

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

RENATA MONTI ROCHA

**CORRELAÇÃO ENTRE SENSIBILIDADE *in vitro* DE ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Leishmania chagasi* À MILTEFOSINA E RESPOSTA AO TRATAMENTO.**

VITÓRIA

2012

RENATA MONTI ROCHA

**CORRELAÇÃO ENTRE SENSIBILIDADE *in vitro* DE ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Leishmania chagasi* À MILTEFOSINA E RESPOSTA AO TRATAMENTO.**

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

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Elenice Moreira Lemos.

VITÓRIA

2012

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

---

R672c Rocha, Renata Monti, 1987-  
Correlação entre sensibilidade *in vitro* de isolados clínicos de  
*Leishmania chagasi* à miltefosina e resposta ao tratamento /  
Renata Monti Rocha. – 2012.  
77 f. : il.

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

1. *Leishmania chagasi*. 2. Miltefosina. 3. Ensaio *in vitro*. 4.  
Expressão gênica. I. Lemos, Elenice Moreira. II. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.  
Título.

CDU: 61

---

Aos meus pais e irmão, pelo amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de ir em busca dos meus sonhos. Obrigada Senhor, por ter colocado pessoas tão maravilhosas no meu caminho!

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Elenice Moreira Lemos, te admiro pela sua força para enfrentar os momentos difíceis pelo qual passou. Obrigada por todos os ensinamentos, por confiar no meu trabalho, e por sempre me estimular a ser cada vez melhor.

Ao Dr. Reynaldo Dietze, pelos inúmeros ensinamentos sobre as leishmanioses. Aprendi muito acompanhando seus pacientes. Além disso, o apoio e o incentivo que me forneceu todas as vezes que precisei foram fundamentais para o meu trabalho.

À Professora Silvane Murta e todos os amigos do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do René Rachou, obrigada pelos ensinamentos de qPCR e por terem me acolhido de uma forma tão agradável.

À Aretha, serei eternamente grata pela paciência em me ensinar. Sinto falta da amizade, e de todos os momentos engraçados que vivemos no laboratório!

À Laura, obrigada por todo o auxílio nos experimentos. Confio muito no seu trabalho. Além disso, você sempre foi uma grande amiga, o que tornou nossos momentos de trabalho muito mais agradáveis!

Ao Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, por sempre compartilhar todo seu conhecimento tanto nas aulas, quanto nas conversas informais na copa. Obrigada por sempre estar disponível para esclarecer minhas dúvidas!

À Solange Alves Vinhas, pela disposição em sempre me ajudar no cultivo celular. Aprendi muito com você.

Aos amigos do laboratório: Aline, Camila, Giuliana, Juliana, Kamila, Laura, Lygia, Marco André e Mariela, e a agregada Maria José, minha eterna gratidão. Além de sempre estarem dispostos a me ajudar nos experimentos, vocês fizeram muito mais

que isso. Foram meus parceiros em todos os momentos, me trazendo alegria sempre, dentro e fora do laboratório. Adoro vocês!

Aos funcionários do NDI, Andrigo, Canal, Eliseu, Lelê, Maria, Maria Emília e Rose, pela disposição em sempre me ajudar. Muito obrigada.

Aos colegas do mestrado, em especial a Cristiane, Fabíola, Joaquim e Robson, pelo companherismo durante as disciplinas. Nossas conversas tornaram esses momentos mais leves... obrigada por tudo.

Agradeço a meu pai e minha mãe, que sempre me permitiram lutar pelos meus sonhos. Obrigada por entenderem a minha ausência em muitos momentos, pela paciência em ouvir minhas angústias, e por comemorarem comigo as vitórias. Amo vocês.

Ao meu irmão e minha cunhada, sou grata pelo interesse de vocês em sempre querer saber como estava mestrado. Nossas conversas faziam com que eu sempre me animasse mais. E sobretudo, obrigada pela hospedagem em BH. Não sobrevieria tanto tempo longe de casa, se não tivesse vocês!

A toda minha família, tios, primos e vovó Derly, que mesmo sem entender ao certo o que eu fazia, me deram todo o apoio o carinho!

Às minhas amigas pessoais, Carol, Karla, Larissa e Patrícia, por sempre se preocuparem com essa etapa da minha vida, me dando toda a força e carinho que precisei. Obrigada por ouvirem pacientemente tantas reclamações, e por estarem presentes na minha vida. Vocês moram no meu coração!

Aos amigos da UFES, Aline, Babi, Lara, Leandro, Mauro, Milena e Pedro, por terem vivido comigo todas as expectativas, desde a iniciação científica. A amizade de vocês sempre me fortaleceu para seguir em frente!

À CAPES, CNPq e ao NDI, por todo auxílio financeiro.

E, sobretudo, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para essa vitória. Muito obrigada!

“Quando a noite esconde a luz, Deus acende as estrelas.”

Pe. Fábio de Melo

## RESUMO

A miltefosina tem sido utilizada com sucesso para o tratamento de LV na Índia, com um índice de cura de 94%. Entretanto, um ensaio clínico realizado pela primeira vez no Brasil demonstrou que cerca de 50% dos pacientes com LV apresentou falha após o tratamento. Uma hipótese para justificar a ocorrência de falha terapêutica em pacientes tratados no Brasil seria a ocorrência de sensibilidade variada à miltefosina entre os isolados de *L. chagasi*. A variação na sensibilidade à miltefosina tem sido relacionada a diferenças na capacidade de internalização da droga como resultado direto de um defeito na maquinaria de translocação presente na membrana celular da *Leishmania*, composta por pelo menos duas proteínas, LdMT, e sua subunidade  $\beta$ , LdRos3. Sendo assim, os objetivos desse estudo foram avaliar se há correlação entre a sensibilidade *in vitro* à miltefosina de isolados de *L. chagasi* com a resposta ao tratamento, e correlacionar a suscetibilidade à miltefosina com a expressão de proteínas relacionadas à sua maquinaria de translocação. Utilizando ensaios de infecção de macrófagos, os resultados obtidos mostraram que todos os isolados de pacientes curados após o tratamento foram sensíveis *in vitro* à miltefosina ( $CI_{50}$  2,6 - 7,94  $\mu$ M), enquanto 10 dos 12 isolados de pacientes que apresentaram falha ao tratamento mostraram-se resistentes ( $CI_{50}$  > 15  $\mu$ M). Os dois isolados que mostraram-se sensíveis antes do tratamento tornaram-se resistentes, mostrando a aquisição de resistência durante o tratamento. Esses dados sugerem que a falha de tratamento observada em pacientes portadores de LV no Brasil está relacionada a resistência do parasita à droga. Por outro lado, a análise da expressão gênica de proteínas responsáveis pela captação da miltefosina não mostrou diferença entre os isolados sensíveis e resistentes. Diante destes resultados acreditamos que o monitoramento da sensibilidade de isolados clínicos de *Leishmania* à miltefosina seja de grande relevância para prever falha de tratamento. Além disso, considerando que testes *in vitro* de infecção de macrófagos são laboriosos e demorados, a busca de marcadores de resistência utilizando metodologias mais simples e rápidas é importante para facilitar esse monitoramento.

Palavras-chave: *L. chagasi*. Miltefosina. Ensaio *in vitro*. Expressão gênica.

## ABSTRACT

The miltefosine has been used successfully for treatment of VL in India, with a cure rate of 94%. However, a clinical trial demonstrated that, in Brazil, about 50% of patients with VL failed after treatment. One hypothesis to explain the occurrence of therapeutic failure in patients treated in Brazil would be the occurrence of variable sensitivity to miltefosine among *L. chagasi* isolate. The variation in the sensitivity to miltefosine has been related to differences in the ability to internalize the drug as a direct result of a defect in the translocation machinery present in the cell membrane of *Leishmania*, comprising at least two proteins, LdMT and its  $\beta$  subunit, LdRos3. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the correlation of *in vitro* sensitivity to miltefosine in *L. chagasi* isolates with the response to treatment, and correlate miltefosine susceptibility with the expression of proteins related to their translocation machinery. Using macrophage infection assays, our results showed that all strains obtained from patients cured after treatment were susceptible to miltefosine *in vitro* (IC<sub>50</sub> 2.6 - 7.94 mM), whereas 10 of 12 samples of patients who presented treatment failure were resistant (IC<sub>50</sub>> 15 mM). Those two isolates that were sensitive pre-treatment have become resistant, indicating the acquisition of resistance during the treatment. Therefore, these data suggest that the treatment failure observed in patients with VL in Brazil is related to parasite drug resistance. On the other hand, the analysis of gene expression of proteins responsible for miltefosine uptake showed no difference between sensitive and resistant isolates. Considering these results, we believe that monitoring the sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* to miltefosine is highly relevant for predicting treatment failure. Moreover, since *in vitro* infection of macrophages used to evaluate the parasite sensitivity to the drug is laborious and time consuming, the search for drug resistance markers using simple and rapid methods is important to facilitate this monitoring.

**Keywords:** *L. chagasi*. Miltefosine. *In vitro* assay. Gene expression.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

Ct - Threshold cycle

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GFP – Green fluorescent protein

CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória de 50%

LbMT – *Leishmania braziliensis* Miltefosine Transporter

LbRos3 – *Leishmania braziliensis*  $\beta$  subunit for LdMT

LC – Leishmaniose cutânea

LcMT - *Leishmania chagasi* Miltefosine Transporter

LcRos3 - *Leishmania chagasi*  $\beta$  subunit for LdMT

LdMT - *Leishmania donovani* Miltefosine Transporter

LdRos3 - *Leishmania donovani*  $\beta$  subunit for LdMT

LIT - Liver Infusion Tryptose

LV – Leishmaniose visceral

NNN – Novy-MacNeal-Nicolle

PBS - Phosphate buffered saline

PCR – Polymerase Chain Reaction

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RPMI – Roswell Park Memorial Institute médium

SFB - Soro fetal bovino

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 - Distribuição geográfica da LV no velho e novo mundo.** Fonte: WHO (2010). .....21

**Figura 2 - Ciclo de transmissão das espécies de Leishmania causadoras de LV.** Fonte: Adaptado de CDC (2010). .....22

**Figura 3 - Ligação e captação da miltefosina (MIL) em parasitas de Leishmania.** (A) Ligação do fármaco à região extracelular da membrana plasmática. A miltefosina é recrutada pela soro albumina bovina (BSA), que atua como reservatório do fármaco. (B) A fração ligada a membrana plasmática é internalizada por proteínas com atividade “flipase” (F), presentes na bicamada lipídica. Essa maquinaria de translocação inclui ainda duas proteínas da membrana plasmática: o transportador de miltefosina LdMT e sua subunidade LdRos3. Fonte: Adaptado de Pérez-Victória *et al.* (2006a) .....28

**Figura 4 - Ensaio in vitro utilizando diferentes concentrações de miltefosina.** (A) Cultura com 30  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (B) Cultura com 15  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (C) Cultura com 5  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (D) Cultura com 1,67  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (E) Cultura com 0,55  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (F) Controle sem miltefosina. ....47

**Figura 5 - Curva dose-resposta ilustrativa da diferença entre o  $\text{IC}_{50}$  de isolados de *L. chagasi* antes e após o tratamento com miltefosina.** (A) Isolado sensível que tornou-se resistente após o tratamento. (B) Isolado resistente que manteve a resistência após o tratamento e no momento da falha.....50

**Figura 6 – Gel de agarose representativo das análises após a produção do cDNA.** As bandas positivas possuem 238 bp. Poços de 1-10: Bandas positivas para

cDNA. Poço 11: Peso molecular. Poço 12: Controle negativo. Poço 13: Controle positivo. Poços 14-22: Reações sem a transcriptase reversa. ....51

**Figura 7 – Medida da eficiência de amplificação relativa para os três genes utilizados no estudo.** Alvos com eficiências similares (curvas paralelas) podem ser comprados em qualquer ponto de diluição. Alvos com eficiências similares (curvas paralelas) podem ser comprados em qualquer ponto de diluição. A: LcRos3; B:LcMT; C:GAPDH. ....52

**Figura 8 – Níveis de expressão dos genes LcMT e LcRos3 em diferentes isolados clínicos, representado pela razão de expressão gênica relativa à cepa de referência de *L. chagasi*.** Os níveis de expressão em azul representam isolados sensíveis in vitro, e os em vermelho representam isolados resistentes in vitro à miltefosina. (A) Análise de expressão gênica para o transportador de miltefosina LcMT. (B) Análise de expressão gênica para a subunidade  $\beta$  LcRos3. Os dados representam a média de pelo menos dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. ....55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Sequência dos genes amplificados na PCR quantitativa.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes que responderam ou não ao tratamento com miltefosina. ....</b>	<b>46</b>
<b>Tabela 3 - Sensibilidade in vitro à miltefosina de isolados de <i>L. chagasi</i> obtidos de pacientes com diferentes respostas ao tratamento. ....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 4 - Sensibilidade in vitro à miltefosina em isolados obtidos antes do tratamento, após o tratamento e no momento da falha terapêutica. ....</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 5 - Resultado das curvas de eficiência de amplificação relativa para os três genes estudados . ....</b>	<b>53</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	34
4.2 PACIENTES E PARASITAS.....	34
4.3 CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS.....	35
4.4 ENSAIOS <i>in vitro</i> DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	36
<b>4.4.1 Preparo das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp. para os ensaios <i>in vitro</i> de infecção de macrófagos murinos</b> .....	36
<b>4.4.2 Droga</b> .....	36
<b>4.4.3 Ensaio <i>in vitro</i> de atividade anti-<i>Leishmania</i></b> .....	37
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO (qPCR).....	38
<b>4.5.1 Preparo das formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> para os ensaios de qPCR</b> .....	38
<b>4.5.2 Extração de RNA</b> .....	38
<b>4.5.3 Síntese de cDNA</b> .....	39
<b>4.5.4 PCR quantitativo</b> .....	40
4.5.4.1 Controle endógeno.....	40
4.5.4.2 Determinação da eficiência de amplificação.....	41
4.5.4.3 Determinação da expressão gênica.....	41
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43

<b>5 RESULTADOS</b> .....	44
5.1 SENSIBILIDADE IN VITRO À MILTEFOSINA DOS ISOLADOS DE <i>L. chagasi</i> .....	45
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	51
5.2.1 Síntese de cDNA.....	51
5.2.2 Avaliação da eficiência de amplificação dos iniciadores.....	52
5.2.3 Análise relativa da expressão gênica por qPCR.....	53
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	66

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

As primeiras drogas anti-*Leishmania*, os antimoniais pentavalentes, foram inicialmente utilizados nas décadas de 1920-1940 e ainda são os agentes de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral (LV). Embora seja possível obter índices de cura de até 90% com estes medicamentos, existem várias desvantagens em relação a sua utilização; o tratamento é longo (20-28 dias) (HERWALDT E BERMAN, 1992; BRASIL, 2003), os efeitos colaterais são frequentes, podendo em alguns casos levar ao óbito, e são drogas de uso parenteral exclusivo. O desoxicolato sódico de anfotericina B é a droga de segunda escolha para o tratamento da doença. Apesar de ser o medicamento anti-*Leishmania* mais potente disponível, seu uso é restrito à via parenteral e seus efeitos colaterais são freqüentes (THAKUR *et al.*, 1999). As novas formulações da anfotericina B (dispersão coloidal e liposomal) são menos tóxicas que o desoxicolato, porém apresentam custo elevado e podem ser utilizadas apenas por via parenteral (BERMAN *et al.*, 1998; MURRAY, 2004).

Um dos maiores avanços na pesquisa de drogas com atividade anti-*Leishmania* foi a descoberta de uma droga oral, a miltefosina (CROFT, SEIFERT E DUCHERE, 2003). A miltefosina é uma acilfosfocolina, inicialmente desenvolvida como droga anti-câncer, que também mostra atividade anti-*Leishmania*. A miltefosina tem sido utilizada com sucesso para o tratamento de LV na Índia, com um índice de cura de 94%, incluindo os casos resistentes ao tratamento convencional com antimoniais pentavalentes (SUNDAR *et al.*, 2002a). Um ensaio clínico realizado pela primeira vez no Brasil para avaliar a eficácia da miltefosina em pacientes portadores de LV, demonstrou que diferente dos resultados encontrados nos ensaios clínicos desenvolvidos na Índia, cerca de 50% dos pacientes avaliados no Brasil apresentou falha após o tratamento, levando à interrupção do estudo. Uma hipótese para justificar a ocorrência de falha terapêutica em pacientes tratados no Brasil seria a ocorrência de sensibilidade variada à miltefosina entre os isolados de *Leishmania chagasi*.

A variação na sensibilidade à miltefosina tem sido relacionada a diferenças na capacidade de internalização desse fármaco (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2003a). A inabilidade em captar a miltefosina tem sido descrita como resultado direto de um defeito na maquinaria de translocação presente na membrana celular da *Leishmania*. Essa maquinaria é composta por pelo menos duas proteínas, LdMT, um membro da subfamília P4 das ATPases envolvidas na translocação de fosfolipídeos e sua subunidade  $\beta$ , LdRos3, membro da família Lem3/CDC50, descritas em *Leishmania donovani* e *Leishmania braziliensis* (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2003b, 2006b; SÁNCHEZ-CAÑETE *et al.*, 2009).

Neste contexto, um dos objetivos deste estudo foi avaliar se há correlação entre a sensibilidade *in vitro* à miltefosina de isolados de *L. chagasi* com a resposta ao tratamento. Além disso, este estudo pretende também correlacionar a suscetibilidade à miltefosina com a expressão de mRNA de proteínas relacionadas à maquinaria de translocação da miltefosina, com o objetivo de explorar seu potencial como marcadores de resistência à miltefosina em isolados clínicos de *L. chagasi*.

# ***REVISÃO DA LITERATURA***

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Os relatos de LV na história aparecem principalmente após 1824. Nesse ano, um surto crônico de febre ocorreu em Jessore (Bangladesh), acompanhado de caquexia marcante, anemia e resistência a quinina. Esse surto alcançou a cidade de Burdwan em 1862 e passou a ser chamado de “febre Burdwan”, “doença negra” ou “kala azar”. Relatos de baço aumentado, febre intermitente ou remitente e resistência a quinina foram descritos nesses surtos. Em 1898, Rogers e Ross chegaram à conclusão que o kalazar era uma forma virulenta de malária, apesar de nenhuns ou poucos parasitas da malária terem sido encontrados nos pacientes investigados (COX, 1996).

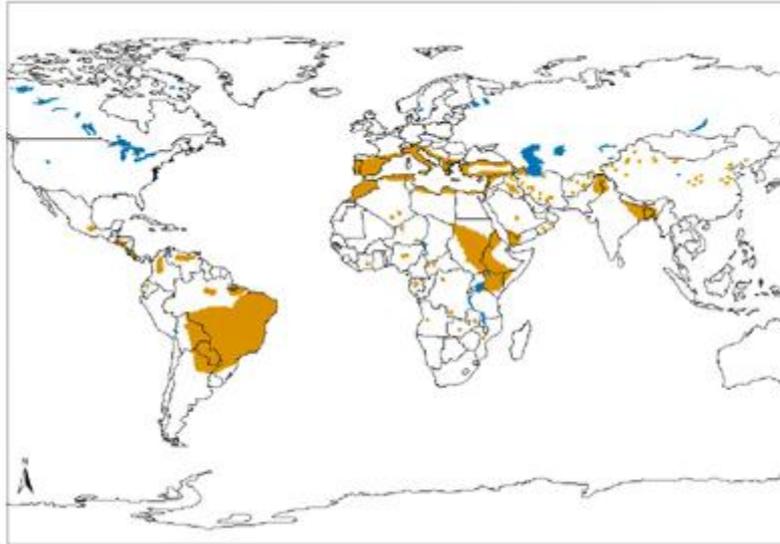
Em 1900, o médico escocês William Leishman reconheceu os parasitas causadores do kalazar pela primeira vez. Leishman utilizou sua própria versão da coloração de Romanowsky para corar esfregaços do baço de um soldado de Dum Dum, Calcutta, que havia morrido de disenteria com emagrecimento e aumento do baço. O médico então sugeriu que os parasitas poderiam ser “tripanosomas”. Donovan, professor da Universidade de Madras (hoje Channai, Índia), enviou em 1903 para Ronald Ross um esboço do parasita que havia encontrado no baço de um paciente que sofria de febre remitente e aumento do baço. Como os parasitas descritos por Leishman e Donovan pareciam ser os mesmos, Ross criou em 1903 o gênero *Leishmania* em homenagem aos descobridores. As formas do parasita no baço passaram a ser referidas como corpos de Leishman-Donovan e o parasita foi chamado de *Leishmania donovani* (COX, 1996).

Nas Américas, o primeiro caso autóctone registrado foi diagnosticado no Paraguai por Migone em 1913, tendo sido posteriormente assinalados outros na Argentina, Brasil, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Guatemala, México, El Salvador, Honduras, Suriname e Guadalupe (LAINSON *et al.*, 1986).

No Brasil, casos de LV começaram a ser relatados em 1934, quando o médico Henrique Penna examinou amostras de fígado de pacientes que haviam supostamente morrido de febre amarela em várias áreas rurais. O médico

comprovou que 41 amostras continham formas de *Leishmania*. Carlos Chagas, famoso por descobrir as formas de *Tripanosoma cruzi*, enviou seu filho Evandro Chagas a Belém, Pará, para estudar a LV. Em 1937, Chagas e Cunha deram o nome de *Leishmania chagasi* ao parasita causador da LV no Brasil em homenagem a Carlos Chagas que havia falecido no ano anterior (COX, 1996). O nome *L. chagasi* foi dado ao agente etiológico da LV na América do Sul para distingui-la da *Leishmania infantum* e *L. donovani*. A princípio, a *L. chagasi* foi considerada uma espécie a parte porque não infectava animais de laboratório e sorologicamente era diferente das outras espécies de *Leishmania*. Da Cunha e Adler, em 1938, demonstraram que *L. chagasi* infectava hamsters e Da Cunha, ainda mostrou que cachorros também poderiam ser infectados (ADLER, 1940).

Atualmente, sabe-se que a LV é uma infecção sistêmica causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, a qual é fatal se não tratada. A LV é causada pelas espécies *L. donovani* no continente indiano, Ásia e África; *L. infantum* na base do mediterrâneo e *L. chagasi* (sinonímia *L. infantum*) na América do Sul. Essa doença é endêmica em regiões tropicais e subtropicais, e na base do Mediterrâneo. A estimativa é de 500.000 novos casos anuais no mundo, dos quais cerca de 90% ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Ocorre em quatro continentes (Américas, Europa, Ásia e África), com distribuição geográfica representada na figura 1 (WHO, acesso em 08 dez. 2011).



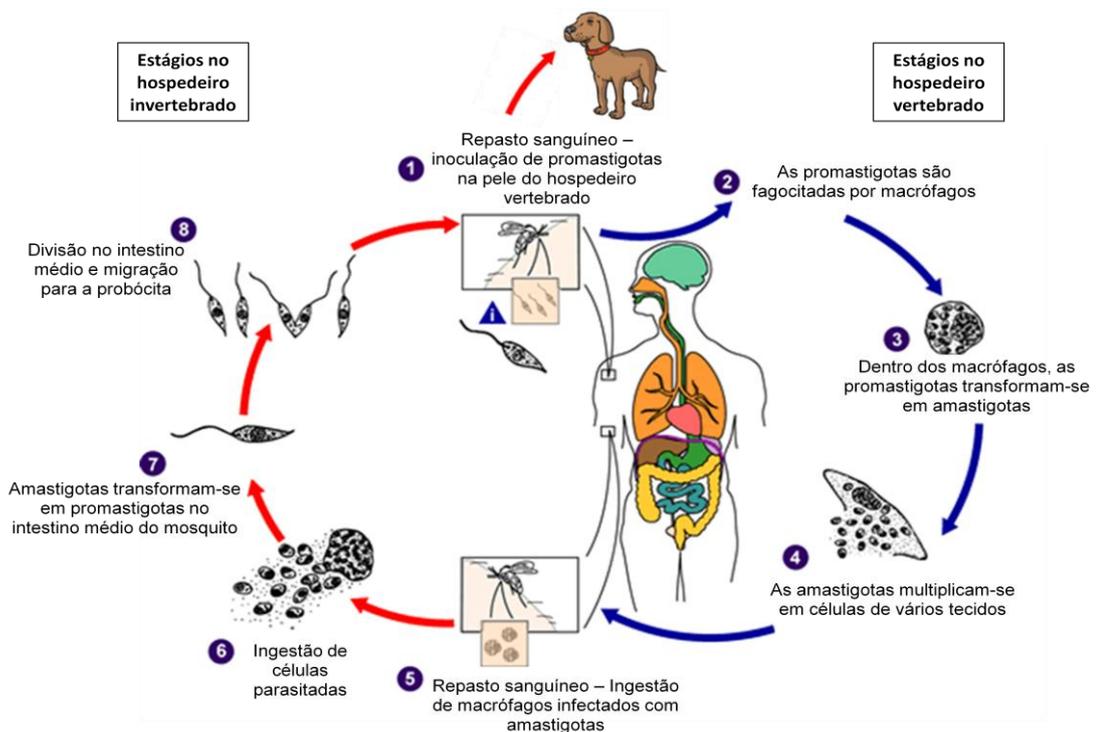
**Figura 1 - Distribuição geográfica da LV no velho e novo mundo.**

Fonte: WHO (2010).

Nas Américas, a LV humana ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que 90% dos casos registrados ocorrem no Brasil, onde está distribuída em 19 das 27 unidades federativas, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que, a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste passou a representar 77% dos casos do País. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), foram 48.455 casos de LV no Brasil. Nos últimos dez anos, a média anual foi de 3.156 casos no país e a incidência foi de dois casos / 100.000 habitantes (BRASIL, 2006).

O principal mecanismo de transmissão de *L. chagasi* em condições naturais ocorre através da picada da fêmea do mosquito vetor (flebotomíneo) que ao realizar seu repasto sanguíneo, deposita na pele do hospedeiro vertebrado as formas promastigotas infectantes. As promastigotas após serem fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário se diferenciam em amastigotas e iniciam o processo de reprodução assexuada por divisão binária. Quando os macrófagos estão densamente parasitados, rompem-se liberando as amastigotas que irão

parasitar novos macrófagos. Ao se alimentar em um hospedeiro vertebrado infectado, o mosquito vetor ingere com o sangue os macrófagos parasitados que, ao chegarem ao intestino do mosquito, se transformam em promastigotas (Figura 2) (SACKS E KAMHAWI, 2001).



**Figura 2 – Ciclo de transmissão das espécies de *Leishmania* causadoras de LV.**

Fonte: Adaptado de CDC (2010).

A infecção causada por *L. chagasi* apresenta um espectro clínico amplo que varia desde formas completamente assintomáticas, passando por formas clínicas com sintomatologia discreta ou moderada, até aquelas de apresentação mais grave (DIETZE E CARVALHO, 2003). No Brasil, a proporção é de 8 a 18 assintomáticos para um caso sintomático (BADARÓ *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992; COSTA *et al.*, 2002). A forma clínica é caracterizada por febre prolongada, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (WERNECK *et al.*, 2003).

Os primeiros fármacos para o tratamento da LV foram os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina (Glucantime) e estibogluconato de sódio (Pentostan), que permanecem como a primeira linha de tratamento em muitos países (MATLASHEWSKI *et al.*, 2011). Inicialmente, o esquema terapêutico era de 10mg/kg por 6-10 dias, com taxa de cura acima de 90%. Porém, após o primeiro caso de falha ao tratamento ocorrido na Índia vinte anos após o início de seu uso, maiores doses e esquemas prolongados de antimonial pentavalente (acima de 20 mg/Kg por 30 dias) foram introduzidos gradualmente e em paralelo com o aumento nas taxas de não resposta a esse fármaco. A diminuição na eficácia do tratamento com antimonial e a emergência de parasitas resistentes a esse fármaco na Índia prova que o parasita conseguiu se adaptar a pressão da droga (RIJAL *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2000b). Porém, continuam sendo a primeira escolha em muitas áreas endêmicas para LV, incluindo o Brasil, com eficácia entre 90-95% (MALTEZOU *et al.*, 2000; MINODIER *et al.*, 1998; RAGUENAUD *et al.*, 2007; GRADONI *et al.*, 2008). O baixo custo é a maior vantagem, entretanto as desvantagens incluem administração intramuscular, tratamento prolongado, com efeitos adversos ocasionais que podem proporcionar risco de vida, como arritmia cardíaca, aumento das transaminases hepáticas, pancreatite e pneumonia (MALTEZOU *et al.*, 2000; MINODIER *et al.*, 1998; RAGUENAUD *et al.*, 2007; SUNDAR *et al.*, 2000b).

A anfotericina B desoxicolato tem sido usada como segunda linha de tratamento para LV desde a década de 1960 (MALTEZOU, 2009), e induz altas taxas de cura (acima de 97%) em doses de 0,75-1,00 mg/Kg em 15 infusões em dias alternados. As desvantagens incluem prolongada administração e efeitos adversos freqüentes, como febre e calafrios relacionados à infusão, nefrotoxicidade e hipocalcemia (SUNDAR *et al.*, 2007).

