUCRE, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, p. 14, 2003.

PUENTES, S. M.; DWYER, D. M.; BATES, P. A.; JOINER, K. A. Biding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 3743-3749, 1989.

PUENTES, S. M.; SACKS, D. L.; Da SILVA, R. P.; JOINER, K. A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 3, p. 887-902, 1988.

PURKAIT, B.; KUMAR, A.; NANDI, N.; et al. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 56, n. 2, p. 1031-1041, 2012.

RAI, S.; BHASKAR; GOEL, S. K.; NATH DWIVEDI, U.; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Role of Efflux Pumps and Intracellular Thiols in Natural Antimony Resistant Isolates of *Leishmania donovani*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e74862, 2013.

READY, P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227-250, 2013.

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N. S.; NÉRIS, P. L. N., ROCHA, J. C.; SCOTTI, M. T.; et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

SAAR, Y.; RANSFORD, A.; WALDMAN, E.; MAZAREB, S.; AMIN-SPECTOR, S.; PLUMBLEE, J.; TURCO, S. J.; ZILBERSTEIN, D. Characterization of developmentally regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, p. 9-20, 1998.

SACKS, D. L. Developmental biology of *Leishmania* promastigotes. In: ENGLUND, P.T., SHER, A., (ed). **The biology of parasitism**. New York: Alan R. Liss., p. 93-103, 1988.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, p. 225–233, 1990.

SAMANT, M.; SAHASRABUDDHE, A. A.; SINGH, N.; GUPTA, S. K.; SUNDAR, S.; DUBE, A. Proteophosphoglycan is differentially expressed in sodium stibogluconate-sensitive and resistant Indian clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Parasitology**, v. 134, p. 1175–1184, 2007.

SANTOS FERREIRA, C.; MARTINS, P. S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLETTE, M.; FREZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biometals**, v. 16, p. 441–446, 2003.

SARAIVA, E. M.; PINTO-DA-SILVA, L. H.; WANDERLEY, J. L. M.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A.; MOREIRA, M. E. C. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 39–47, 2005.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. **Parasitology Research**, v. 83, n. 4, p. 401-3, 1997.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 3097-102, 1998.

SHAKED-MISHAN, P.; ULRICH, N.; EPHROS, M.; ZILBERSTEIN, D. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 3971–3976, 2001.

da SILVA, I. A.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B. L.; et al. *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**, vol. 2015, Article ID 393049, 15 pages, 2015.

SILVA, W. D.; KIPNIS, T. L. Sistema complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural e um mediador de interações celulares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 30, p. 67-72, 1984.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *L.*(*L.*) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423–431, 2009.

SOARES, R. P. P.; CRADOSO, T. L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M. S. S.; PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal of Parasitology**, v. 35, p. 245-253, 2004.

SPÄTH, G. F.; GARRAWAY, L. A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, 2003.

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, p. 187-189, 2001.

VANAERSCHOT, M.; MAES, I.; OUAKAD, M.; ADAUI, V.; MAES, L.; DONCKER, S. DE; RIJAL, S.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J.-C.; DECUYPERE, S. Linking *in vitro* and *in vivo* survival of clinical *Leishmania donovani* strains. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, e12211, 2010.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: burden of disease**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/about_disease/en/> Acesso em: 10 Out 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/TDR - Parasitic Diseases (2015), *Leishmaniasis*. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 20 Set 2015.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 158, n. 6, p. 2016-23, 1983.

YARDLEY, V.; ORTUNO, N.; LLANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F.; DONCKER, S.D.; RAMIREZ, L.; CROFT, S.; AREVALO, J.; ADAUI, V.; BERMUDEZ, H.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J. C. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 8, p. 1168-1175, 2006.

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. **Parasitology**, v. 116, p. 305-309, 1998.

ZICCARDI, R. J. Nature of the metal ion requirement for assembly and function of the first component of human complement. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 6187-92, 1983.

Anexo

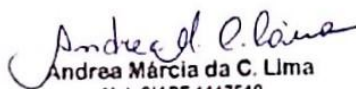


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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 10ª Reunião realizada no dia 19/11/2015, o Projeto de pesquisa intitulado: **“ANÁLISE DE UMA POSSÍVEL CORRELAÇÃO ENTRE A RESISTÊNCIA A DROGAS E VIRULÊNCIA EM LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS”**, da pesquisadora Daiana Karla Gomes Frade. Prot. nº 0503/15. CAAE: 48947415.2.0000.5188.

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


Andrea Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB