



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELIZABETH MAGIOLO COSER

ATIVIDADE DA PAROMOMICINA *IN VITRO* CONTRA
ISOLADOS CLÍNICOS DE *LEISHMANIA* SPP. E SUA
EFICÁCIA *IN VIVO* NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR EXPERIMENTAL

ACTIVITY OF PAROMOMYCIN *IN VITRO* AGAINST
BRAZILIAN CLINICAL ISOLATES OF *LEISHMANIA* SPP. AND
ITS EFFICACY *IN VIVO* ON TREATMENT OF
EXPERIMENTAL TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

CAMPINAS

(2020)

ELIZABETH MAGIOLO COSER

ATIVIDADE DA PAROMOMICINA *IN VITRO* CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *LEISHMANIA* SPP. E SUA EFICÁCIA *IN VIVO* NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EXPERIMENTAL

ACTIVITY OF PAROMOMYCIN *IN VITRO* AGAINST BRAZILIAN CLINICAL ISOLATES OF *LEISHMANIA* SPP. AND ITS EFFICACY *IN VIVO* ON TREATMENT OF EXPERIMENTAL TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the Master's Degree in Animal Biology, in the area of Human Relations, Environment and Parasitology.

Orientador: PROF. DR. ADRIANO CAPPELLAZZO COELHO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ELIZABETH
MAGIOLO COSER E ORIENTADA PELO PROF.
DR. ADRIANO CAPPELLAZZO COELHO.

CAMPINAS

(2020)

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C82a Coser, Elizabeth Magiolo, 1996-
Atividade da paromomicina *in vitro* contra isolados clínicos de *Leishmania* spp. e sua eficácia *in vivo* no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental / Elizabeth Magiolo Coser. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Adriano Cappellazzo Coelho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Paromomicina. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Leishmaniose tegumentar americana. I. Coelho, Adriano Cappellazzo, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Activity of paromomycin *in vitro* against brazilian clinical isolates of *Leishmania* spp. and its efficacy *in vivo* on treatment of experimental tegumentary leishmaniasis

Palavras-chave em inglês:

Paromomycin

Leishmania amazonensis

Leishmaniasis, Cutaneous

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Adriano Cappellazzo Coelho [Orientador]

Selma Giorgio

Nilmar Silvio Moretti

Data de defesa: 04-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8664-2009>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5854178258813975>

Campinas, 4 de fevereiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

Prof.(a). Dr.(a) Selma Giorgio

Prof. Dr. Nilmar Silvio Moretti

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Unidade do Instituto de Biologia/UNICAMP.

Aos meus pais, Sonia e Paulo,
pelo incentivo, amor e carinho,
além de serem responsáveis por
tudo que sou hoje.

Aos meus amigos que estiveram
ao meu lado e me auxiliaram
para que este projeto fosse
realizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Paulo e Sonia, que com muito amor e carinho sempre me ensinaram a seguir meus sonhos, a ser paciente, por terem insistido em mim e acreditarem nos meus sonhos e, principalmente, estarem ao meu lado nas decisões mais difíceis da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano C. Coelho por ter me dado a oportunidade de crescer ao seu lado, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança e pela amizade. Agradeço também por ter me ajudado a crescer profissionalmente, ao me fazer ter um olhar mais crítico em relação à ciência e a tudo que é produzido em artigos. Você foi e continuará sendo uma das pessoas mais importantes da minha vida, que me ajudou a evoluir todo esse tempo que estamos trabalhando juntos.

Aos meus padrinhos Dalva e Osmar, que com muita amizade, estiveram ao meu lado e me acompanharam nesta caminhada.

À minha família, pelo apoio, paciência e cumplicidade.

À Bianca, que foi e continuará sendo a minha companheira de experimentos, a primeira amiga que tive no Laboratório e que me aguentou por todo esse tempo. Também agradeço por ter ajudado neste trabalho e em tantos outros que estamos realizando juntas, pelas dicas e por toda a ajuda que me deu quando eu mais precisei, sendo profissionalmente ou emocionalmente. Você será sempre uma das pessoas mais importantes da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, Thales, Tábata e Cristiele pela amizade e convivência diária do Laboratório e por fazerem os meus dias ficarem mais leves e felizes.

À Viviane, que passou um bom tempo comigo no laboratório, pelo carinho e amizade, minha companheira junto com a Bianca, que me ajudou muito neste meu trabalho e no meu crescimento pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Nilson, Cirene e Camilo, pelo excelente trabalho com os animais e pelo carinho imenso que tenho por cada um de vocês, com agradecimento especial ao Nilson por ter auxiliado nos ensaios *in vivo*.

Ao Prof. Dr. José Angelo L. Lindoso do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e à Edite H. Yamashiro Kanashiro do Instituto de Medicina Tropical de São

Paulo por disponibilizarem os isolados clínicos para que este trabalho fosse realizado.

Aos professores e professoras do Departamento de Parasitologia, Marlene, Silmara, Fernanda, Danilo, Carlos, Selma e Patrícia por terem participado do meu crescimento profissional. Agradeço especialmente a Prof. Dra. Fernanda J. Cabral, por ter emprestado o material necessário para a realização dos meus experimentos e pelo grande carinho que tenho pela Prof. Dra. Marlene por fazer meus dias mais alegres, além de todo o conhecimento que me proporcionaram.

À minha amiga Bianca, por estar presente em todos os momentos importantes da minha vida, inclusive este e por ser minha companheira para toda e qualquer situação.

À minha psicóloga Taísa, pelo auxílio imenso e carinho que me deu durante os dois últimos anos e que tem me ajudado a ver a vida com mais leveza.

À minha prima Vanessa, que é mais irmã do que prima, por estar sempre ao meu lado e por me proporcionar muitos momentos felizes.

À minha melhor amiga, Karen, por ser essa pessoa maravilhosa, que alegria todos os meus dias, que me diverte, que é minha eterna companheira, que me escuta quando eu preciso e me chama a atenção se necessário.

À Mariana, minha companheira, que embora não tenhamos trabalhado juntas, tem me ajudado em todos os momentos, inclusive naqueles em que achava que não havia saída. Agradeço pelo apoio, carinho e atenção, além da amizade que pretendo manter sempre.

À Amanda, pela amizade verdadeira e sincera, e que juntamente com a Karen, são as pessoas que me aguentam e me acompanham nos rolês, fornecem uma cama e um cobertor quentinho toda vez que me abrigo em sua casa, e que tem me mostrado o melhor da Unicamp. Agradeço também pela companhia, carinho e compreensão, que tem me ajudado a passar por todos os momentos da minha vida com plena certeza que sempre terei alguém em quem posso confiar.

Aos meus amigos do LEBIL e LEI, pelo imenso carinho, ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite do Instituto de Biologia, pelas bactérias fornecidas para a realização das clonagens, além dos equipamentos do seu laboratório.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro que me forneceu no processo nº 2018/03299-0, em forma de bolsa e reserva técnica para que pudesse participar de Congressos e Encontros, que fizeram parte do meu crescimento profissional como bióloga e de materiais necessários para a realização deste projeto. É importante ressaltar que as hipóteses ou conclusões neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“A ciência sempre será uma busca,
nunca uma descoberta real.
É uma viagem, nunca uma chegada.”*

Karl Raiumd Popper

RESUMO

Atividade da paromomicina *in vitro* contra isolados clínicos de *Leishmania* spp. e sua eficácia *in vivo* no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo em áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, o número de casos da doença tem aumentado nos últimos anos, principalmente em áreas urbanas. O tratamento das leishmanioses no Brasil é limitado a fármacos que, além do alto custo e efeitos colaterais, são administrados por via parenteral. Recentemente, dois novos fármacos foram aprovados no tratamento da leishmaniose visceral na Ásia: a miltefosina e a paromomicina (PAR). Uma vez que estes fármacos não são utilizados no tratamento das leishmanioses no Brasil, faz-se necessário avaliar a eficácia destes fármacos como alternativa de tratamento no país. Neste trabalho foi avaliada a suscetibilidade à PAR *in vitro* em isolados clínicos de pacientes com leishmaniose tegumentar e cepas referência das espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil, bem como a sua eficácia *in vivo* em modelo experimental murino para uma das espécies que causa a leishmaniose tegumentar no país: *L. (Leishmania) amazonensis*. Pelo método de amplificação do gene *hsp70* seguido de digestão com enzima de restrição *HaeIII* e do sequenciamento de DNA do espaçador interno transcrito (ITS), foi possível identificar as espécies dos 16 isolados clínicos utilizados neste estudo. Destes isolados, 8 deles foram identificados como sendo *L. (Viannia) braziliensis*, 5 deles *L. (L.) amazonensis*, dois deles *L. (V.) guyanensis* e um deles *L. (V.) shawi*. Os valores de EC₅₀ de PAR em promastigotas de isolados clínicos e cepas referência do parasito variaram de 4,95 a 205,03 µM, enquanto que os valores de EC₅₀ na forma amastigota variaram de 0,19 a 111,2 µM. Os ensaios *in vivo* foram realizados utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com 75, 150, 300 e 600 mg/kg/dia de PAR durante 14 dias por via intraperitoneal. Os animais tratados com as dosagens de 300 e 600 mg/kg/dia apresentaram redução significativa no tamanho da lesão. Além disso, o grupo tratado com 600 mg/kg/dia teve uma diminuição na carga parasitária em cerca de 90%. Um segundo ensaio *in vivo* realizado com animais infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* e um isolado clínico da mesma espécie tratados

com dosagens de 150 e 600 mg/kg/dia de PAR, demonstrou que o isolado clínico, mais sensível à PAR na forma amastigota *in vitro*, apresentou redução significativamente maior da carga parasitária quando comparado com a cepa referência, sugerindo uma possível correlação entre a atividade do fármaco *in vitro* e a eficácia do tratamento *in vivo*. Os resultados deste trabalho podem contribuir na avaliação do potencial de uso da PAR na quimioterapia da leishmaniose tegumentar no Brasil.

ABSTRACT

Activity of paromomycin *in vitro* against Brazilian clinical isolates of *Leishmania* spp. and its efficacy *in vivo* on treatment of experimental tegumentary leishmaniasis

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania* that affects millions of people worldwide in tropical and subtropical areas. In Brazil, the number of cases of disease has increased in recent years, especially in urban areas. The treatment of leishmaniasis in Brazil is limited to drugs that are administered parenterally, are expensive and cause several side effects. Recently, two drugs were approved as alternatives to the treatment of visceral leishmaniasis in Asia: miltefosine and paromomycin (PAR). Although these drugs have not yet been approved for the treatment of leishmaniasis in Brazil, it is necessary to evaluate the efficacy of these drugs as alternative for the treatment of leishmaniasis in Brazil. In this study, the susceptibility to PAR *in vitro* of clinical isolates of patients with tegumentary leishmaniasis and reference strains of endemic *Leishmania* species in Brazil was evaluated, as well as its *in vivo* efficacy in a murine experimental model for one of the species that causes cutaneous leishmaniasis in Brazil: *L. (Leishmania) amazonensis*. Typing of 16 clinical isolates by PCR of *hsp70* gene followed by digestion with the restriction enzyme *HaeIII* and DNA sequencing of ITS (internal transcribed spacer) allowed the identification of the species among these isolates: 8 isolates were *L. (Viannia) braziliensis*, 5 isolates *L. (L.) amazonensis*, two isolates *L. (V.) guyanensis* and one isolate *L. (V.) shawi*. The EC₅₀ values of PAR in promastigotes of clinical isolates and reference strains ranged from 4.95 to 205.03 μ M, while the EC₅₀ values in intracellular amastigotes ranged 0.19 to 111.2 μ M. *In vivo* studies were performed using BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with doses of 75, 150, 300 and 600 mg/kg/day of PAR for 14 days administered intraperitoneally. Animals treated with dosages of 300 and 600 mg/kg/day presented a significant reduction in lesion size. In addition, animals treated with 600 mg/kg/day had a reduction in parasite burden of 90%. A second *in vivo* trial of animals infected with the reference strain of *L. (L.) amazonensis* and a clinical isolate of the same species treated with dosages of 150 and 600 mg/kg/day of PAR showed that the clinical isolate, more sensitive to PAR in amastigote form *in*

vitro, showed significantly greater reduction in parasite load when compared to the reference strain, suggesting a possible correlation between drug activity *in vitro* and *in vivo* treatment efficacy. The results of this study will contribute to evaluate the potential use of PAR in chemotherapy of cutaneous leishmaniasis in Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do protozoário parasita do gênero *Leishmania*.

Figura 2: Principais fármacos utilizados no tratamento da LT e LV no mundo.

Figura 3: Produto amplificado do gene *hsp70* (1.286 pb) dos isolados clínicos do Instituto de Infectologia ER e das cepas referência de *Leishmania* spp. e digestão com enzima de restrição *HaeIII* dos respectivos produtos amplificados.

Figura 4: Neighbor-net utilizando o software SplitsTree v4.11.3 mostrando a relação entre as sequências de ITS dos isolados clínicos e das espécies de *Leishmania*.

Figura 5: Neighbor-net utilizando o software SplitsTree v4.11.3 mostrando a relação entre as sequências de ITS dos isolados clínicos ER044 e ER108 e das espécies de *Leishmania*.

Figura 6: Neighbor-net utilizando o software SplitsTree v4.11.3 mostrando a relação entre as sequências de ITS do isolado clínico ER114 e das espécies de *Leishmania*.

Figura 7: Suscetibilidade à PAR na forma promastigota.

Figura 8: Suscetibilidade à PAR na forma promastigota das respectivas cepas referência e dos isolados clínicos de *Leishmania* spp.

Figura 9: Curva dose-resposta utilizando Trypan Blue 0,4% para citotoxicidade em macrófagos derivados de medula óssea em presença de concentrações crescentes de PAR após 48h ou 72h.

Figura 10: Porcentagem de infecção das cepas referência e dos isolados clínicos em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c.

Figura 11: Suscetibilidade à PAR na forma amastigota intracelular.

Figura 12: Suscetibilidade à PAR na forma amastigota intracelular das respectivas cepas referência e dos isolados clínicos de *Leishmania* spp.

Figura 13: Tratamento piloto com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Figura 14: Tratamento piloto com PAR por via intramuscular de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Figura 15: Tratamento com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Figura 16: Validação dos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR em tempo real. Amplificação por PCR do gene *g6pdh* (110 pb) de *Leishmania amazonensis* e do gene de β -actina (722 pb) de camundongo.

Figura 17: Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados ou não com PAR.

Figura 18: Massa corporal média dos grupos de animais tratados e não tratados com PAR.

Figura 19: Tratamento com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Figura 20: Tratamento com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com o isolado clínico ER256 de *L. (L.) amazonensis*.

Figura 21: Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real dos animais infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* e com o isolado clínico ER256 tratados ou não com PAR.

Figura 22: Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c não infectados, infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) ou o isolado ER256 não tratados e tratados com PAR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies causadoras das formas clínicas da LV e LT no Brasil, sua distribuição geográfica e seus potenciais vetores.

Tabela 2: Características principais dos fármacos utilizados no tratamento da LT e LV no mundo.

Tabela 3: Lista de isolados clínicos de pacientes com leishmaniose do Instituto de Infectologia ER.

Tabela 4: Identidade das sequências consenso da região do ITS de cada isolado clínico com as sequências das principais cepas referência.

Tabela 5: Lista dos isolados clínicos de pacientes com leishmaniose do Instituto de Infectologia ER e a identificação das respectivas espécies dos isolados através de métodos moleculares.

Tabela 6: Suscetibilidade à PAR na forma promastigota das respectivas cepas referência e dos isolados clínicos.

Tabela 7: Suscetibilidade à PAR na forma amastigota das cepas referência e dos isolados clínicos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CC ₅₀	50% da concentração máxima citotóxica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%
EC ₉₀	Concentração necessária para inibir o crescimento celular em 90%
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ER	Emílio Ribas
<i>g</i>	Aceleração da gravidade ($\cong 9,8 \text{ m/s}^2$)
g	Grama
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>hsp70</i>	<i>Heat shock protein 70</i>
IS	Índice de seletividade
ITS	Espaçador interno transcrito
kb	Quilobase
kg	Quilograma
L	Litro
LB	Luria Bertani
LSU	Subunidade maior do RNA ribossomal
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
RNAse	Ribonuclease
PAR	Paromomicina
pb	Par de bases
PBS	Tampão fosfato salino

PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSU	Subunidade menor do RNA ribossomal
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
U	Unidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1 As leishmanioses.....	22
1.2 Gênero <i>Leishmania</i>	24
1.2.1 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	25
1.3 Inseto Vetor.....	27
1.4 Tratamento.....	28
1.4.1 Paromomicina.....	34
2. Justificativa.....	36
3. Objetivos.....	38
4. Material e métodos.....	40
4.1 Parasitos, células de mamíferos e animais.....	41
4.2 Identificação molecular de isolados clínicos de <i>Leishmania</i> sp.....	42
4.2.1 Extração de DNA genômico de <i>Leishmania</i>	42
4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene <i>hsp70</i> e digestão com a enzima de restrição <i>Hae</i> III (PCR-F-RFLP)	43
4.2.3 Amplificação da região do ITS, clonagem e sequenciamento de DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	44
4.2.3.1 Amplificação da região do ITS.....	44
4.2.3.2 Ligação do DNA amplificado no vetor de clonagem pGEM-T easy.....	44
4.2.3.3 Transformação bacteriana do produto clonado no vetor pGEM-T.....	45
4.2.3.4 Extração do DNA plasmidial por lise alcalina e digestão com enzimas de restrição.....	46
4.2.3.5 Sequenciamento de nucleotídeos.....	46
4.3 Fármaco.....	47
4.4 Avaliação da suscetibilidade de promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> sp. à PAR.....	47
4.5 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos derivados de medula óssea.....	48
4.6 Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da PAR em modelo experimental de leishmaniose tegumentar.....	49
4.6.1 PCR em tempo real para análise de carga parasitária.....	50

4.6.2	Determinação dos níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e creatinina no sangue de animais infectados e tratados com PAR.....	50
4.7	Análise estatística.....	51
5.	Resultados.....	52
5.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene <i>hsp70</i> e digestão com a enzima de restrição <i>Hae</i> III (PCR-F-RFLP)	53
5.2	Sequenciamento da região do ITS em isolados clínicos de <i>Leishmania</i> spp.....	55
5.3	Avaliação da suscetibilidade de promastigotas de <i>Leishmania</i> sp. à PAR.....	60
5.4	Citotoxicidade.....	64
5.5	Avaliação da suscetibilidade de amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> sp. à PAR.....	65
5.6	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da PAR em modelo experimental de leishmaniose tegumentar.....	71
5.6.1	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da PAR contra a cepa referência de <i>L. (L.) amazonensis</i>	71
5.6.2	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da PAR contra a cepa referência de <i>L. (L.) amazonensis</i> e o isolado clínico ER256.....	78
6.	Discussão.....	85
7.	Conclusão.....	94
8.	Referências.....	96
9.	Anexos.....	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* que são transmitidos através da picada de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (Murray, Berman et al. 2005). A leishmaniose humana pode ter dois tipos de transmissão: zoonótica e antroponótica (Steverding, 2017). A transmissão zoonótica ocorre em ambientes domésticos, nos quais o cão é o principal reservatório do parasito, podendo também ser felídeos e equídeos, ou em ciclos silvestres onde a transmissão ocorre entre animais selvagens (roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres), com os humanos sendo hospedeiros acidentais (Bern, Maguire et al. 2008). A transmissão antroponótica ocorre quando há transmissão entre humanos na presença do vetor, sendo o ser humano o reservatório (Alvar, Velez et al. 2012). As leishmanioses apresentam duas formas clínicas distintas da doença: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), sendo esta última a manifestação clínica mais comum com uma estimativa de 0,7 a 1,5 milhão de novos casos por ano (WHO, 2016). No Brasil, a LT é causada principalmente por *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, com menos casos relacionados a outras espécies. Dentre essas espécies já relacionadas a doença humana, podemos citar *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) lindenbergi* (Jennings, de Souza et al. 2014, Fagundes-Silva, Romero et al. 2015, Guimaraes, Silva et al. 2017, Cantanhede, Mattos et al. 2019). A LT pode se apresentar em quatro formas distintas: cutânea localizada, cutânea disseminada, mucocutânea ou cutânea difusa (Reithinger, Dujardin et al. 2007). A forma cutânea localizada é caracterizada por lesões na pele e úlceras em partes expostas do corpo, que podem adquirir infecções secundárias, deixando cicatrizes permanentes (Desjeux, 1996; WHO, 1990). A forma cutânea difusa é menos comum e difere da forma cutânea localizada pelo aparecimento de múltiplos nódulos sem ulceração em todo o corpo. A forma mucocutânea é restrita apenas aos países da América Latina e caracteriza-se pela disseminação de úlceras na mucosa do nariz, boca e garganta, produzindo lesões destrutivas na face (Desjeux 1996, Ahluwalia, Lawn et al. 2004). De maneira geral, na LT o parasita infecta macrófagos residentes da pele e se multiplica sucessivamente até o rompimento da membrana da célula hospedeira, liberando os amastigotas intracelulares, forma presente no hospedeiro mamífero, que infectarão

outros macrófagos (Steverding, 2017). A LV é a forma mais grave da doença e quando não tratada, é fatal em 95% dos casos. No Brasil, a LV é causada por *L. (L.) infantum*. Os principais sintomas da LV incluem febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. No caso da LV, os amastigotas liberados vão se disseminar pela circulação sanguínea e infectar células do sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e linfonodos (Steverding, 2017).

As manifestações clínicas das diferentes formas clínicas das leishmanioses no homem estão relacionadas com a espécie do parasito infectante e a suscetibilidade do hospedeiro humano (Murray, Berman et al. 2005).

A prevalência global estimada das leishmanioses é de 1,3 milhão de casos por ano em mais de 98 países de regiões tropicais e subtropicais (Alvar, Velez et al. 2012). O número de casos da LV varia de 200 a 400 mil por ano, com mais de 90% dos casos ocorrendo na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil. A LT afeta 700 mil a 1,5 milhões de pessoas no Mediterrâneo, Américas e Ásia, sendo que 75% dos casos são encontrados no Brasil, Síria e Afeganistão (WHO, 2016). A ocorrência da LT tem se expandido geográfica e numericamente (Oliveira, Lacerda et al. 2004). O aumento no número de pessoas acometidas pela doença durante os últimos anos em todo o mundo se dá por diversos fatores, sendo os principais a globalização, mudanças climáticas, migração de pessoas e aquecimento global, sendo o último responsável pela expansão da distribuição do vetor, contribuindo para a expansão da leishmaniose para áreas não endêmicas (Shaw 2007, Aspöck, Gerersdorfer et al. 2008). No Brasil, cerca de 20 mil novos casos de LT têm sido reportados anualmente. Já o número de casos de LV são de cerca de 3.000 por ano no território brasileiro (Alvar, Velez et al. 2012).

No Brasil, *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie de maior prevalência com ampla distribuição geográfica no território nacional. Esta espécie está relacionada a quadros clínicos cutâneos localizados, à leishmaniose disseminada e à forma mucosa que infecta e destrói os tecidos da mucosa nasofaríngea em até 10% dos pacientes (Reithinger, Dujardin et al. 2007). Embora em menor frequência, também ocorrem infecções por *L. (L.) amazonensis*, associada a quadros de leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa, esta última refratária aos tratamentos disponíveis até o momento. Essa espécie está distribuída pelas florestas da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), ampliando-se para o Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (São Paulo

e Minas Gerais) e Sul (Paraná) (Ministério da Saúde, 2014). Relatos de infecções por *L. (V.) guyanensis*, espécie que está associada a quadros cutâneos localizados, geralmente de difícil tratamento, também têm sido reportados, cuja distribuição está limitada à Região Norte (Amazonas, Acre, Amapá, Roraima e Pará) (Ministério da Saúde, 2014). Além disso, estudos mais recentes têm reportado um aumento do número de casos de infecção por outras espécies do parasito, como *L. (V.) naiffi* na região Amazônica, cujas infecções cutâneas não apresentam cura espontânea e a resposta ao tratamento nem sempre é satisfatória (Fagundes-Silva, Romero et al. 2015). As outras espécies de *Leishmania* causadoras da LT no Brasil que são menos frequentes, encontram-se predominantemente no Norte e Nordeste do país, sendo: *L. (V.) lainsoni* que ocorre no Pará, Rondônia e Acre; *L. (V.) shawi* no Pará e Maranhão; *L. (V.) naiffi* no Pará e Amazonas e *L. (V.) lindenbergi* no Estado do Pará (Ministério da Saúde, 2014) (Tabela 1).

1.2 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* é compreendido por protozoários tripanosomatídeos pertencentes ao subgrupo Kinetoplastea (Uliana, 2012) e engloba pouco mais de 20 espécies que causam a leishmaniose em humanos. Os tripanosomatídeos são protozoários parasitos dotados de um único flagelo que possuem organelas comuns a outras células eucarióticas, porém outras organelas são restritas a esse grupo. Esses protozoários possuem acidocalcissomos, glicossomos e cinetoplasto. O cinetoplasto é o DNA da única mitocôndria desses protozoários, que contém uma grande quantidade de DNA extracelular, organizado em duas classes de DNAs circulares: os minicírculos e os maxicírculos (Uliana, 2012).

Os glicossomos são peroxissomos modificados, capazes de compartimentalizar algumas vias metabólicas, tais como a via glicolítica e β -oxidação de ácidos graxos, por exemplo (Michels, Bringaud et al. 2006). Os megassomos são organelas cujo conteúdo consiste de proteinases de cisteína, estando relacionado a acumulação e possível degradação de macromoléculas endocitadas (Vannier-Santos, Martiny et al. 2002).

Os acidocalcissomos são organelas capazes de acumular grande quantidade de íons cálcio, magnésio e zinco, além de conterem as enzimas

pirofosfatase e polifosfatase (Docampo e Moreno 2001). Estes estão envolvidos na resposta a mudanças no pH e pressão osmótica (Kornberg, Rao et al. 1999).

As leishmânias são parasitos digenéticos, apresentando duas formas: promastigota e amastigota (Pace, 2014). Estas formas são consideradas adaptações às mudanças nas condições ambientais sofridas dentro do inseto vetor e no hospedeiro mamífero (sobrevivência a variações de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, etc) (Santos, Araujo et al. 2008). As formas amastigotas são intracelulares obrigatórias, com corpo celular esférico ou ovóide, sem motilidade. São encontradas no interior de vacúolos das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos do hospedeiro mamífero (Uliana, 2012). As formas promastigotas possuem corpo celular fusiforme e alongado, com cinetoplasto localizado na extremidade do flagelo e são encontradas no tubo digestivo dos flebotomíneos. Com base na localização no tubo digestivo do inseto vetor, os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Leishmania*, que apresenta comportamento suprapilárico, com desenvolvimento restrito à porção anterior do tubo digestivo e que é encontrada nas Américas, Europa, Ásia e África, e o subgênero *Viannia*, com desenvolvimento peripilárico, com estabelecimento de infecção inicial na porção posterior do trato digestivo, migrando para as porções anteriores durante o desenvolvimento. Este subgênero está presente somente nas Américas (Lainson, Shaw et al. 1987, Uliana, 2012, Pace, 2014).

1.2.1 Ciclo biológico de *Leishmania*

O ciclo de vida de *Leishmania* é heteróximo e se inicia com a ingestão de formas amastigotas intracelulares pela fêmea de um inseto flebotomíneo durante o seu repasto sanguíneo (Figura 1). As formas amastigotas estão presentes no interior de macrófagos do hospedeiro mamífero infectado pelo parasito. Os parasitos ingeridos diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas. Para escapar das enzimas digestivas do hospedeiro, os promastigotas escapam do saco alimentar e instalam-se na região do intestino. Após adesão ao epitélio digestivo, multiplicam-se. À medida que há uma redução dos nutrientes no tubo digestivo do vetor, as formas promastigotas procíclicas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, a forma infectante para o hospedeiro mamífero (Uliana, 2012). As formas promastigotas

metacíclicas possuem corpo celular pequeno, com flagelo maior que o corpo e não se dividem. Essas formas não têm sido encontradas aderidas, mas sim livres no lúmen do intestino do inseto vetor. Modificações estruturais nos lipofosfoglicanos da membrana do parasito ocorrem durante a metaciclogênese, processo de diferenciação do promastigotas procíclicos em promastigotas metacíclicos, que são responsáveis pelo desprendimento do protozoário do epitélio intestinal do flebotomíneo. Os promastigotas metacíclicos fazem uma migração retrógrada até a porção do esôfago do inseto, e são regurgitados quando a fêmea do inseto realiza novo repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero (Uliana, 2012). No hospedeiro mamífero, neutrófilos são atraídos para o local de inoculação dos parasitos. A maioria dos promastigotas fagocitados são destruídos no interior do fagossomo do neutrófilo. Devido a seu curto período de vida, os neutrófilos são fagocitados por macrófagos, adquirindo os parasitos do seu interior. Os parasitos internalizados permanecem envoltos pelo vacúolo parasitóforo, sobrevivendo à ação das enzimas lisossômicas. No interior da célula, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, devido ao pH ácido e o aumento da temperatura ao passar do inseto (25°C) para o mamífero (37°C), que funcionam como desencadeadores do processo de diferenciação do parasito (Peters e Sacks 2009, Uliana 2012). No macrófago, os amastigotas multiplicam-se até o rompimento da membrana da célula hospedeira e, quando livres, são fagocitados por macrófagos vizinhos.

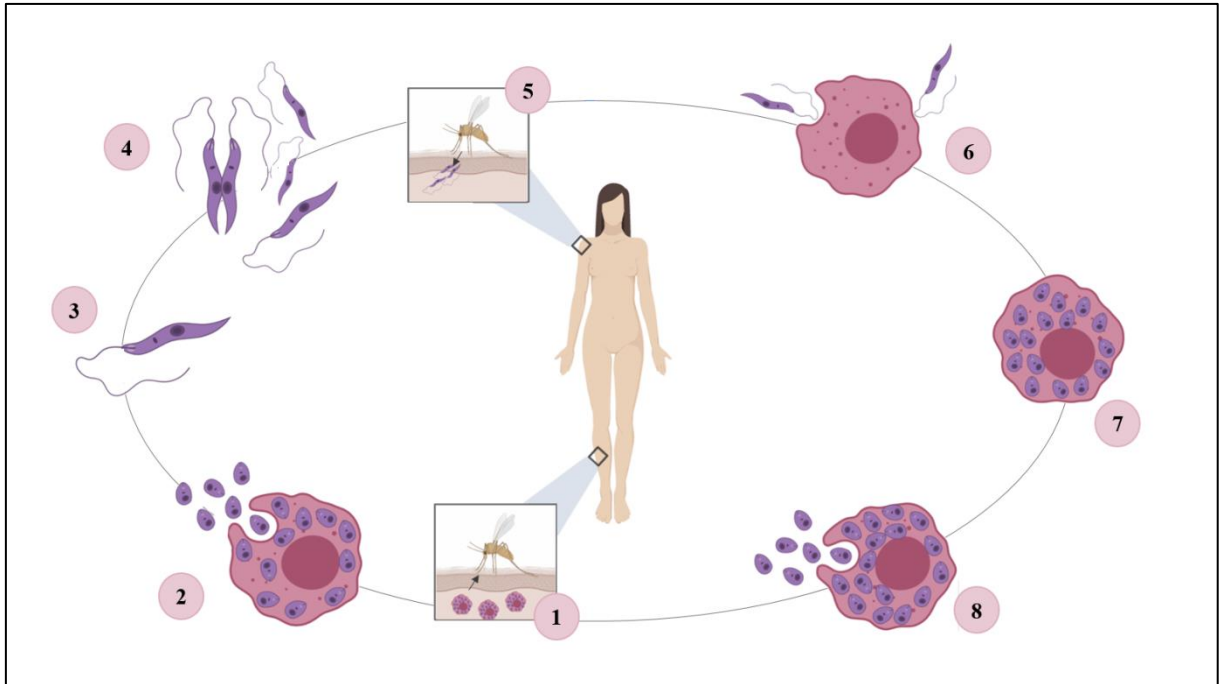


Figura 1. Ciclo de vida do protozoário parasita do gênero *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo fêmea ingere formas amastigotas intracelulares, que estão presentes no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero infectado (1). Os parasitos ingeridos se diferenciam em promastigotas procíclicas e se dividem até sua diferenciação em promastigotas metacíclicas, a forma infectante para o hospedeiro mamífero (2-4). Durante novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita promastigotas metacíclicas, que posteriormente serão fagocitadas por células do hospedeiro, como macrófagos e neutrófilos (5-6). No interior dessas células, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas (7), que se multiplicam até o rompimento da membrana macrófago, liberando-as e infectando novas células (8). O ciclo se reinicia quando o flebotomíneo ingere o sangue do hospedeiro mamífero infectado (1). Imagem gerada pelo software Biorender.

1.3 Inseto vetor

Os flebotomíneos são insetos dípteros hematófagos que estão presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália, sudeste da Europa e nas Américas (Killick-Kendrick, 1999). Os flebotomíneos são insetos pequenos, com corpo recoberto por inúmeras cerdas e coloração castanho escura (Killick-Kendrick, 1999). Os adultos vivem em abrigos úmidos e escuros e se alimentam de fontes naturais de açúcar (Warburg e Schlein 1986, Killick-Kendrick 1999, Uliana 2012). A alimentação sanguínea acontece no período noturno e a escolha pelo hospedeiro mamífero é um processo ainda pouco compreendido (Pimenta et al., 2012). Apenas as fêmeas realizam o repasto sanguíneo, que é essencial para o desenvolvimento de seus ovos. Alguns flebotomíneos se alimentam

do sangue de vários hospedeiros, incluindo canídeos, roedores e marsupiais, enquanto outros se alimentam principalmente de sangue humano (Steverding, 2017). São conhecidas mais de 800 espécies de flebotomíneos, porém apenas 30 destas espécies têm se mostrado capazes de transmitir a leishmaniose (Desjeux 2004, Sharma e Singh 2008, Maroli, Feliciangeli et al. 2013). Estas espécies pertencem ao gênero *Phlebotomus*, encontrado na Ásia, Europa e África e aos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* nas Américas (Uliana, 2012). No Brasil, pouco mais de 20 espécies de flebotomíneos são responsáveis pela transmissão das principais espécies endêmicas de *Leishmania* sp. As espécies do parasito que foram encontradas nas respectivas espécies de flebotomíneos no Brasil estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies causadoras das formas clínicas da LV e LT no Brasil, sua distribuição geográfica e seus potenciais vetores.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Distribuição geográfica	Vetor
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> , <i>Lu. longipalpis</i>
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul	<i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. complexa</i> , <i>Lu. neivai</i> , <i>Lu. edwardsi</i> , <i>Lu. migonei</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Região Norte	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i> , <i>Lu. whitmani</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	Regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i> , <i>Lu. almerio</i> , <i>Lu. salesi</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Região Norte	<i>Lu. ubiquitalis</i>
<i>L. (V.) lindenbergi</i>	Região Norte (Pará)	<i>Lu. antunesi</i> *
<i>L. (V.) naiffi</i>	Região Norte	<i>Lu. squamiventris</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	Regiões Norte e Nordeste	<i>Lu. whitmani</i>

Fonte: Alvar et al., 2012; Silveira et al., 2002; Marcondes e Rossi, 2013. *não confirmado

1.4 Tratamento

Os principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses no Brasil são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio), a anfotericina B e a pentamidina (Croft e Olliaro 2011) (Figura 2). Além do número limitado de fármacos, estes apresentam ainda restrições quanto à sua toxicidade, custo do tratamento e administração por via parenteral. Além disso, a situação tem sido agravada pela emergência de resistência clínica aos antimoniais pentavalentes (Croft, Sundar et al. 2006). No Brasil, antimoniato de

meeglumina constitui a primeira linha de tratamento tanto para a LV quanto para a LT. Estes são usados para o tratamento das leishmanioses desde a década de 40 e inicialmente acreditava-se que inibiam a glicólise e outras vias metabólicas (Herwaldt e Berman 1992). Contudo, outros mecanismos de ação foram elucidados. Sabe-se que o antimonial pentavalente (SbV) precisa ser reduzido a sua forma trivalente (SbIII) para ter atividade antiparasitária (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). Dessa forma, tanto SbIII quanto SbV medeiam a fragmentação do DNA do parasita, sugerindo que antimoniais conduzem os parasitas a um processo de morte celular semelhante ao processo de apoptose (Serenó, Holzmüller et al. 2001, Sereno, Roy et al. 2001, Lee, Bertholet et al. 2002).

No Brasil, para o tratamento de pacientes com as formas cutânea localizada e disseminada, sugere-se doses que variam entre 10 e 20 mg SbV/Kg/dia tanto para adultos quanto para crianças durante 20 dias seguidos (Ministério da Saúde, 2007). A resposta clínica deste fármaco é altamente variável, chegando a taxas de cura de cerca de 50% em infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (Machado, Ampuero et al. 2010, Chrusciak-Talhari, Dietze et al. 2011). Na forma difusa, causada por *L. (L.) amazonensis*, a dose recomendada é de 20 mg SbV/kg/dia durante 20 dias, sendo frequente as recidivas (Ministério da Saúde, 2007). Na Índia, as doses de antimoniais utilizadas para o tratamento aumentaram significativamente nos últimos 50 anos e as taxas de cura não atingem mais do que 50% dos pacientes com LV (Sundar 2001), o que faz com que estes não sejam mais utilizados na quimioterapia da doença.

A anfotericina B vem sendo utilizada no Brasil em casos de não resposta ao tratamento pelos antimoniais e em casos de coinfeção por HIV. É esperado, no entanto, o aparecimento de casos de resistência também a anfotericina B, devido a sua maior utilização, além da sua elevada meia-vida no plasma sanguíneo, o que aumenta a possibilidade de seleção de parasitos resistentes (Croft, Sundar et al. 2006). Apesar dos bons resultados clínicos, a significativa toxicidade da anfotericina B (principalmente a nefrotoxicidade) levou ao desenvolvimento de uma formulação lipídica do fármaco. Sua toxicidade se torna significativamente reduzida quando mantida após sua incorporação em uma bicamada lipossômica (Wingard, White et al. 2000, Stone, Bicanic et al. 2016). A forma lipossomal da anfotericina B, administrada em dose única, tem sido considerada o fármaco recomendado juntamente com a miltefosina na quimioterapia da LV na Índia, ambas com

resultados bastante satisfatórios (Sundar e Chakravarty 2013). A anfotericina B lipossomal é a formulação lipídica menos nefrotóxica quando comparadas a outras formulações da anfotericina B, contudo os efeitos colaterais, mesmo que reduzidos, se mantém (Mistro, Maciel Ide et al. 2012, Adler-Moore, Gangneux et al. 2016, Stone, Bicanic et al. 2016). As formulações lipídicas foram desenvolvidas para minimizar os efeitos colaterais e melhorar a tolerabilidade do paciente (Yardley e Croft 1997, Sundar, Mehta et al. 2004, Lemke, Kiderlen et al. 2005). O mecanismo de ação da anfotericina B está associado à interação do fármaco com o ergosterol, o principal esterol da membrana plasmática do parasito. A anfotericina B causa a formação de poros na membrana, alterando a permeabilidade a íons, e assim, causando a morte do parasito (Ramos, Saint-Pierre-Chazalet et al. 1994, Ramos, Valdivieso et al. 1996).

A pentamidina é utilizada com menor frequência, já que apresenta toxicidade ainda maior do que aquela relatada para os antimoniais pentavalentes. A toxicidade associada a esse fármaco inclui hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade e hipotensão. Sua utilização no Brasil restringe-se essencialmente a casos de LT refratários aos fármacos mencionados previamente. Outra característica da pentamidina foi evidenciada com o tratamento de pacientes refratários aos antimoniais na Índia. Seu tratamento mostrou-se eficaz inicialmente, mas houve um decréscimo de cerca de 40% na taxa de cura após cerca de 10 anos de uso (Jha, Singh et al. 1991). A pentamidina tem a capacidade de inibir os complexos I, II e III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial de *Leishmania*, geração de espécies reativas de oxigênio e aumento dos níveis de cálcio citosólico (Mehta e Shaha 2004).

Considerando que os fármacos para o tratamento da LT são restritos em relação a grupos com condições pré-existentes (gestantes, lactantes, imunodeprimidos, crianças e com patologias clínicas específicas), além das diversas limitações como administração por via parenteral, toxicidade e custo, faz-se necessário avaliar a eficácia de outros fármacos contra os agentes causadores das leishmanioses no Brasil. Dois novos fármacos já vêm sendo utilizadas na Ásia, principalmente na Índia, para o tratamento de casos de LV: a miltefosina e a paromomicina (PAR) (Croft e Olliaro 2011) (Figura 2). Estes dois fármacos têm apresentado resultados bastante satisfatórios no tratamento de pacientes com LV na

Índia, Nepal e Bangladesh, com taxas de cura de cerca de 90% (Sundar, Jha et al. 2006, Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015).

A miltefosina é um análogo de fosfatidilcolina desenvolvida inicialmente como composto antitumoral (Jha, Sundar et al. 1999, Sundar, Jha et al. 2006). Este fármaco de administração oral interfere na biossíntese e no metabolismo de fosfolípidios (Lux, Heise et al. 2000, Rakotomanga, Saint-Pierre-Chazalet et al. 2005). Devido a elevada incidência de casos de resistência aos antimoniais na Índia, a miltefosina é considerada o medicamento de escolha no tratamento da LV. No Brasil, apenas dois estudos clínicos utilizando a miltefosina foram realizados. Estes estudos demonstraram uma eficácia de cerca de 70% para infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* em pacientes com leishmaniose cutânea, ambos com eficácia superior quando comparados com o tratamento utilizando o antimonial pentavalente (Machado, Ampuero et al. 2010, Chrusciak-Talhari, Dietze et al. 2011). A toxicidade da miltefosina não é comum, porém está associada com teratogenicidade e efeitos colaterais gastrointestinais (Sundar e Chatterjee 2006). Dentre as limitações deste fármaco, têm-se o alto custo e a elevada meia-vida no plasma sanguíneo (Jha, Sundar et al. 1999, Sundar e Murray 2005, Soto e Berman 2006). O esquema terapêutico dos principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses está representado na Tabela 2.

Na Índia, a terapia combinada tem sido a alternativa de escolha em áreas onde há casos de resistência clínica e de indivíduos coinfectados com HIV (Sundar e Chakravarty 2013), no qual faz-se uso de uma única dose lipossomal de anfotericina B e miltefosina ou uma única dose de anfotericina B lipossomal e PAR (Sundar, Sinha et al. 2011, Sundar, Sinha et al. 2011). Esse tipo de tratamento demonstrou resultados satisfatórios com resolução a curto prazo e alta eficácia clínica (Alvar, Yactayo et al. 2006, van Griensven, Balasegaram et al. 2010).

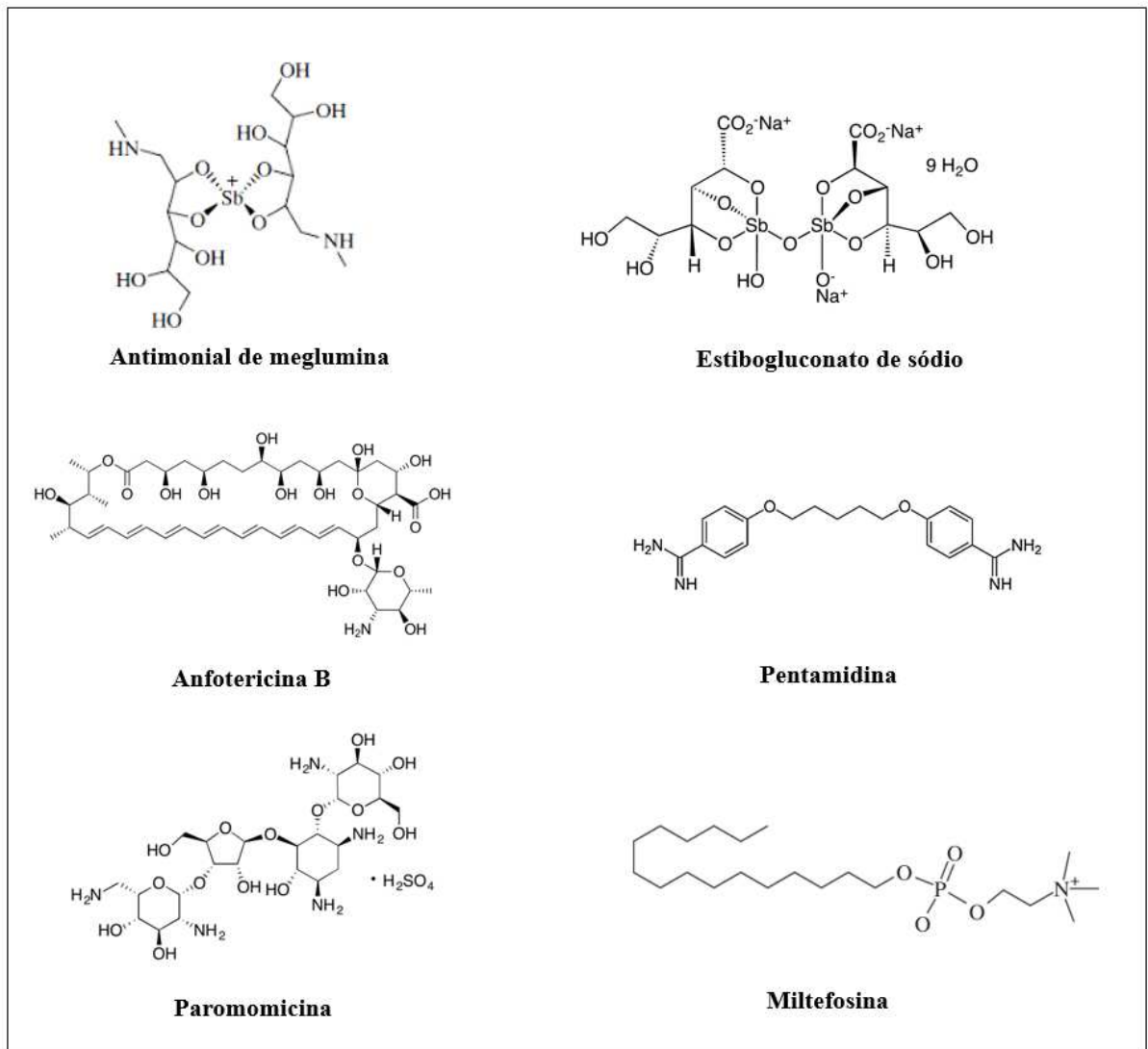


Figura 2. Principais fármacos utilizados no tratamento da LT e LV no mundo.

Tabela 2. Características principais dos fármacos utilizados no tratamento da LT e LV no mundo.

Fármaco	Dosagem	Via de administração	Eficácia	Toxicidade	Forma clínica	Resistência	Desvantagens
Antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina)	10-20 mg/kg/dia por 30 dias	Intravenoso ou intramuscular	Varia de 35 a 95%	Cardiotoxicidade grave, nefrotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade	Cutânea e visceral	Comum	Casos clínicos de resistência na Índia, tratamento de longa duração e administração dolorosa
Anfotericina B	1 mg/kg/dia por 30 dias	Intravenoso	>90%	Nefrotoxicidade grave, tromboflebite e hipocalcemia	Cutânea e visceral	Resistência induzida em laboratório	Instabilidade ao calor e hospitalização por infusão intravenosa lenta
Anfotericina B lipossomal	3-5 mg/kg/dia por 20 dias	Intravenoso	>96%	Nefrotoxicidade leve, calafrios e febre durante a infusão	Cutânea e visceral	Não reportada	Instabilidade de calor e alto custo
Pentamidina	3 mg/kg/dia por 4 dias	Intramuscular	Varia de 36 a 96%	Hiperglicemia grave, hipotensão e taquicardia, miocardite	Cutânea e visceral	Resistência induzida em laboratório	A eficácia varia com base na localização geográfica
Paromomicina	11-20 mg/kg/dia por 21 dias	Intramuscular	>94% na Ásia e varia de 46–85% na África	Ototoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade	Visceral	Resistência induzida em laboratório	A eficácia varia entre as diferentes cepas do parasito. Potencial para resistência clínica
Miltefosina	2-2,5 mg/kg/dia por 28 dias	Oral	>94%	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade	Visceral	Resistência induzida em laboratório. Alguns relatos de resistência clínica.	Longa meia-vida o que levar a casos de resistência. Não pode ser administrada em mulheres grávidas

Fonte: Zulfiqar et al., 2017 (modificado).