A necessidade de desenvolver uma formulação menos tóxica de anfotericina B levou ao desenvolvimento de três novas preparações clínicas nas quais o desoxicolato foi substituído por outros lipídeos: anfotericina B lipossomal (AmBisome®), anfotericina B dispersão coloidal (Amphocil®) e anfotericina B complexo lipídico (Abelcet®). Essas formulações são captadas seletivamente pelo sistema retículo-endotelial,

onde os parasitas de *Leishmania* residem, diminuindo a ação tóxica sobre o rim (BERMAN *et al.*, 1998). A principal formulação é a anfotericina B lipossomal, que atualmente é a primeira linha de escolha para tratamento em países endêmicos da Europa e em outros países desenvolvidos, já que as taxas de cura são próximas a 100% com esquema de 3-5 dias de tratamento, tornando-se mais conveniente para o paciente e diminuindo os custos com o sistema de saúde (GRADONI *et al.*, 2008; TAKUR *et al.*, 1996; SUNDAR *et al.*, 2002b). Entretanto, em países pobres esse tratamento é inacessível e a seleção de fármacos para tratar a LV torna-se mais dificultada pelo custo do que pela eficácia ou toxicidade (GRADONI *et al.*, 2008; SUNDAR *et al.*, 2007).

Um dos maiores avanços para o tratamento das leishmanioses foi a descoberta da miltefosina. A miltefosina, uma fosforilcolina éster de hexadecanol (hexadecilfosfocolina), foi sintetizada pelo Max-Planck-Institut (Alemanha), e utilizada com sucesso para tratar metástases em pacientes com câncer. Entretanto, esse fármaco não pode ser desenvolvido como um agente oral devido à toxicidade gastrointestinal, e apenas uma formulação tópica foi aprovada para tratar metástases de pele (VERWEIJ *et al.*, 1992; DUMMER *et al.*, 1993).

A atividade *in vitro* e *in vivo* anti-*Leishmania* da miltefosina foi inicialmente descrita por CROFT *et al.* em 1987; e em 1992 sua atividade foi demonstrada após a administração oral em animais (KUHLENCORD *et al.*, 1992).

O primeiro ensaio clínico realizado para demonstrar a eficácia da miltefosina no tratamento da LV humana foi realizado por Sundar *et al.*, em 1998, na Índia. Nesse estudo, os pacientes foram divididos em seis grupos de tratamento com diferentes doses de miltefosina durante 28 dias. Os resultados demonstraram que 95% dos pacientes tratados com doses acima de 100mg/dia curaram, incluindo aqueles que haviam apresentado previamente falha no tratamento com antimonial pentavalente. Posteriormente, o mesmo resultado foi encontrado por Jha *et al.*, em 1999.

Uma vez que a dose efetiva de miltefosina havia sido estabelecida, este tratamento foi comparado ao tratamento padrão com anfotericina B, considerado o mais efetivo para LV. Nesse estudo, pacientes com idade acima de 12 anos foram tratados com

miltefosina na dose de 50 ou 100 mg (cerca de 2,5 mg/Kg), por 28 dias, e o grupo tratado com anfotericina B recebeu 1 mg/Kg em dias alternados, no total de 15 infusões. Os resultados demonstraram um índice de cura de 97% para miltefosina e 100% para anfotericina B (SUNDAR *et al.*, 2002a). Em março de 2002, a miltefosina (Impavido™) foi aprovada como a primeira droga de administração oral para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006). Posteriormente, estudos de fase IV realizados na Índia para avaliar a viabilidade do tratamento com miltefosina confirmaram os índices de cura de 95% (BHATTACHARYA *et al.*, 2007).

Diversos ensaios clínicos também avaliaram a eficácia da miltefosina para tratar outras formas de leishmanioses. Para leishmaniose cutânea (LC), os estudos revelaram diferentes respostas à miltefosina. Soto *et al.* (2001) realizaram um ensaio clínico na Colômbia para tratamento de LC em infecções causadas por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania panamensis*. Os índices de cura foram de 94% para os pacientes tratados com alta dose do fármaco (133-150 mg/dia por 3-4 semanas), e de 66% para doses entre 50-100 mg/dia por 3 semanas. Outro estudo realizado pelo mesmo grupo, em 2004, no qual os pacientes foram tratados com 2,5 mg/Kg/dia de miltefosina por 28 dias, revelou índices de cura para LC de 91% na Colômbia (infecções por *L. panamensis*). Na Guatemala, a taxa de cura para *L. braziliensis* foi metade em relação à *Leishmania mexicana* (*L. braziliensis* – 33%; *L. mexicana* – 60%) (SOTO *et al.*, 2004). Em 2008, um novo estudo realizado por Soto *et al.* na Bolívia encontrou 88% de cura para pacientes tratados com 2,5 mg/Kg/dia de miltefosina por 28 dias, em infecções por *L. braziliensis*. Esses resultados foram similares ao de um estudo realizado no Brasil, no qual os pacientes foram submetidos ao mesmo regime de tratamento e mostraram índices de cura de 75% em infecções por *L. braziliensis* (MACHADO *et al.*, 2010). Para infecções por *Leishmania guyanensis*, o mesmo regime de tratamento mostrou índices de cura de 71,4% (CHRUSCIAK-TALHARI *et al.*, 2011). Para leishmaniose mucosa, Soto *et al.* (2007) realizaram um estudo em que pacientes com infecção por *L. braziliensis* foram tratados com 2,5 mg/kg/dia de miltefosina por 28 dias. Os índices de cura encontrados foram de 83% em pacientes com a forma branda da doença e 58% para a forma grave.

Estes estudos, portanto sugerem que a taxa de cura utilizando miltefosina pode variar em diferentes áreas geográficas dependendo da sensibilidade à miltefosina das espécies de *Leishmania* mais prevalentes.

Corroborando esses achados, uma alta taxa de recidiva foi observada em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa para avaliar a eficácia e segurança da miltefosina em pacientes portadores de LV no Brasil. Diferente dos resultados encontrados nos ensaios clínicos desenvolvidos na Índia, apenas 42% dos pacientes tratados com 100 mg/dia durante 28 dias e 67% dos pacientes tratados por 42 dias curaram após o tratamento (dados não publicados). A partir desses dados, surgiu então a hipótese de que a alta taxa de falha ao tratamento seja devido à menor sensibilidade da *L. chagasi* à miltefosina causadora da LV no Brasil, comparada à *L. donovani* responsável pela LV na Índia.

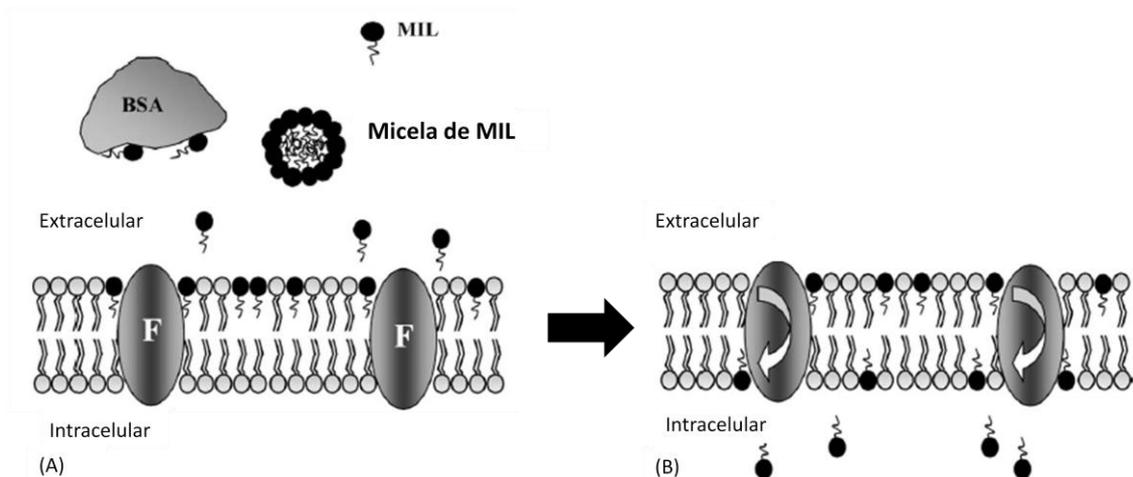
Diferença na sensibilidade à miltefosina entre as espécies causadoras de leishmanioses tem sido demonstrada em diferentes estudos. Escobar *et al.* (2002) avaliaram a sensibilidade *in vitro* de diferentes espécies de *Leishmania* utilizando ensaios de infecção de macrófagos e demonstraram que a espécie com maior sensibilidade foi a *L. donovani*, seguida de *Leishmania aethiopica*, *Leishmania tropica*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *Leishmania major*. Yardley *et al.* (2005) também demonstraram, por meio de testes *in vitro*, uma variação na sensibilidade à miltefosina em diferentes isolados clínicos do Peru e Nepal, obtidos de pacientes tratados com antimonial. Todos os isolados de *L. donovani* (Nepal) e de *Leishmania lainsoni* (Peru) foram sensíveis *in vitro* à miltefosina, enquanto a maior parte dos isolados de *L. braziliensis* (Peru) foi resistente.

O mecanismo de ação da miltefosina não está propriamente esclarecido, mas uma clara correlação entre o acúmulo da droga no parasita e seus efeitos tóxicos tem sido descrita (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2006a). Consequentemente, a variação na habilidade de diferentes espécies de *Leishmania* em internalizar a droga parece estar correlacionada com a susceptibilidade à miltefosina, como observado em diferentes células eucarióticas (ZOELLER, LAYNE e MODEST, 1995; MOLLINEDO *et al.*, 1997; SMALL, STRUM e DANIEL, 1997).

Em 2003a, Pérez-Victória *et al.* estudaram a habilidade de promastigotas de *L. donovani* resistentes à miltefosina em captar esse fármaco e demonstraram que parasitas resistentes apresentavam redução de 95% na captação da droga.

Estudos subsequentes revelaram que a inserção de um suposto transportador de miltefosina em uma linhagem de *L. donovani* resistente aumentava a sensibilidade à droga; além disso, a superexpressão desse transportador em *Leishmania tarentolae*, espécie naturalmente resistente à miltefosina, também aumentava a captação do fármaco. Esse transportador localizado na membrana plasmática é um membro da família das ATPases do tipo P e está envolvido na translocação de fosfolipídeos. (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2003b). O transportador foi denominado de LdMT (transportador de miltefosina de *Leishmania donovani*) e posteriormente foi também caracterizado em *L. braziliensis* (SÁNCHEZ-CAÑETE *et al.*, 2009).

Em 2006, esse mesmo grupo mostrou que o transportador LdMT é essencial, mas não suficiente para a translocação de fosfolipídeos e, conseqüentemente, para a ação da miltefosina. A subunidade  $\beta$  do LdMT que pertence à família das proteínas Lem3/CDC50, chamada LdRos3, foi então identificada como necessária para a translocação tanto de fosfolipídeos quanto da miltefosina (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2006b). Logo, LdMT e LdRos3 têm sido descritos como parte da maquinaria que permite a entrada da miltefosina na *Leishmania*, determinando sua sensibilidade a esse fármaco (Figura 3).



**Figura 3 – Ligação e captação da miltefosina (MIL) em parasitas de *Leishmania*.** (A) Ligação do fármaco à região extracelular da membrana plasmática. A miltefosina é recrutada pela soro albumina bovina (BSA), que atua como reservatório do fármaco. (B) A fração ligada a membrana plasmática é internalizada por proteínas com atividade “flipase” (F), presentes na bicamada lipídica. Essa maquinaria de translocação inclui ainda duas proteínas da membrana plasmática: o transportador de miltefosina LdMT e sua subunidade LdRos3.

Fonte: Adaptado de Pérez-Victória *et al.* (2006a).

Confirmando esses dados, estudos posteriores demonstraram que os níveis de captação, e conseqüentemente a sensibilidade, dependem dos níveis de expressão da maquinaria de translocação da miltefosina na membrana. Em uma linhagem experimental resistente à miltefosina, a qual continha polipeptídeos do LdMT inativados, a expressão de uma quimera LdMT-GFP restabeleceu a captação de miltefosina e a sensibilidade. Quando parasitas selvagens super-expressavam o transportador LdMT, tornavam-se hipersensíveis ao fármaco, devido a capacidade de captá-lo em maior quantidade (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2003b). A introdução de uma quimera LdRos3-GFP no parasita também aumentou a captação de miltefosina e a sensibilidade. Esses dados indicam que tanto LdMT quanto LdRos3 são proteínas essenciais para a captação de miltefosina.

Outro mecanismo que pode reduzir o acúmulo intracelular de miltefosina, e conseqüentemente ser responsável pela aquisição de resistência do parasita à miltefosina é a superexpressão dos transportadores ABC. Esses transportadores localizados na membrana plasmática do parasita atuam como proteínas responsáveis pela eliminação da droga (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2001a).

Na tentativa de avaliar se a falha ao tratamento anti-*Leishmania* é devido à resistência do parasita à droga, vários estudos tem tentado correlacionar o resultado ao tratamento com a sensibilidade do parasita à droga.

Testes de sensibilidade *in vitro* realizados em isolados de *L. donovani* na Índia (LIRA *et al.*, 1999; DUBE *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2006) e em isolados de *L. tropica* no Irã (HADIGHI *et al.*, 2006) mostraram que os pacientes que responderam a terapia com antimonial pentavalente apresentavam isolados sensíveis, enquanto pacientes que não responderam a terapia apresentavam isolados resistentes à droga, sugerindo que a falha ao tratamento estava relacionado com a resistência do parasita ao antimonial. O mesmo resultado foi observado por FARAUT-GAMBARELLI *et al.* (1997) ao avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *L. infantum* obtidos de pacientes que apresentaram falha ao tratamento com antimonial.

Rojas *et al.* em 2006, também sugeriram uma correlação entre a resistência do parasita à droga e a falha ao tratamento. Esses autores demonstraram que a falha ao tratamento com antimonial observada em pacientes infectados com *L. panamensis* era devido à resistência primária do parasita à droga ou devido à resistência secundária adquirida pelo parasita durante o tratamento.

Por outro lado, outros autores não encontraram correlação entre resposta clínica e sensibilidade *in vitro* em testes realizados com isolados de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. lainsoni* no Peru (YARDLEY *et al.*, 2006), *L. donovani* no Nepal (RIJAL *et al.*, 2007), *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Brasil (ZAULI-NASCIMENTO *et al.*, 2009). Esses autores sugerem que outros fatores como aqueles relacionados ao hospedeiro podem estar associados à falha ao tratamento.

Portanto, considerando que os estudos relatados se referem à falha ao tratamento com antimoniais, o nosso estudo tem como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* à miltefosina de isolados de *L. chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento, na tentativa de correlacionar a suscetibilidade do parasita à droga com a resposta do paciente ao tratamento com miltefosina. Além disso, esse estudo pretende correlacionar a sensibilidade *in vitro* à miltefosina com a

expressão de genes relacionados à resistência do parasita à droga e avaliar seu potencial como marcadores de resistência.

## ***OBJETIVOS***

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a resposta ao tratamento com miltefosina está relacionada com a sensibilidade *in vitro* do parasita e avaliar o perfil de expressão de genes relacionados ao transporte desse fármaco, em busca de marcadores de resistência do parasita à miltefosina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade *in vitro* à miltefosina de isolados de *L. chagasi* obtidos de pacientes portadores de LV e correlacionar com a resposta clínica ao tratamento;
- Comparar a sensibilidade *in vitro* a miltefosina das cepas isoladas antes e após a falha ao tratamento;
- Avaliar o perfil de expressão dos genes para o transportador de miltefosina (LcMT) e sua subunidade  $\beta$  (LcRos3) em isolados clínicos de *L. chagasi* obtidos de pacientes portadores de LV e comparar com a sensibilidade *in vitro* à miltefosina.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número de registro CEP-066/07. Título: “Avaliação da sensibilidade *in vitro* à miltefosina de cepas de *Leishmania chagasi* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose visceral”.

Os experimentos em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número de registro 009/2010. Título: “Avaliação da sensibilidade *in vitro* à miltefosina de cepas de *Leishmania chagasi* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose visceral”.

### 4.2 PACIENTES E PARASITAS

Os isolados de *L. chagasi* foram obtidos a partir de aspirados de medula óssea coletados antes do tratamento de 27 pacientes com diagnóstico positivo para LV que participaram de um ensaio clínico realizado em Montes Claros (Minas Gerais) e Teresina (Piauí), no qual foi avaliada a eficácia e segurança da miltefosina para o tratamento da LV no Brasil. Todos os pacientes foram diagnosticados parasitologicamente para LV por exame microscópico direto e/ou cultura dos aspirados de medula óssea. Dos pacientes que apresentaram falha terapêutica foram também avaliados isolados obtidos após o tratamento e no momento da falha.

Os pacientes foram tratados com 2,5 mg/Kg/dia de miltefosina (Zentaris) por 28 ou 42 dias, e a resposta ao tratamento foi avaliada por uma nova coleta do aspirado de

medula óssea no fim do tratamento. A definição de cura inicial foi baseada na ausência de sinais ou sintomas da doença e aspirado de medula óssea negativo, enquanto falha parasitológica inicial foi considerada para os pacientes que apresentaram aspirado de medula óssea positivo e ausência de sinais e sintomas da doença. Todos os pacientes foram avaliados por no mínimo seis meses após o fim do tratamento e foram considerados curados aqueles que não apresentavam sinais e sintomas da doença. O diagnóstico de falha ao tratamento ocorreu entre um e seis meses após a conclusão do tratamento.

Os isolados obtidos por punção de medula óssea foram cultivados em meio bifásico contendo ágar sangue, Novy-MacNeal-Nicolle – NNN (NOVY & MCNEAL, 1903; NICOLLE, 1908), associado ao meio líquido Liver Infusion Tryptose – LIT (CAMARGO, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e criopreservados no banco de cepas do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo.

#### 4.3 CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS

Os parasitas criopreservados foram inicialmente cultivados em meio bifásico NNN-LIT suplementado com 10% de SFB. As culturas foram mantidas a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , e após três passagens os parasitas foram subcultivados em LIT contendo 10% SFB e 2% de urina masculina, até alcançarem a fase de crescimento desejada.

Todos os isolados obtidos nesse estudo foram caracterizados previamente como *L. chagasi* utilizando a reação em cadeia da polimerase para análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (SEGATTO *et al.*, 2012).

## 4.4 ENSAIOS *in vitro* DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS

### 4.4.1 Preparo das formas promastigotas de *Leishmania* sp. para os ensaios *in vitro* de infecção de macrófagos murinos

Parasitas de sete dias de crescimento (fase estacionária), cultivados em meio LIT suplementado com 10% de SFB e 2% de urina masculina, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL (Falcon<sup>®</sup>, Becton Dickinson, San Diego), homogeneizados em vortex a baixa rotação para desfazer os grumos e submetidos à centrifugação diferencial (200 x g, 25°C, 10 minutos) para remoção das formas não viáveis e grumos de parasitas. Os parasitas foram deixados em repouso durante 10 minutos à temperatura de 25±1°C em estufa B.O.D. para a recuperação dos mesmos no sobrenadante. Após este período, o sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo de polipropileno de 50 mL e lavado em solução salina tamponada – PBS (0,15M, 8,0 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,115 g/L de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, Sigma Chemical Corp., St Louis, USA), por centrifugação a 1.000 x g, 4°C, durante 10 minutos, por duas vezes. Ao final das etapas de lavagem, o sedimento contendo as formas promastigotas foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI – 1640 (Sigma Chemical Corp., St Louis, USA) suplementado com 10% de SFB para a contagem do número de parasitas na câmara de Neubauer e posterior ajuste da sua concentração para os ensaios de infecção de macrófagos.

### 4.4.2 Droga

Para o estudo utilizou-se a miltefosina (hexadecilfosocolina) cedida pela Zentaris, Alemanha. A droga foi diluída em diferentes concentrações em meio de cultura imediatamente antes dos ensaios.

#### 4.4.3 Ensaios *in vitro* de atividade anti-*Leishmania*

Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados camundongos suíços fêmeas com idade entre quatro e oito semanas adquiridos do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF). Macrófagos peritoneais residentes foram obtidos por lavagem com meio RPMI – 1640 (Sigma-Aldrich®). Os macrófagos foram centrifugados e ajustados para uma concentração de  $8 \times 10^5$  células/ml em meio RPMI - 1640 contendo 10% de SFB (RPMI - 10% SFB). As células foram adicionadas (100  $\mu$ l) em lâminas de cultura de 16 poços (LAB-TEK®, Nunc, USA) e incubadas por 24h a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. As células não-aderentes foram removidas e os macrófagos aderentes foram infectados com promastigotas na razão de 7:1 parasitas/macrófagos e incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de incubação os parasitas não fagocitados foram removidos por lavagem das células com meio RPMI-1640. Os macrófagos infectados foram incubados com diferentes concentrações de miltefosina (15, 5, 1,67 e 0,55  $\mu$ M) durante 72 horas, em triplicata. Concentrações acima de 15  $\mu$ M não foram testadas devido à alta toxicidade para os macrófagos, inviabilizando a visualização dessas células. As lâminas de cultura foram lavadas e coradas utilizando a técnica de Panótico Rápido (Laborclin, PR, Brasil). A atividade da droga foi determinada pela porcentagem de células infectadas tratadas com miltefosina em comparação com o controle não tratado. Para cada ensaio foram avaliados 100 macrófagos em cada poço das lâminas de cultura. A concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foi calculada através da análise de regressão sigmóide utilizando o programa Prism versão 5.0. Os resultados foram expressos como a média com os desvios padrões (DP). Para todos os isolados foram realizados três experimentos independentes.

## 4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

### 4.5.1 Preparo das formas promastigotas de *L. chagasi* para os ensaios de qPCR

Parasitas de quatro dias de crescimento (fase log), cultivados em meio LIT suplementado com 10% de SFB e 2% de urina masculina, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL, homogeneizados em vortex a baixa rotação para desfazer os grumos e submetidos a centrifugação diferencial (200 x g, 25°C, 10 minutos) para remoção das formas não viáveis e grumos de parasitas. Os parasitas foram deixados em repouso durante 10 minutos à temperatura de 25±1°C em estufa B.O.D. para a recuperação dos mesmos no sobrenadante. Após este período, o sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo de polipropileno de 50 mL e lavado em PBS por centrifugação a 1.000 x g, 4°C, durante 10 minutos, por duas vezes. Ao final das etapas de lavagem, o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de PBS e transferido para microtubo de 1,5 mL (Axygen, EUA). Nesse momento, uma alíquota foi retirada para contagem dos parasitas em câmara de Neubauer. Os parasitas foram então centrifugados a 1.000 x g, 4°C durante 10 minutos e armazenados a -70°C até o momento do uso.

### 4.5.2 Extração de RNA

O RNA total foi isolado de aproximadamente 10<sup>8</sup> parasitas utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA). Ao concentrado de parasitas obtidos após lavagem com PBS, foram adicionados 500 µL do reagente Trizol® e homogeneizados vigorosamente até o sedimento se desfazer. Após a homogeneização, foram adicionados 200 µL de clorofórmio em cada microtubo, homogeneizados novamente

por 15 segundos e incubados em gelo por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação a 12.000 x g, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante incolor foi cuidadosamente retirado e transferido para um novo microtubo, ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol gelado. As amostras foram então estocadas por 12 horas a -70°C.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000 x g, por 15 minutos a 4°C. Após essa etapa, foi observada a formação de um precipitado de RNA, de coloração branca. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, e ao precipitado foi adicionado aproximadamente 800 µL de etanol a 70% gelado. Após centrifugação a 12.000 x g, por 8 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado com cuidado e o microtubo permaneceu invertido sobre papel absorvente à temperatura ambiente, para remover todo o etanol residual. Ao sedimento foram adicionados 50 µL de água DEPC, e a concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (Nano Drop® ND-1000, EUA) a 260 e 280 nm. As amostras foram estocadas a -70°C até o momento do uso.

#### **4.5.3 Síntese de cDNA**

Primeiramente o RNA foi tratado com o kit Turbo DNA-free (Ambion®, EUA) para excluir qualquer contaminação com DNA genômico. À concentração de 10 µg de RNA, foram adicionados água, tampão e a enzima DNase turbo de acordo com as especificações do fabricante. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, e após a incubação foi adicionado 5 µL do tampão de inativação. Após 5 minutos de incubação, os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante coletado foi transferido para outro microtubo.

Para síntese do cDNA, utilizou-se o kit High Capacity (Applied Biosystems®, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Para 10 µL da amostra de RNA tratado com DNase, foi adicionado igual volume da mistura do kit. Os microtubos foram então

incubados em temperaturas diferentes na seguinte ordem: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C.

Após a síntese do cDNA, foi feita uma PCR para amplificação do gene GAPDH com o objetivo de verificar se o cDNA foi sintetizado corretamente. Para cada tubo de reação foi utilizado: 2 µL de cDNA do isolado; 1U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen®); 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTPs) (Promega®); 10 pmoles de cada iniciador; 1 µL de solução tampão 10X (Invitrogen®); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, em um volume final de 10 µL. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Todas as reações foram feitas em termociclador Axygen Maxigene Cycle (Axygen, USA). Após corrida em gel de agarose a 2% e coloração com brometo de etídeo, os fragmentos de cDNA de cada isolado foram comparados a um controle positivo incluído na reação.

#### **4.5.4 PCR quantitativo (qPCR)**

##### **4.5.4.1 Controle endógeno**

Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, fez-se necessário a determinação de um controle endógeno, que serviu como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes testados. Segundo Livak e Schmittgen (2001), controles endógenos adequados incluem GAPDH, β-actina, β2-microglobulina e rRNA. Sendo assim foi tomado por base o trabalho desenvolvido por Kumar *et al.* (2009), onde os autores selecionaram o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle endógeno para a detecção dos níveis de expressão dos genes LdMT e LdRos3 em isolados de *L. donovani*.

#### 4.5.4.2 Determinação da eficiência de amplificação

De acordo com o *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (Informação Mínima para Publicação de Experimentos de PCR em Tempo Real Quantitativo), publicado por Bustin *et al.* em 2009, ensaios de qPCR robustos e precisos são correlacionados com alta eficiência da reação. A eficiência da PCR é particularmente importante quando são reportadas concentrações de mRNA para o gene alvo relativo ao gene de referência. Esses dois genes devem ser amplificados com eficiências comparáveis, para garantir a acurácia da comparação.

As eficiências da amplificação foram obtidas para os dois genes relacionados à resistência, o gene para o transportador de miltefosina de *L. chagasi* (LcMT) e sua subunidade  $\beta$  Ros3 (LcRos3), e para o gene de referência o GAPDH. As curvas de eficiência relativas foram construídas a partir da diluição do cDNA da amostra calibradora (cepa padrão de *L. chagasi*), nas mesmas condições utilizadas para a determinação da expressão gênica, descrita abaixo. A partir de cinco pontos de diluição 1:5 do cDNA, em triplicata, foi estabelecido o valor de Ct para cada ponto no qPCR. As curvas de calibração, os valores de inclinação, coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e a eficiência de cada curva foram gerados pelo sistema ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### 4.5.4.3 Determinação da expressão gênica

O nível de expressão dos genes para o transportador de miltefosina (LcMT) e sua subunidade  $\beta$  (LcRos3) foram avaliados utilizando a técnica de PCR quantitativo. Para normalização da expressão gênica foi utilizado o gene de referência GAPDH.

As sequências dos genes relacionados ao transportador foram obtidas de genes ortólogos para *L. donovani*, e o número de acesso no banco de dados GenBank foi AY321297 para o transportador LcMT, e DQ205096 para LcRos3. Para o gene de referência GAPDH, a sequência foi obtida do gene ortólogo de *L. infantum*, com o

número de acesso XM\_001467109 no banco de dados GenBank. As sequências dos iniciadores utilizados na reação de qPCR estão listadas na tabela 1.

O nível de expressão desses genes foi determinado utilizando-se SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen™, EUA), 10 pmol de cada iniciador e 5 µL de cDNA diluído 1:10 em um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas utilizando o sistema ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System SDS. O protocolo de amplificação constituiu-se de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Em todas as reações realizadas havia um controle negativo, constituído por 10 µL de SYBR Green SuperMix e 10 pmol de cada iniciador.

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (*threshold cycle*) e na eficiência de amplificação. O Ct obtido para o gene de interesse (LcMT ou LcRos3) foi normalizado subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (GAPDH) para cada amostra. Com esse valor, agora chamado de  $\Delta Ct$ , calculou-se o  $\Delta\Delta Ct$ , que corresponde ao  $\Delta Ct$  amostra –  $\Delta Ct$  do calibrador. Nesse estudo, o calibrador utilizado foi a cepa de referência de *L. chagasi* PP75. A relação da expressão gênica entre a amostra e o calibrador foi calculado utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram obtidos no software SDS 7500 versão 2.0.4 e analisados no Microsoft Office Excel.

Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

**Tabela 1 - Sequência dos genes amplificados na PCR quantitativa.**

<b>Genes</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do produto (bp)</b>
<b>LdMT</b>	Senso	5'-CAAGTGCCTTTCCACCAGAATC	206
	Antisenso	5'- CTCACCTTTTTGAACTCCAACAGG	
<b>LdRos3</b>	Senso	5'-ACGACACGGCTTGATTTTCG	228
	Antisenso	5'-GAGTAGTCCACGGAGGCAGTAAAG	
<b>GAPDH</b>	Senso	5'-GAAGTACACGGTGGAGGCTG	238
	Antisenso	5'-CGCTGATCACGACCTTCTTC	

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de  $CI_{50}$  foram representados como média  $\pm$  DP. Para avaliar a correlação entre a sensibilidade (sensível ou resistente) e a resposta clínica (cura ou falha) foi utilizado o Teste Exato de Fisher, calculado no programa Epi Info 3.5.2. O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

Os resultados de expressão gênica foram expressos como média  $\pm$  DP. Para avaliar se houve diferença na expressão gênica dos isolados entre os grupos sensíveis e resistentes in vitro foi utilizado o Teste t de *student* calculado no programa Prism versão 5.0. O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## ***RESULTADOS***

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SENSIBILIDADE *in vitro* À MILTEFOSINA DOS ISOLADOS DE *L. chagasi*

Primeiramente, a sensibilidade à miltefosina das cepas de referência de *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8) foram comparadas para avaliar se a alta taxa de falha ao tratamento com miltefosina observada no Brasil foi devido à diferença na susceptibilidade entre essas espécies. Os resultados mostraram que as duas espécies apresentam susceptibilidade à miltefosina similar, com  $CI_{50}$  de 3,14  $\mu$ M para *L. chagasi* e de 3,48  $\mu$ M para *L. donovani*.

Posteriormente avaliamos a sensibilidade à miltefosina dos isolados de *L. chagasi* obtidos de pacientes com diferentes respostas ao tratamento, com o objetivo de verificar se a falha ao tratamento era devido à baixa sensibilidade desses isolados à miltefosina.

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes cujos isolados foram utilizados nesse estudo estão representadas na tabela 2. Dos 26 pacientes tratados, 14 responderam ao tratamento, enquanto 12 apresentaram falha terapêutica, sendo posteriormente tratados com sucesso com anfotericina B lipossomal.

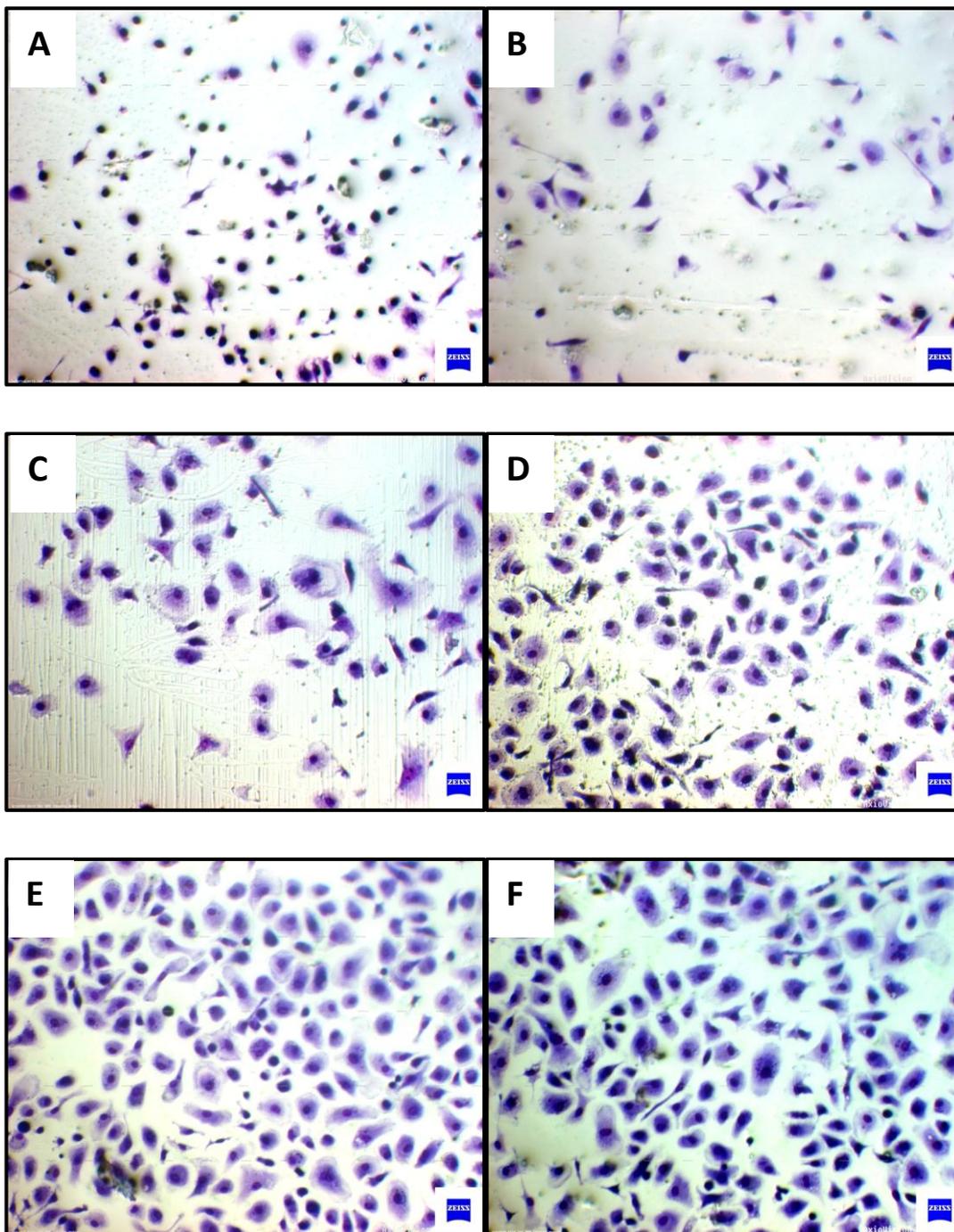
**Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes que responderam ou não ao tratamento com miltefosina.**

Isolado <sup>a</sup>	Região	Sexo <sup>b</sup>	Idade (Anos)	Tempo de doença	Tempo de tratamento	Resposta clínica
MHOM/BR/05/MG12	Montes Claros-MG	M	2	10 dias	28 dias	Cura
MHOM/BR/05/MG14	Bocaiúva-MG	M	18	60 dias	28 dias	Cura
MHOM/BR/05/MG19	Catuni-MG	M	4	15 dias	28 dias	Cura
MHOM/BR/06/MA01	Paraibano-MA	M	21	9 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/05/MA02	Codó-MA	F	2	28 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/06/MA03	Timon-MA	M	27	60 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/06/MA04	Codó-MA	M	28	60 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/05/MA05	Timon-MA	F	2	40 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/05/PI04	Valença do Piauí-PI	M	5	28 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/06/PI05	Valença do Piauí-PI	M	40	21 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/06/PI07	Piripiri-PI	F	3	60 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/05/PI08	Altos-PI	M	28	28 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/05/PI09	Nova Santa Rita-PI	M	53	20 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/06/PI10	Teresina-PI	F	4	30 dias	42 dias	Cura
MHOM/BR/05/MG11	Montes Claros-MG	F	3	90 dias	28 dias	Falha
MHOM/BR/05/MG13	São Francisco-MG	F	11	30 dias	28 dias	Falha
MHOM/BR/05/MG15	Montes Claros-MG	F	2	30 dias	28 dias	Falha
MHOM/BR/05/MG16	Bocaiúva-MG	M	3	12 dias	28 dias	Falha
MHOM/BR/05/MG17	Porteirinha-MG	M	10	15 dias	28 dias	Falha
MHOM/BR/05/MG18	Montes Claros-MG	F	5	15 dias	28 dias	Falha
MHOM/BR/06/MA07	Caxias-MA	M	12	28 dias	42 dias	Falha
MHOM/BR/06/PI01	José de Freitas-PI	M	41	60 dias	42 dias	Falha
MHOM/BR/06/PI02	Valença do Piauí-PI	M	4	30 dias	42 dias	Falha
MHOM/BR/06/PI03	Cabeceiras-PI	M	40	60 dias	42 dias	Falha
MHOM/BR/06/PI11	José de Freitas-PI	M	15	21 dias	42 dias	Falha
MHOM/BR/05/PI12	Lima Campos-PI	M	2	120 dias	42 dias	Falha

<sup>a</sup> Todos os isolados foram previamente caracterizados como *L. chagasi* por PCR-RFPL.

<sup>b</sup> F: Feminino; M: Masculino.

Os resultados mostraram que dos 26 isolados de *L. chagasi* obtidos antes do tratamento 16 (61,5%) apresentaram  $CI_{50}$  variando entre 2,6 e 7,9  $\mu\text{M}$  e foram considerados sensíveis *in vitro* à miltefosina, enquanto 10 (38,5%) isolados apresentaram  $CI_{50}$  maior que 15  $\mu\text{M}$ , concentração máxima utilizada nos ensaios, e foram considerados resistentes *in vitro* à miltefosina. Concentrações de miltefosina acima de 15  $\mu\text{M}$  não foram utilizadas devido à toxicidade para os macrófagos, inviabilizando os experimentos (Figura 4).



**Figura 4 - Ensaios in vitro utilizando diferentes concentrações de miltefosina.** (A) Cultura com 30  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (B) Cultura com 15  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (C) Cultura com 5  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (D) Cultura com 1,67  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (E) Cultura com 0,55  $\mu\text{M}$  de miltefosina; (F) Controle sem miltefosina.

**Tabela 3 - Sensibilidade in vitro à miltefosina de isolados de *L. chagasi* obtidos de pacientes com diferentes respostas ao tratamento.**

Isolado	Resposta clínica	CI <sub>50</sub> ± DP pré-tratamento*	Sensibilidade à miltefosina
MHOM/BR/05/MG12	Cura	4,5±1,5	Sensível
MHOM/BR/05/MG14	Cura	6,2±0,2	Sensível
MHOM/BR/05/MG19	Cura	6,5±2,4	Sensível
MHOM/BR/05/PI04	Cura	4,6±3,2	Sensível
MHOM/BR/05/MA02	Cura	5,8±1,5	Sensível
MHOM/BR/06/PI05	Cura	2,6±0,7	Sensível
MHOM/BR/05/PI08	Cura	3,8±1,2	Sensível
MHOM/BR/05/MA05	Cura	2,9±1,2	Sensível
MHOM/BR/06/MA03	Cura	3,9±1,4	Sensível
MHOM/BR/05/PI09	Cura	7,9±0,7	Sensível
MHOM/BR/06/PI07	Cura	7,9±2,4	Sensível
MHOM/BR/06/MA01	Cura	5,4±0,8	Sensível
MHOM/BR/06/MA04	Cura	5,2±1,0	Sensível
MHOM/BR/06/PI10	Cura	3,1±0,5	Sensível
MHOM/BR/05/MG17	Falha	3,9±2,7	Sensível
MHOM/BR/06/PI01	Falha	3,7±1,0	Sensível
MHOM/BR/05/MG13	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/05/MG11	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/05/MG15	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/05/MG18	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/05/MG16	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/06/PI11	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/06/PI02	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/05/PI12	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/06/PI03	Falha	>15	Resistente
MHOM/BR/06/MA07	Falha	>15	Resistente
<i>L. chagasi</i>	-	3,1±1,3	Sensível
<i>L. donovani</i>	-	3,5±1,6	Sensível

\* Os valores de CI<sub>50</sub> foram demonstrados como a média e o desvio padrão em µM; DP = desvio padrão.

\*\* A % de infecção foi obtida como média de três experimentos.

Uma vez determinada a sensibilidade *in vitro* dos diferentes isolados, os resultados foram correlacionados com a resposta clínica dos pacientes (tabela 3). Todos os isolados de pacientes curados após o tratamento com miltefosina foram sensíveis *in vitro* (CI<sub>50</sub> entre 2,6 a 7,94 µM). Por outro lado, os isolados de pacientes que apresentaram falha ao tratamento com miltefosina mostraram-se resistentes *in vitro* (CI<sub>50</sub> > 15 µM), demonstrando a correlação entre falha ao tratamento e resistência

intrínseca dos isolados à miltefosina ( $p=0,000$ ), com exceção dos isolados MG17 ( $CI_{50} = 3,9 \mu M$ ) e PI01 ( $CI_{50} = 3,7 \mu M$ ) que mostraram-se sensíveis.

Como os isolados MG17 e PI01 foram obtidos de pacientes que apresentaram falha ao tratamento, mas eram sensíveis *in vitro* à miltefosina, nós avaliamos se a falha ao tratamento poderia ser devido à resistência secundária, ou seja, aquela adquirida durante o tratamento. Para isso, foi analisada a sensibilidade dos isolados obtidos desses pacientes após o tratamento e no momento da falha terapêutica. Os resultados mostraram que os isolados obtidos dos dois pacientes após o tratamento mostraram-se resistentes, com  $CI_{50} >15 \mu M$ , sugerindo que a falha de tratamento poderia ser devido à aquisição de resistência após tratamento (Tabela 4, Figura 5A). Entretanto, isolados sensíveis à miltefosina obtidos de pacientes que curaram após o tratamento, porém apresentaram falha parasitológica inicial, mostraram-se resistentes após o tratamento (Tabela 4).

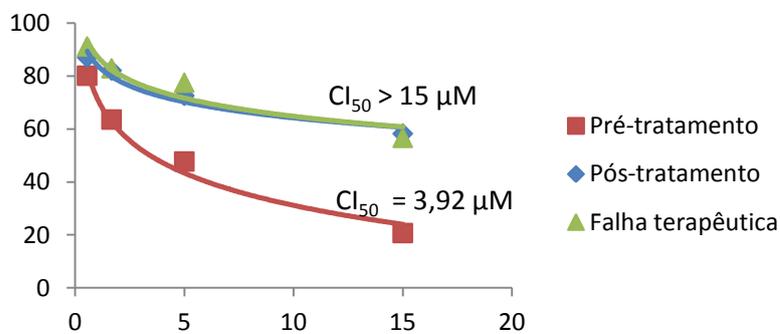
**Tabela 4 - Sensibilidade *in vitro* à miltefosina em isolados obtidos antes do tratamento, após o tratamento e no momento da falha terapêutica.**

Código	Resposta clínica	Sensibilidade <i>in vitro</i>	$CI_{50} \pm DP$ pré-tratamento*	$CI_{50}$ pós-tratamento*	$CI_{50}$ na falha terapêutica*
MHOM/BR/05/MG14	Cura	Sensível	$6,25 \pm 0,23$	>15	-
MHOM/BR/05/MG19	Cura	Sensível	$6,53 \pm 2,43$	>15	-
MHOM/BR/05/MG17	Recidiva	Sensível	$3,92 \pm 2,7$	>15	>15
MHOM/BR/06/PI01	Recidiva	Sensível	$3,75 \pm 1,0$	>15	>15
MHOM/BR/05/MG15	Recidiva	Resistente	>15	>15	>15
MHOM/BR/05/MG16	Recidiva	Resistente	>15	>15	>15
MHOM/BR/05/MG18	Recidiva	Resistente	>15	>15	>15
MHOM/BR/06/PI02	Recidiva	Resistente	>15	-	>15
MHOM/BR/06/PI03	Recidiva	Resistente	>15	-	>15
MHOM/BR/06/PI11	Recidiva	Resistente	>15	-	>15
MHOM/BR/05/PI12	Recidiva	Resistente	>15	-	>15
MHOM/BR/06/MA07	Recidiva	Resistente	>15	-	>15

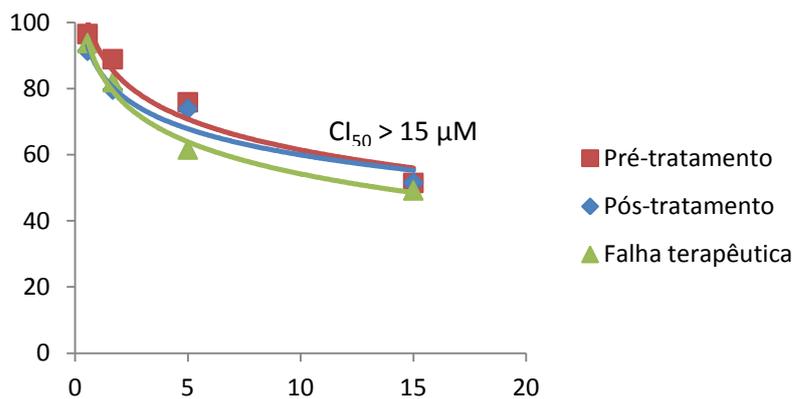
\* Os valores de  $CI_{50}$  foram demonstrados como a média e o desvio padrão em  $\mu M$ ; DP = desvio padrão.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar se o fenótipo de resistência dos isolados se mantinha ao longo do acompanhamento do paciente após o tratamento, a sensibilidade à miltefosina foi avaliada em isolados de oito pacientes, obtidos após o tratamento e no momento da falha terapêutica (tabela 4, figura 5B). Os resultados mostraram que todos os isolados obtidos após o tratamento e no momento da falha terapêutica eram resistentes à miltefosina, demonstrando que o fenótipo de resistência era estável uma vez tenha ocorrido.