1.4.1 Paromomicina

A PAR é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, isolado na década de 1950 de *Streptomyces krestomuceticus*, que já foi demonstrado como um agente oral efetivo para um grande número de agentes infecciosos, desde bactérias a protozoários intestinais (Davidson, den Boer et al. 2009). A PAR apresenta baixa absorção na circulação sistêmica após administração oral, sendo a via parenteral a forma de escolha para a administração do fármaco na LV (Murray, Berman et al. 2005). Estudos clínicos recentes têm demonstrado alta eficácia da PAR no tratamento da LV, com taxas de cura maiores que 90% quando administrada por via intramuscular na Índia e Bangladesh (Jha, Olliaro et al. 1998, Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015). Estudos de fase II para a LV na Índia estabeleceram uma dose eficaz de 16 mg/kg/dia de PAR por 21 dias administrado por via intramuscular (Jha, Olliaro et al. 1998). Em seguida, nos estudos de fase III foi observado uma taxa de cura de 95% para pacientes que receberam doses de 15 mg/kg/dia de sulfato de PAR por 21 dias. Esses resultados fizeram com que o fármaco fosse aprovado para o tratamento da LV na Índia (Sundar e Rai 2005). No caso da leishmaniose cutânea, a PAR pode ser também administrada na forma tópica (el-On, Weinrauch et al. 1985). Casos de resistência clínica não foram descritos até o momento, o que demonstra o seu potencial de utilização no tratamento da doença (Croft, Sundar et al. 2006).

Até o presente momento, não existem relatos de estudos clínicos utilizando a PAR no tratamento de pacientes com LT, causada no Brasil principalmente por *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Dentre as potenciais vantagens da PAR estão o seu baixo custo, boa tolerabilidade, a curta duração do tratamento o que minimiza as chances da geração de parasitos resistentes, além da sua boa eficácia clínica na LV (Sundar e Chakravarty 2008), o que a capacita como um potencial fármaco para utilização no tratamento da LT. A PAR é absorvida rapidamente por via intramuscular e o seu pico da concentração plasmática ocorre após 30 a 90 minutos da administração. A sua meia-vida varia entre 2 a 3 horas em pacientes com funções renais saudáveis (Sundar e Chakravarty 2008). Os efeitos colaterais mais importantes associados com a administração por via parenteral são ototoxicidade, nefrotoxicidade e a elevação dos níveis de aspartato aminotransferase (Sundar, Jha et al. 2007). Porém, a frequência

de efeitos colaterais tem sido baixa com as doses administradas para o tratamento de pacientes com LV (Davidson, den Boer et al. 2009, Sinha, Jha et al. 2011).

Quanto ao mecanismo de ação da PAR, sabe-se que esta inibe a síntese proteica (Fernandez, Malchiodi et al. 2011). Estudos prévios indicavam que a PAR inibia a tradução mitocondrial do parasito (Maarouf, de Kouchkovsky et al. 1997). No entanto, foi demonstrado recentemente que o ribossomo citoplasmático é o principal alvo da PAR, inibindo a síntese proteica e consequentemente afetando o crescimento do parasito (Shalev, Rozenberg et al. 2015, Shalev-Benami, Zhang et al. 2017). Além disso, sabe-se que parasitos resistentes selecionados *in vitro* apresentam redução significativa no acúmulo do fármaco (Jhingran, Chawla et al. 2009).

Estudos sobre a suscetibilidade *in vitro* da PAR têm demonstrado que isolados clínicos de *L. (L.) donovani* apresentam suscetibilidade variável (Kulshrestha, Singh et al. 2011, Prajapati, Mehrotra et al. 2012). Embora a suscetibilidade das principais espécies endêmicas no Brasil tenha sido determinada em cepas referência do parasito (de Moraes-Teixeira, Gallupo et al. 2014), não há relatos na literatura sobre a suscetibilidade de isolados brasileiros. Espera-se que seja encontrado variabilidade na suscetibilidade em isolados clínicos brasileiros do parasito, considerando a diversidade genética já encontrada, principalmente em isolados de *L. (V.) braziliensis* (Cupolillo, Brahim et al. 2003). Estudos *in vivo* com PAR em animais infectados com *Leishmania* spp. limitaram-se em avaliar a eficácia por via tópica ou parenteral, ou ainda associada a nanopartículas. Foi observado eficácia variável em determinadas espécies como *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major* (el-On, Cawich et al. 1993, Carneiro, Santos et al. 2010, Heidari-Kharaji, Taheri et al. 2016, Wijnant, Van Bocxlaer et al. 2017). Considerando a alta eficácia da PAR reportada no tratamento da LV na Índia, é extremamente relevante avaliar a suscetibilidade de isolados brasileiros à PAR *in vitro*, assim como sua eficácia *in vivo* contra espécies causadoras da doença no Brasil. Os dados obtidos neste estudo podem contribuir para o estabelecimento de uma política sobre a utilização da PAR na quimioterapia da LT no Brasil.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a alta eficácia clínica da PAR no tratamento da LV no sudeste asiático, pouco se conhece sobre a eficácia desse fármaco no tratamento da LT, a forma responsável pelo maior número de casos de leishmaniose no Brasil. Foi proposto neste estudo avaliar a atividade da PAR *in vitro* contra isolados clínicos de pacientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, além da sua atividade *in vivo* contra *L. (L.) amazonensis* utilizando como modelo de infecção camundongos BALB/c. Cepas referência das principais espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil e responsáveis pela LT também foram testadas quanto a atividade da PAR *in vitro*. Os isolados clínicos foram previamente tipados, a fim de determinar a espécie do parasito do isolado. A identificação da espécie do isolado é extremamente relevante para estudos de epidemiologia da doença, além de contribuir para as estratégias de controle e tratamento da doença. Sabe-se, por exemplo que as diferentes espécies e isolados clínicos podem responder diferencialmente aos fármacos utilizados na quimioterapia da doença. Considerando que há poucos relatos na literatura sobre a suscetibilidade *in vitro* à PAR de isolados e espécies responsáveis pelas leishmanioses, assim como de sua eficácia *in vivo*, é essencial avaliar sua atividade em espécies circulantes no Brasil, onde o número de fármacos disponíveis para o tratamento é limitado. Os dados obtidos neste estudo podem ser úteis para avaliar o potencial e as limitações de utilização da PAR como alternativa para o tratamento da LT no Brasil.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi avaliar a atividade da PAR *in vitro* e *in vivo* em isolados clínicos e cepas referência das principais espécies causadoras da LT no Brasil. Os objetivos específicos são:

- Identificar as espécies de *Leishmania* dos isolados clínicos que foram utilizados nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* por métodos moleculares;
- Determinar as concentrações inibitórias da PAR *in vitro* para as formas promastigotas e amastigotas intracelulares das cepas referência das principais espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil, assim como dos isolados clínicos de pacientes do Instituto de Infectologia ER;
- Avaliar a eficácia da PAR *in vivo*, utilizando o modelo de camundongo BALB/c de LT causado por *L. (L.) amazonensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitos, células de mamíferos e animais

As espécies utilizadas como referência neste estudo foram *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/79/M5533), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) e *L. (V.) lindenbergi* (MHOM/BR/96/M15732), representantes das espécies endêmicas no Brasil e causadoras da LT. Os ensaios de suscetibilidade foram avaliados nas espécies referência e em isolados clínicos de pacientes com leishmaniose provenientes do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, através de colaboração com o Prof. Jose A. L. Lindoso. Havia disponível no laboratório 16 isolados de pacientes (Tabela 3). As formas promastigotas de *Leishmania* foram cultivadas em meio M199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) complementado com HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005%, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e estéril, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Kapler, Coburn et al. 1990). Para o cultivo de promastigotas do subgênero *Viannia* o meio de cultura M199 foi complementado com 2% de urina humana masculina estéril (Howard, Pharoah et al. 1991). As culturas foram mantidas em estufa a 25°C e os repiques realizados semanalmente. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos foram obtidos conforme protocolo descrito (Zamboni e Rabinovitch 2003) e foram cultivados em meio RPMI-1640 complementado com piruvato de sódio 0,1 M, 10% de soro fetal bovino inativado e estéril e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. Os camundongos BALB/c foram obtidos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório), UNICAMP. Todos os procedimentos realizados com animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (Anexo 1).