(A)



(B)

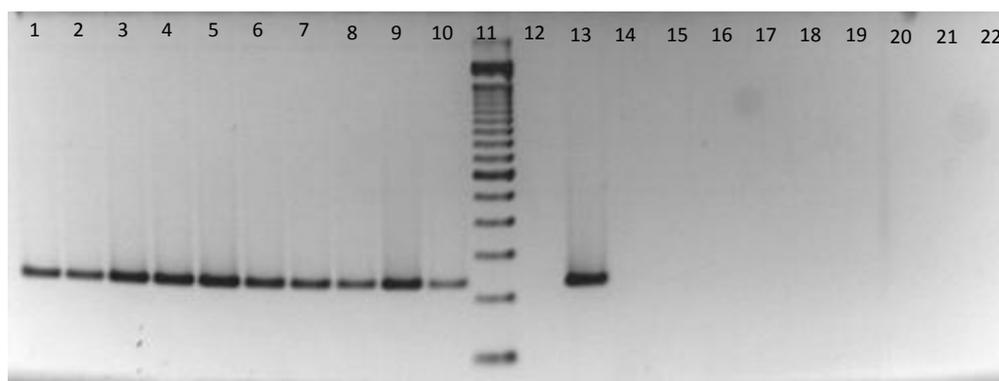


**Figura 5 - Curva dose-resposta ilustrativa da diferença entre o  $CI_{50}$  de isolados de *L. chagasi* antes e após o tratamento com miltefosina. (A) Isolado sensível que se tornou resistente após o tratamento. (B) Isolado resistente que manteve a resistência após o tratamento e no momento da falha.**

## 5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 5.2.1 Síntese de cDNA

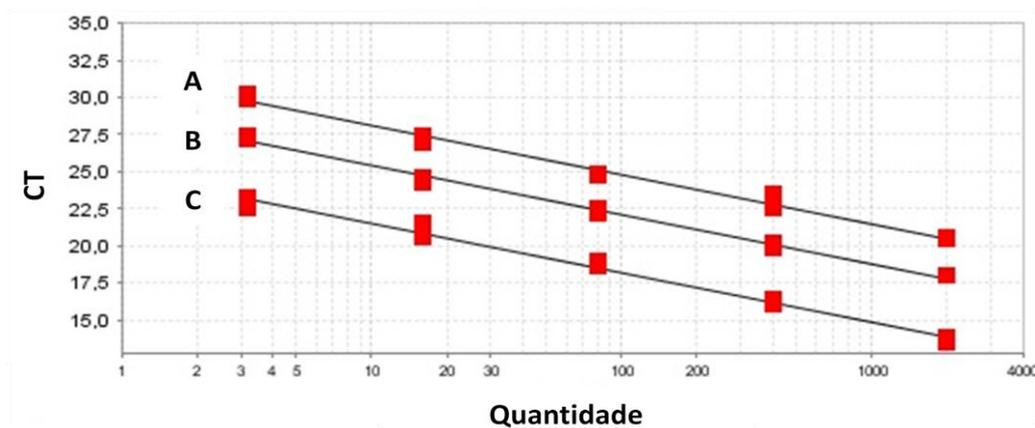
Após a síntese do cDNA, foi realizada uma PCR para avaliar se o produto esperado havia sido amplificado. Além disso, foram preparadas reações sem a enzima transcriptase reversa para cada isolado, com o objetivo de avaliar se o RNA não estava contaminado com DNA genômico. Essas reações foram submetidas ao mesmo procedimento que as amostras para a síntese de cDNA. Os resultados mostraram apenas a formação de uma banda para todos os isolados, com o tamanho correspondente ao gene testado. Nas reações sem a transcriptase reversa, não houve amplificação durante a PCR. Como controle negativo, foi utilizada a mistura da reação da PCR sem o DNA; como controle positivo foi utilizado o DNA extraído da cepa de referência de *L. chagasi* (Figura 6).



**Figura 6 – Gel de agarose representativo das análises após a produção do cDNA.** As bandas positivas possuem 238 bp. Poços de 1-10: Bandas positivas para cDNA. Poço 11: Peso molecular (100kb). Poço 12: Controle negativo. Poço 13: Controle positivo. Poços 14-22: Reações sem a transcriptase reversa.

## 5.2.2 Avaliação da eficiência de amplificação dos iniciadores

As eficiências de amplificação dos três genes estudados foram obtidas através de retas de eficiência relativas, construídas a partir da diluição do cDNA da amostra calibradora (Figura 7). Os valores de inclinação de todas as retas mostraram-se próximos ao desejado (-3,32). Esse dado confirma a eficiência próxima a 100% encontrada para todos os genes. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99 (Tabela 5).



**Figura 7 - Medida da eficiência de amplificação relativa para os três genes utilizados no estudo.** Alvos com eficiências similares (curvas paralelas) podem ser comprados em qualquer ponto de diluição. A: LcRos3; B: LcMT; C: GAPDH.

**Tabela 5. Resultado das curvas de eficiência de amplificação relativa para os três genes estudados.**

	<b>LcMT</b>	<b>LcRos3</b>	<b>GAPDH</b>
<b>Inclinação</b>	-3,31	-3,32	-3,33
<b>Eficiência</b>	100,3%	100,0%	99,6%
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99	0,99	0,99

### **5.2.3 Análise relativa da expressão gênica por qPCR**

Os ensaios de qPCR foram realizados para avaliar o perfil de expressão dos genes LcMT e LcRos3 de 26 isolados de LV (16 sensíveis *in vitro* e 10 resistentes *in vitro* à miltefosina) em relação à cepa de referência de *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), sensível à miltefosina. Para cada isolado foram obtidos resultados de pelo menos dois experimentos diferentes. O resultado final foi demonstrado na forma de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que indica quantas vezes o gene alvo está expresso em relação ao calibrador, que neste estudo era a cepa de referência *L. chagasi*. Os valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DP$  estão representados na figura 8. Resultados maiores que 1 indicam que o gene foi mais expresso no isolado em comparação com a cepa de referência *L. chagasi*. Resultados menores que 1 indicam que o gene foi menos expresso no isolado em comparação à cepa de referência da *L. chagasi*.

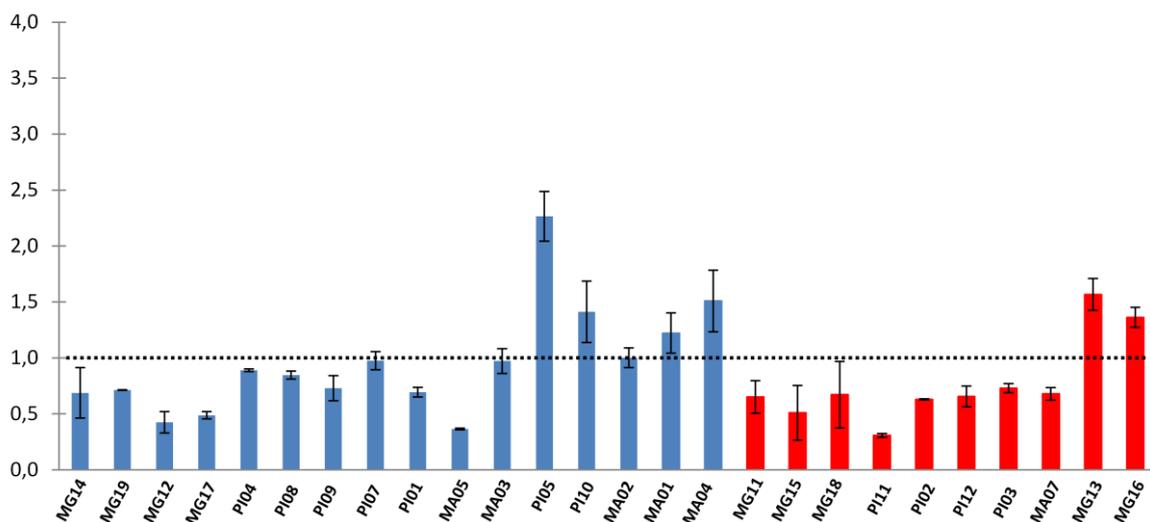
Para o gene LcMT, os resultados mostraram que 8 isolados resistentes *in vitro* (80%) apresentaram diminuição na expressão desse gene, enquanto 2 (20%) desses isolados apresentaram um maior nível de expressão do transportador LcMT em relação a cepa de referência. Da mesma forma, a maior parte dos isolados sensíveis *in vitro* (68,75%) apresentou uma expressão reduzida desse gene. Apenas cinco

(31,25%) deles expressaram igual ou em maior quantidade o transportador de miltefosina LcMT, quando comparados a cepa de referência de *L. chagasi*.

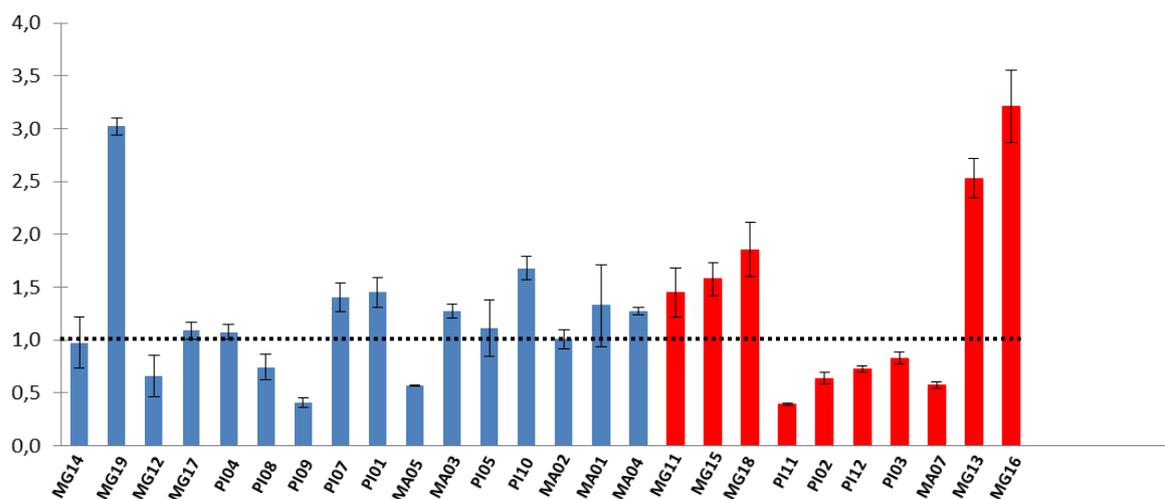
O resultado para a expressão da  $\beta$ -subunidade LcRos3 foi diferente do encontrado para o gene LcMT. Nos isolados resistentes, apenas 50% apresentou uma expressão diminuída do gene LcRos3. Dentre os isolados sensíveis, cinco (31,25%) apresentaram um menor nível de expressão em comparação com a cepa de referência PP75, enquanto 11 (68,75%) expressaram nível igual ou maior de expressão.

O resultado do teste t de *student* mostrou que não houve diferença de expressão gênica entre os grupos sensível e resistente para os dois genes analisados (LcMT –  $p=0,1411$ ; LcRos3 –  $p=0,5338$ ).

(A)



(B)



**Figura 8 - Níveis de expressão dos genes LcMT e LcRos3 em diferentes isolados clínicos, representado pela razão de expressão gênica relativa à cepa de referência de *L. chagasi*.** Os níveis de expressão em azul representam isolados sensíveis in vitro, e os em vermelho representam isolados resistentes in vitro à miltefosina. (A) Análise de expressão gênica para o transportador de miltefosina LcMT. (B) Análise de expressão gênica para a subunidade  $\beta$  LcRos3. Os dados representam a média de pelo menos dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

## ***DISCUSSÃO***

---

## 6 DISCUSSÃO

Miltefosina, a primeira droga administrada por via oral para LV, está associada com altas taxas de cura na Índia, incluindo os casos resistentes aos antimoniais pentavalentes (SUNDAR E CHATTERJEE, 2006). Entretanto, um ensaio clínico realizado com esse fármaco no Brasil mostrou resultados diferentes, sendo que cerca de 50% dos pacientes com LV tratados com miltefosina apresentaram falha ao tratamento. Com base nesses achados, o objetivo do nosso estudo foi avaliar se a resposta ao tratamento com miltefosina está relacionada com a sensibilidade *in vitro* do parasita e avaliar o perfil de expressão de genes relacionados ao transporte desse fármaco, em busca de marcadores de resistência à miltefosina.

A contribuição do tratamento com miltefosina para seleção de parasitas resistentes é ainda desconhecida. Além disso, as bases multifatoriais da resposta terapêutica têm dificultado o entendimento da relação entre susceptibilidade à droga e a resposta clínica. Neste contexto, estudos têm revelado que a imunidade do hospedeiro (ALVAR *et al.*, 1997; GROGL, THOMASON E FRANKE, 1992; FARAUT-GAMBARELLI *et al.*, 1997), fatores farmacológicos (AL JASER *et al.*, 1995), e a susceptibilidade e biologia das diferentes espécies de *Leishmania* (ROMERO *et al.*, 2001; NAVIN *et al.*, 1992), individualmente ou coletivamente podem influenciar a resposta ao tratamento.

Neste sentido, vários estudos têm sugerido que a sensibilidade variável do parasita à droga seja um dos fatores responsáveis pela falha ao tratamento de pacientes portadores de leishmanioses. Diferente dos dados obtidos para o tratamento de LV na Índia, causada por *L. donovani*, cujo índice de cura foi de 97% (SUNDAR *et al.*, 2002a), nosso grupo encontrou no Brasil apenas cerca de 50% de cura para o tratamento de LV causada por *L. chagasi* (dados não publicados). Da mesma forma, nos ensaios clínicos para o tratamento para LC, 91% dos pacientes infectados com *L. panamensis* curaram após o tratamento na Colômbia, enquanto na Guatemala o índice de cura foi de apenas 33% para os pacientes infectados com *L. braziliensis* e de 60% para os pacientes infectados com *L. mexicana* (SOTO *et al.*, 2004). As

diferenças observadas nesses ensaios clínicos corroboram a hipótese de que a variação na sensibilidade à miltefosina entre as diferentes espécies de *Leishmania* esteja relacionada com as diferentes taxas de cura observadas.

Sensibilidade variada de diferentes espécies à miltefosina tem sido descrita por diversos autores por meio de testes *in vitro* de infecção de macrófagos. Esses estudos têm demonstrado a alta sensibilidade *in vitro* da espécie *L. donovani* à miltefosina, comparadas às espécies *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. major* (CROFT *et al.*, 1987,1993; KUHLENCORD *et al.*, 1992; CROFT *et al.*, 1996; ESCOBAR *et al.*, 2002). Posteriormente, Yardley *et al.* em 2005 confirmaram a sensibilidade intrínseca de isolados de *L. donovani* e encontraram resistência à miltefosina na maior parte dos isolados de *L. braziliensis* avaliados. Portanto, a sensibilidade intrínseca da espécie *L. donovani* pode justificar o sucesso do tratamento com miltefosina na Índia, enquanto a baixa sensibilidade da espécie de *L. braziliensis* à droga pode justificar os baixos índices de cura encontrados na Guatemala, onde *L. braziliensis* é uma das espécies prevalentes na região.

Na tentativa de verificar se o alto índice de falha ao tratamento encontrado no Brasil era devido à diferença de sensibilidade entre as espécies *L. donovani* e *L. chagasi*, nós avaliamos a sensibilidade *in vitro* de uma cepa de referência de *L. chagasi* e comparamos com a sensibilidade de uma cepa de referência de *L. donovani*. Entretanto, nossos resultados não demonstraram diferença na sensibilidade *in vitro* à miltefosina entre as duas espécies. Apesar de esses resultados terem mostrado que a cepa padrão de *L. chagasi* é sensível à miltefosina, diversos estudos têm demonstrado sensibilidade variada à droga dentro da uma mesma espécie e correlacionado com a resposta ao tratamento (DUBE *et al.*, 1994; LIRA *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2006; HADIGHI *et al.*, 2006).

Neste sentido, nós avaliamos a sensibilidade de isolados de *L. chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina, com o objetivo de correlacionar a sensibilidade *in vitro* do parasita com a resposta terapêutica.

Nossos resultados mostraram que, dos 14 isolados obtidos de pacientes que curaram após o tratamento, todos foram sensíveis *in vitro* a esse fármaco. Por outro lado, dos 12 isolados obtidos de pacientes que apresentaram falha à terapia com miltefosina, 10 mostraram-se resistentes *in vitro*, sugerindo que a falha ao tratamento com miltefosina seja devida à resistência primária do parasita à droga.

Como dois isolados obtidos de pacientes que apresentaram falha ao tratamento mostraram-se sensíveis à droga, nós avaliamos a possibilidade da aquisição de resistência devido ao tratamento do paciente. Os isolados obtidos desses mesmos pacientes logo após o tratamento com miltefosina mostraram-se resistentes, demonstrando a aquisição de resistência durante o tratamento.

A aquisição de resistência pelo parasita ou a diminuição da sensibilidade aos antimoniais têm sido descritas. Faraut-Gamberelli *et al.*, em 1997, relatou a diminuição da sensibilidade de 13 isolados de *L. infantum* obtidos de pacientes após o tratamento comparada com os isolados obtidos dos mesmos pacientes antes do tratamento. Esses autores sugeriram que a falha ao tratamento poderia ser devida pelo menos parcialmente ao decréscimo da sensibilidade dos isolados à droga. Resultados semelhantes foram encontrados por Rojas *et al.* (2006) que demonstraram que isolados de *L. panamensis* previamente sensíveis *in vitro* mostraram-se resistentes na falha terapêutica, justificando a resposta clínica dos pacientes.

Testes em laboratório têm demonstrado que a resistência em cepas de *L. donovani* à miltefosina pode ser gerada facilmente sob pressão da droga (SEIFERT *et al.*, 2003). Linhagens resistentes estáveis são geradas rapidamente em concentrações de miltefosina de até 40 $\mu$ M adicionadas ao meio de cultura e o aumento na CI<sub>50</sub> chega a ser até de 15 vezes na cepa resistente quando comparada à cepa selvagem (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2003a, 2003b). Esses dados corroboram a hipótese de aquisição de resistência pelo parasita durante o tratamento do paciente com miltefosina.

Embora os resultados do nosso trabalho fortemente sugiram que a resistência primária e secundária do parasita à miltefosina contribuam para a falha terapêutica,

a aquisição de resistência pelos parasitas obtidos de dois pacientes não foi suficiente para determinar a falha terapêutica, uma vez que esses pacientes curaram após o tratamento. Contudo, esses pacientes apresentaram falha parasitológica inicial, ou seja, cultura positiva após o tratamento. Esses dados, portanto sugerem que outros fatores podem estar associados à resistência do parasita à droga para determinar o desfecho clínico.

No sentido de avaliar o mecanismo de resistência à miltefosina, estudos têm demonstrado que a característica comum em todas as linhagens de *Leishmania* resistentes é a diminuição no acúmulo desse fármaco. Geralmente, baixas concentrações intracelulares de uma droga ativa podem ser alcançadas por meio de pelo menos quatro mecanismos: diminuição na captação, aumento no efluxo, rápido metabolismo e alteração na permeabilidade da membrana plasmática. Entretanto, apenas os dois primeiros mecanismos têm sido descritos em linhagens experimentais resistentes à miltefosina (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006a).

Por meio de estudos utilizando linhagens selvagens, os autores concluíram que a miltefosina é captada ativamente por um mecanismo mediado por proteína e dependente de energia, que consiste na translocação específica do fármaco de fora para dentro da membrana plasmática (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2003a). Em uma linhagem resistente de *L. donovani* gerada em laboratório, essas proteínas foram caracterizadas como o transportador de miltefosina LdMT e sua subunidade  $\beta$  LdRos3. Em *L. braziliensis*, esse mecanismo também foi descrito como responsável pela determinação da sensibilidade à miltefosina (SÁNCHEZ-CANETE *et al.*, 2009). Nesse estudo, a baixa expressão da subunidade  $\beta$ , chamada de LbRos3, foi a principal responsável pela diminuição da sensibilidade à miltefosina em isolados clínicos.

Portanto, considerando a importância desses transportadores na determinação do fenótipo de resistência à miltefosina e na ausência de estudos avaliando essas proteínas em *L. chagasi*, nós avaliamos se a expressão dos genes que codificam o transportador LcMT e sua subunidade  $\beta$  LcRos3 estão relacionados com a sensibilidade *in vitro* à miltefosina em promastigotas de isolados clínicos dessa espécie.

O resultado esperado seria uma diminuição na expressão tanto do gene para o LcMT, quanto do gene para o LcRos3 nos isolados resistentes, justificando então que a baixa expressão desses transportadores poderia ser responsável pela resistência à miltefosina encontrada nesses isolados. Porém, os resultados obtidos mostraram que não houve diferença de expressão gênica entre os isolados sensíveis e resistentes para os dois genes analisados. Kumar *et al.* (2009), ao avaliarem cepas de *L. donovani* sensíveis *in vitro* à miltefosina, encontraram uma diminuição na expressão de LdMT e LdRo3, contradizendo os dados da literatura obtidos com linhagens de laboratório resistentes à droga.

Embora a análise de expressão gênica tenha sido uma metodologia largamente utilizada para avaliar a expressão de uma determinada proteína por um organismo, em tripanosomatídeos isso pode não ser verdade, uma vez que diversos estudos não tem encontrado correlação entre a quantidade de mRNA e de proteína, além do fato de que a regulação gênica em tripanosomatídeos ocorrer principalmente após a transcrição (GALE, CARTER e PARSONS, 1994; MAYHO *et al.*, 2006; NARDELLI *et al.*, 2007). Sendo assim, o fato da expressão gênica em *Leishmania* ser regulada após a transcrição pode justificar o fato de não termos encontrado correlação entre a expressão gênica dos transportadores de miltefosina e a sensibilidade *in vitro*. Portanto, para alcançar esse objetivo seria importante avaliar a expressão dessas proteínas através da detecção das mesmas, nesses isolados.

Além disso, seria também importante investigar outro mecanismo relacionado à aquisição de resistência à miltefosina em *Leishmania*. A superexpressão dos transportadores ABC leva à redução do acúmulo intracelular de miltefosina. Esses transportadores usam a energia gerada pela hidrólise do ATP para translocar seus substratos (íons, metais pesados, carboidratos, aminoácidos, antibióticos, drogas anti-câncer, proteínas, fosfolipídeos, esteróis ou pigmentos) através da membrana celular (CASTANYS-MUÑOZ *et al.*, 2008). As seqüências dos genomas de *L. major* e *L. infantum* revelaram a presença de 42 proteínas ABC no gênero *Leishmania* (LEPROHON *et al.*, 2006), e algumas delas têm mostrado envolvimento na resistência experimental à droga (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2001a). Dentro da família ABC, a proteína LMDR1 foi a primeira proteína relacionada à resistência para a

miltefosina (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2001b), devido a diminuição do acúmulo intracelular por efluxo ativo desse fármaco (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006c). Além dessa, mais recentemente, as proteínas LABC4 e LABC6 também foram descritas como responsáveis pelos baixos níveis intracelulares de miltefosina (BOSEDASGUPTA *et al.*, 2008; CASTANYS-MUÑOZ *et al.*, 2007; CASTANYS-MUÑOZ *et al.*, 2008).

Outro fator que poderia ter influenciado nos resultados seria a fase de crescimento das formas promastigotas avaliadas no nosso estudo. Como a análise de expressão gênica foi realizada com parasitas obtidos com quatro dias de cultura, e a análise de sensibilidade *in vitro* foi feita com parasitas de sete dias de cultivo, pode ser que haja diferença nos níveis de expressão gênica entre essas fases de cultivo. Entretanto, estudos prévios avaliando genes relacionados à resistência a antimoniais mostraram que há diferenças significativas apenas quando fases de crescimento log-recente e estacionária são comparadas (DECUYPERE *et al.*, 2008; ADAUI *et al.*, 2011). De forma semelhante, estudo publicado por Torres *et al.* (2010) também não encontrou diferença significativa na expressão gênica de parasitas *L. braziliensis* e *L. guyanensis* nas fases de crescimento log tardia e estacionária.

A forma do parasita analisado também poderia ter influenciado nos resultados de expressão gênica. Embora a forma amastigota seja a forma de *Leishmania* relevante para a doença humana, essas são difíceis de obter em grande número para estudos de caracterização. Além disso, os protocolos atuais de análise de expressão gênica em amastigotas intracelulares requerem cuidado extremo para preservar o estado biológico do parasita e assim garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (DECUYPERE *et al.*, 2008). Por outro lado, as formas promastigotas são fáceis de cultivar e de manipular com risco mínimo de alteração em seu estado biológico sob condições *in vitro* bem controladas. Embora exista essa hipótese, estudo publicado por Seifert *et al.* em 2007, mostrou que a inativação do transportador LdMT em promastigotas de *L. donovani*, seja por mutações pontuais ou por deleção do gene, gera amastigotas intracelulares resistentes à miltefosina. Corroborando esses achados, Sánchez-Canete *et al.* (2009) também demonstraram que a resistência à miltefosina é mantida de formas promastigotas para amastigotas

em modelos *in vitro* utilizando linhagens resistentes de *L. braziliensis*. Isso sugere que o padrão de resistência observado em amastigotas é semelhante ao padrão observado em promastigotas.

Concluindo, este estudo demonstrou pela primeira vez que há correlação entre a sensibilidade *in vitro* à miltefosina de isolados clínicos de *L. chagasi*, provenientes de pacientes com diferentes respostas clínicas a esse fármaco. Tal fato sugere que a falha terapêutica observada nesses pacientes seja devida à resistência do parasita à droga. Entretanto, não foi possível correlacionar a resistência à miltefosina com os níveis de expressão de genes relacionados ao transporte da droga.

Embora no Brasil a miltefosina não tenha sido utilizada para o tratamento de LV, mas tem sido sugerida como droga oral para o tratamento de LC, diante dos resultados deste estudo, acreditamos que o monitoramento da sensibilidade de isolados clínicos à miltefosina seja de grande relevância, uma vez que a resistência primária a essa droga já foi descrita em diferentes espécies e há possibilidade de aquisição de resistência pelo parasita após o tratamento. Além disso, considerando que testes *in vitro* de infecção de macrófagos utilizados para avaliar a sensibilidade do parasita à droga são laboriosos e demorados, a busca de marcadores de resistência utilizando metodologias mais simples e rápidas é importante para facilitar esse monitoramento.

## ***CONCLUSÕES***

---

## 7 CONCLUSÕES

- Há correlação entre sensibilidade *in vitro* à miltefosina em isolados de *L. chagasi* e resposta do paciente ao tratamento;
- O tratamento do paciente com miltefosina pode gerar parasitas resistentes à droga;
- Não foi possível associar a expressão dos genes LcMT e LcRos3 nos isolados de *L. chagasi* com a sensibilidade *in vitro* à miltefosina.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 8 REFERÊNCIAS

ADAUI, V.; SCHNORBUSCH, K.; ZIMIC, M.; GUTIÉRREZ, A.; DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; DE DONCKER, S.; MAES, I.; LLANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F.; ARÉVALO, J.; DUJARDIN, J. C. Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different in vitro susceptibility to pentavalent antimony. **Parasitology**, v. 138, n. 2, p. 183-93, Feb 2011.

ADLER, S. Notas sobre *Leishmania chagasi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 35, n. 1, p. 173-175, 1940.

AL JASER, M.; EL-YAZIGI, A.; KOJAN, M.; CROFT, S. L. Skin uptake, distribution, and elimination of antimony following administration of sodium stibogluconate to patients with cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 2, p. 516-9, Feb1995.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 2, p. 298-319, Apr 1997.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LORENÇO R.; CERF B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. Jr. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis**, v. 154, n. 4, p. 639–649, Oct 1986.

BERMAN, J. D.; BADARO, R.; THAKUR, C. P.; WASUNNA, K. M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON, R.; KUZOE, F.; PANG, L.; WEERASURIYA, K.; BRYCESON, A. D. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 1, p.25-32, 1998.

BHATTACHARYA, S. K.; SINHA, P. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; JHA, T. K.; PANDEY, K.; DAS, V. R.; KUMAR, N.; LAL, C.; VERMA, N.; SINGH, V. P.; RANJAN, A.; VERMA, R. B.; ANDERS, G.; SINDERMAN, H.; GANGULY, N. K. Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 196, n. 4, p. 591–8, Aug 2007.

BOSEDASGUPTA, S.; GANGULY, A.; ROY, A.; MUKHERJEE, T.; MAJUMDER, H. K.. A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 158, p. 176–188, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2006.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.;

VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n.4, p.611–622, 2009.

CAMARGO EO. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*; origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 12, p. 93-100, May-Jun 1964.

CASTANYS-MUNOZ, E.; ALDER-BAERENS, N.; POMORSKI, T.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. A novel ATP-binding cassette transporter from Leishmaniasis involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. **Mol Microbiol**, v. 64, p. 1141–115, 2007.

CASTANYS-MUNOZ, E.; PEREZ-VICTORIA, J. M.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 3573–3579, 2008.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis.** Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 08 de dez. 2011.

CHRUSCIAK-TALHARI, A.; DIETZE, R.; CHRUSCIAK-TALHARI, C., DA SILVA, R. M.; YAMASHITA, E. P. G.; PENNA, G. O.; MACHADO, P. R. L.; TALHARI, S. Randomized Controlled Clinical Trial to Assess Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 2, p. 255–260, Feb 2011.

COSTA, C. H.; STEWART, J. M.; GOMES, R. B.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSANAYAKE, S.; SANTOS, R. S.; SILVA, M. R.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 4, p. 334–337, Apr 2002.

COX, F. E. G. **The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases.** London: Empress Litho, p. 213, 214, 225-227, 1996.

CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; PENDERGAST, W.; CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 16, p. 2633-6, Aug 1987.

CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; THORNTON, E. A.; HERRMANN, D. B. J. Antileishmanial activity of the ether phospholipid ilmofosine. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, n. 2, p. 217-9, Mar 1993.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkylsophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J Antimicrob Chemother**, v. 38, n. 6, p. 1041-1047, Dec 1996.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHERE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Mol Biochem Parasitol**, v. 126, n. 2, p. 165 -172, Feb 2003.

DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; RIJAL, S.; YARDLEY, V.; MAES, L.; DE DONCKER, S.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J. C. Gene expression profiling of *Leishmania (Leishmania) donovani*: overcoming technical variation and exploiting biological variation. **Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 183-94, Feb 2008.

DIETZE, R.; CARVALHO, S. F. G. **Leishmaniose visceral – Calazar**. São Paulo: Ateneu, 2003.

DUBE, A.; SINGH, N.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in in vitro and in vivo experimental models. **Parasitol Res**, v.96, n. 4, p.216-223, June 2005.

DUMMER, R.; KRASOVEC, M.; RÖGER, J.; SINDERMAN, H.; BURG, G. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. **J Am Acad Dermatol**, v. 29, n. 6, p. 963–70, Dec 1993.

ESCOBAR P., MATU S., MARQUES C., CROFT S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v.81, p.151-157, 2002.

EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I.; VASCONCELOS, A. W.; SOUSA, A. D. E. A.; LIMA, J. W.; PEARSON, R. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J Infect Dis**, v. 166, n. 5, p. 1124–1132, Nov 1992.

FARAUT-GAMBARELLI, F.; PIARROUX, R.; DENIAU, M.; GIUSIANO, B.; MARTY, P.; MICHEL, G.; FAUGÈRE, B.; DUMON, H. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 4, p. 827–30, Apr 1997.

GALE, M. JR; CARTER, V.; PARSONS, M. Translational control mediates the developmental regulation of the *Trypanosoma brucei* Nrk protein kinase. **J Biol Chem**, v. 269, n. 50, p. 31659-65, Dec 1994.

GRADONI, L.; SOTERIADOU, K.; LOUZIR, H.; DAKKAK, A.; TOZ, S. O.; JAFFE, C.; DEDET, J. P.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C.; DUJARDIN, J. C. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. **Trop Med Int Health**, v. 13, n. 10, p. 1272–1276, Aug 2008.

GROGL, M.; THOMASON, T. N.; FRANKE, E. D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 1, p. 117-26, Jul 1992.

HADIGHI, R.; MOHEBALI, M.; BOUCHER, P.; HAJJARAN, H.; KHAMESIPOUR, A.; OUELLETTE, M. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian Cutaneous

leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. **PLOS Medicine**, v.3, n.5, p.659-667, Apr 2006.

HERWALDT, B.L.; BERMAN, J. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 46, n. 3, p. 296-306, Mar 1992.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v. 341, n. 24, p. 1795–1800, Dec 1999.

KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 8, p. 1630–1634, Aug 1992

KUMAR, D.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. In Vitro Susceptibility of Field Isolates of *Leishmania donovani* to Miltefosine and Amphotericin B: Correlation with Sodium Antimony Gluconate Susceptibility and Implications for Treatment in Areas of Endemicity. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 53, n. 2, p. 835–838, Feb 2009.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L.; PÓVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A. Y. Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. **A Leishmania e as Leishmanioses**. Belém: Fundação de Serviços de Saúde Pública, 1986, p. 88.

LEPROHON, P.; LEGARE, D.; GIRARD, I.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 1713–1725, 2006.

LIRA, R.; SUNDAR, S.; MAKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SACKS, D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *L. donovani*. **J Infect Dis**, v. 180, n. 2, p.564-7, June1999.

LIVAK, K. J. E SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. **METHODS**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L. H.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, A. T.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, R. S.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, E. M. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 12, e912, Dec 2010.

MALTEZOU, H. C.; SIAFAS, C.; MAVRIKOU, M.; SPYRIDIS, P.; STAVRINADIS, C.; KARPATIOS, T.; KAFETZIS, D. A. Visceral leishmaniasis during childhood in Southern Greece. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 5, p. 1139–1143, Nov 2000.

MALTEZOU, H. C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 1-8, Nov 2009.

MATLASHEWSKI, G.; ARANA, B.; KROEGER, A.; BATTACHARYA, S.; SUNDAR, S.; DAS, P.; SINHA, P. K.; RIJAL, S.; MONDAL, D.; ZILBERSTEIN, D.; ALVAR, J. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 4, p. 322-325, Apr 2011.

MAYHO, M.; FENN, K.; CRADDY, P.; CROSTHWAITE, S.; MATTHEWS, K.; Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 18, p. 5312-24, Sep 2006.

MINODIER, P.; PIARROUX, R.; GARNIER, J. M.; UNAL, D.; PERRIMOND, H.; DUMON, H. Pediatric visceral leishmaniasis in Southern France. **Pediatr Infect Dis J**, v. 17, n. 8, p. 701–704, Aug 1998.

MOLLINEDO, F.; FERNÁNDEZ-LUNA, J. L.; GAJATE, C.; MARTÍN-MARTÍN, B.; BENITO, A.; MARTÍNEZ-DALMAU, R.; MODOLELL, M. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). **Cancer Res**, v. 57, n. 7, p. 1320-8, Apr 1997.

MURRAY, H. W. Progress in treatment of a neglected disease: visceral leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 2, n. 2, p. 279 - 292, Apr 2004.

NARDELLI, S. C.; AVILA, A. R.; FREUND, A.; MOTTA, M. C.; MANHÃES, L.; DE JESUS, T. C.; SCHENKMAN, S.; FRAGOSO, S. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; DALLAGIOVANNA, B. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 2, p. 337-45, Feb 2007.

NAVIN, T. R.; ARANA, B. A.; ARANA, F. E.; BERMAN, J. D.; CHAJÓN, J. F. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J Infect Dis**, v. 165, n. 3, p. 528-34, Mar 1992.

NICOLLE, C. Nouvelles acquisition sur le Kala-azar culture; innovation auchien; etiologie – C.R. **Hedd Sciennes et Acad Sci**, v.146, p.498-499, 1908.

NOVY, F. G.; MCNEAL, W. J. The cultivation of *Trypanosoma brucei*: a preliminary note. **J. American Med Assoc**, v.41, p.1266-1268, 1903.

PEREZ-VICTORIA, J. M.; PARODI-TALICE, A.; TORRES, C.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. **Int Microbiol**, v. 4, n. 3, p. 159–16, Sep 2001a.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; PARODI-TALICE, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a

novel P-glycoprotein- like transporter modulator. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n.9, p. 2468–2474, Sep 2001b.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 8, p. 2397–403, Aug 2003a.

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

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

PÉREZ-VICTORIA, F.J.; SÁNCHEZ-CANETE, M. P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **J Biol Chem**, v. 281, n. 33, PP.23766-23775, Aug 2006b.

PÉREZ-VICTORIA, J. M.; CORTÉS-SELVA, F.; PARODI-TALICE, A.; BAVCHVAROV, B. I.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; MAITREJEAN, M.; COSTI, M. P.; BARRON, D.; DI PIETRO, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Combination of suboptimal doses of inhibitorstargeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to miltefosine by inhibiting drug efflux. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3102–3110, Sep 2006c.

RAGUENAUD, M. E.; JANSSON, A.; VANLERBERGHE, V.; DEBORGGRAEVE, S.; DUJARDIN, J. C.; ORFANOS, G.; REID, T.; BOELAERT, M. Epidemiology and clinical features of patients with visceral leishmaniasis treated by an MSF clinic in Bakool Region, Somalia, 2004–2006. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 1, p. e85, Oct 2007.

RIJAL, S.; CHAPPUIS, F.; SINGH, R.; BOVIER, P. A.; ACHARYA, P.; KARKI, B. M.; DAS, M. L.; DESJEUX, P.; LOUTAN, L.; KOIRALA, S. Treatment Of Visceral Leishmaniasis In South-Eastern Nepal: Decreasing Efficacy Of Sodium Stibogluconate And Need For A Policy To Limit Further Decline. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 97, n. 3, p.350–354, May-June 2003.

RIJAL, S.; YARDLEY, V.; CHAPPUIS, F.; DECUYPERE, S.; KHANAL, B.; SINGH, R.; BOELAERT, M.; DE DONCKER, S.; CROFT, S.; DUJARDIN, J. C. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome? **Microbes Infect**, v.9, n.4, p.529-535, Jan 2007.

ROJAS, R.; VALDERRAMA, L.; VALDERRAMA, M.; VARONA, M. X.; OUELLETTE, M.; SARAVIA, N. G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **J Infect Dis**, v.193, n. 10, p.1375-83, Apr 2006.

ROMERO, G. A.; GUERRA, M. V.; PAES, M. G.; MACÊDO, V. O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 456-65, Nov 2001.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-83, 2001

SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P.; CARVALHO, L.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. Low Plasma Membrane Expression of the Miltefosine Transport Complex Renders *Leishmania braziliensis* Refractory to the Drug. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1305–1313, Apr 2009.

SEGATTO, M.; RIBEIRO, L. S.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H.; OLIVEIRA, M. R.; CARVALHO, S. F.; MACEDO, A. M.; VALADARES, H. M.; DIETZE, R.; BRITO, C. F.; LEMOS, E. M. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 39-47, Feb 2012.

SEIFERT, K.; MATU, S.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S. L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int J Antimicrob Agents**, v. 22, n. 4, p. 380-7, Oct 2003.

SEIFERT, K.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; STETTLER, M.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S. L. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 3, p. 229-35, Sep 2007.

SINGH, R.; KUMAR, D.; RAMESH, V.; NEGI, N. S.; SINGH, S.; SALOTRA, P. VL, or Kala azar: high incidence os refractoriness to antimony is contributed by anthroponotic transmission via post-KA dermal leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.194, n. 3, p.302-6, June 2006.

SMALL, G. W.; STRUM, J. C.; DANIEL, L. W. Characterization of an HL-60 cell variant resistant to the antineoplastic ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. **Lipids**, v. 32, n. 7, p. 715-23, Jul 1997.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R. S.; PADILLA, J.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J.. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 7, p. 57–61, Sep 2001.

SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J. C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J. D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.;

SINDERMANN, H. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 9, p. 1266–72, May 2004.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; VALDA, L.; BALDERRAMA, M.; REA, I.; PARRA, R.; ARDILES, J.; SOTO, P.; GOMEZ, A.; MOLLEDA, F.; FUENTELESAS, C.; ANDERS, G.; SINDERMANN, H.; ENGEL, J.; BERMAN, J. Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 3, p. 350–6, 2007.

SOTO, J.; REA, J.; BALDERRAMA, M.; TOLEDO, J.; SOTO, P.; VALDA, L.; BERMAN, J. D. Efficacy of Miltefosine for Bolivian Cutaneous Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 2, p. 210–211, Feb 2008.

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

SUNDAR, S.; MAKHARIA, A.; MORE, D. K.; AGRAWAL, G.; VOSS, A.; FISCHER, C.; BACHMANN, P.; MURRAY, H. W. Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 4, p. 1110–1113, Oct 2000a.

SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. W. Failure Of Pentavalent Antimony In Visceral Leishmaniasis In India: Report From The Center Of The Indian Epidemic. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 4, p.1104–1107, Oct 2000b.

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

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

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

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

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

THAKUR, C. P.; SINGH, R. K.; HASSAN, S. M.; KUMAR, R.; NARAIN, S.; KUMAR, A. Amphotericin B deoxycolate treatment of visceral leishmaniasis with newer models of administration and precautions: a study of 938 cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, n. 3, p. 319 - 323, May-June 1999.

TORRES, D. C.; ADAUI, V.; RIBEIRO-ALVES, M.; ROMERO, G. A.; ARÉVALO, J.; CUPOLILLO, E.; DUJARDIN, J. C. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 6, p. 727-33, Aug 2010.

VERWEIJ, J.; PLANTING, A.; VAN DER BURG, M.; STOTER, G. A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 118, n. 8, p. 606–8, 1992.

WERNECK, G. L.; BATISTA, M. S.; GOMES, J. R.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, v. 31, n. 3, p. 174-7, June 2003.

WHO. **World Health Organization. Leishmaniasis.** Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 08 de dez. 2011.

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

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? **J Infect Dis**, v.194, n. 8, p.1168-75, Sep 2006.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; PEREIRA, L. I.; PELLI DE OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L.; ULIANA, S. R. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Trop Med Int Health**, v.15, n.1, p.68-76, Oct 2009.

ZOELLER, R. A.; LAYNE, M. D.; MODEST, E. J. Animal cell mutants unable to take up biologically active glycerophospholipids. **J Lipid Res**, v. 36, n. 9, p. 1866-75, Sep 1995.