Tabela 3. Lista dos isolados clínicos de pacientes com leishmaniose tegumentar do Instituto de Infectologia ER.

	Código do isolado	Identificação do paciente (iniciais)	Forma clínica	Local de provável infecção
1	ER 004	PJTG	Cutânea	PA
2	ER 010	NPC	Mucosa	BA
3	ER 044	AG	Mucosa	PR/MG
4	ER 054	KJM	Cutânea	SP
5	ER 098	PJTG	Cutânea	PA
6	ER 108	GFC	Cutânea	-
7	ER 114	NJS	Cutânea	MG
8	ER 117	OFS	Mucosa	BA
9	ER 118	JMS	Cutânea	MT
10	ER 135	HPS	Cutânea	BA
11	ER 192	RSB	Mucosa	-
12	ER 215	GBC	Cutânea	-
13	ER 256	MMA	Cutânea	-
14	ER 267	LVSS	Cutânea	-
15	ER 269	KPLR	-	-
16	UB 017	-	Cutânea	SP

(-) Dado não fornecido ou não disponível.

4.2 Identificação molecular dos isolados clínicos de *Leishmania* spp.

4.2.1 Extração de DNA genômico de *Leishmania*

Promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram utilizadas para a extração do DNA genômico. Foram utilizados cerca de 10 mL de cultura, contendo pelo menos 1×10^8 promastigotas. Neste protocolo, a cultura do parasito foi centrifugada por 10 minutos a 850 *g*. A seguir, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com solução de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM; KH_2PO_4 1,4 mM; pH 7,2) (cerca 5 mL), sendo novamente centrifugadas por 10 minutos a 850 *g*. Foi adicionado então 1 mL de DNAzol (Thermo Fisher Scientific) para lisar as células e depois foi acrescentado 1 mL de etanol 99%, homogeneizando por inversão de 3 a 5 vezes. Em seguida, o DNA genômico foi recuperado utilizando uma alça de fio de plástico. O DNA genômico foi lavado 2 vezes com etanol 70%, mergulhando a alça de fio de plástico que contém o DNA genômico em um tubo cônico. A seguir, o DNA foi seco a temperatura ambiente por cerca de 10 minutos, sendo então solubilizado em água Milli-Q.

4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene *hsp70* e digestão com a enzima de restrição *Hae* III (PCR-F-RFLP)

A identificação da espécie dos isolados foi feita pela amplificação do gene *hsp70* de *Leishmania* sp., seguido pela digestão com a enzima de restrição *Hae* III, conforme descrito por Montalvo et al. (2012) denominado PCR-F-RFLP. Para cada reação foi utilizado cerca de 100 ng de DNA genômico de cada isolado, 200 nM de cada um dos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂ (25 mM), tampão da enzima 1x (Tampão 10x: Tris-HCl 100mM pH 8,8 a 25°C; KCl 500 mM, 0,8% [v/v] Nonidet P40), 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/μL) e água Milli-Q para completar o volume final da reação. Para a reação de PCR, foi utilizado um ciclo inicial de 3 minutos a 94°C para a desnaturação, seguido de 30 ciclos de amplificação e um ciclo de 10 minutos a 72°C para a extensão final. As etapas de cada ciclo foram: 40 segundos a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para a associação dos iniciadores e 2 minutos a 72°C para a extensão. Os iniciadores utilizados foram: F25 (5'-GGACGCCGGCAGATTCT-3'), e R1310 (5'-CCTGGTTGTTGTTTCAGCCA CTC-3'). A amplificação por PCR gera um produto de 1.286 pb.

Os produtos amplificados contendo o tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e glicerol 30% diluídos em água) foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1x (Tris-borato 40mM pH 8,0; EDTA 1mM). O marcador de peso molecular utilizado foi o *1 Kb DNA Ladder* (Sinapse Biotecnologia). O gel de agarose contendo os DNAs amplificados foi corado com brometo de etídio e os respectivos produtos amplificados foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta. Confirmada a amplificação, os DNAs amplificados por PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Hae*III (New England Biolabs) e analisados por eletroforese em gel de agarose conforme previamente descrito. Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado o DNA genômico das espécies referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), além do DNA genômico das demais espécies endêmicas no Brasil e causadoras de LT: *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426); *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) e *L. (V.) lindenbergi* (MHOM/BR/96/M15732).

4.2.3 Amplificação da região do ITS, clonagem e sequenciamento de DNA de *Leishmania* spp.

4.2.3.1 Amplificação da região do ITS

Foi sequenciada a região do ITS (espaçador interno transcrito) localizado entre os genes que codificam as subunidades maior (LSU) e menor (SSU) do RNA ribossomal (ITS1, 5.8S e ITS2) dos isolados clínicos. Em *Leishmania*, as regiões SSU e LSU são conservadas, mas as respectivas regiões do ITS (espaçadores internos transcritos) do DNA têm alto nível de variação intraespecífica e interespecífica, sendo muito utilizadas no estudo de genética populacional e para identificação de cepas e isolados do parasito (Zauli, Yokoyama-Yasunaka et al. 2012). Esta região genômica de aproximadamente 1 kb foi previamente amplificada por PCR (Cupolillo, Grimaldi Junior et al. 1995), purificada em gel de agarose utilizando o kit *PureLink Quick Gel Purification kit* (Thermo Fisher Scientific) segundo as instruções do fabricante e então clonada no vetor pGEM-T Easy (Promega). Para cada reação de PCR, foram utilizados 100 ng de DNA genômico de cada isolado, 200 nM de cada um dos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂ (25 mM), tampão da enzima 1x (Tampão 10x: Tris-HCl 100mM pH 8,8 a 25°C; KCl 500 mM, 0,8% [v/v] Nonidet P40), 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/μL) e água Milli-Q para completar o volume final da reação. Para a reação de PCR foi utilizado um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação e um ciclo de 10 minutos a 72°C para a extensão final. As etapas de cada ciclo foram: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C para a associação dos iniciadores e 1 minuto e 30 segundos a 72°C para a extensão. Os iniciadores utilizados foram: IR1 (5'- GTCGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT -3') e IR2 (5'- GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG -3').

4.2.3.2 Ligação do DNA amplificado no vetor de clonagem pGEM-T easy

Os produtos de PCR amplificados foram purificados em gel de agarose utilizando o kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific) segundo as instruções do fabricante. Brevemente, adicionou-se no tubo o tampão L3 (tampão de solubilização de gel) e incubou-se a 50°C até dissolver completamente o gel. O gel dissolvido foi aplicado à coluna de purificação que foi centrifugada a 16.000 g por 1

minuto, e o volume residual acumulado no fundo da coluna descartado. A seguir a coluna foi lavada com 500 μL da solução W1 (tampão de lavagem que contém etanol) e centrifugada a 16.000 g por 1 minuto, descartando-se novamente a solução de lavagem. Para eluir o DNA, foi adicionado cerca de 35 μL de água Milli-Q na coluna que foi centrifugada novamente a 16.000 g por 1 minuto. A concentração do DNA purificado foi determinada em um Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). A ligação no vetor pGEM-T easy (Promega) foi feita segundo as instruções do fabricante, utilizando cerca de 25 ng do vetor e uma proporção de pelo menos 3 vezes o número de moléculas do inserto (25 ng de DNA do produto amplificado de cerca de 1 kb). Para a ligação no vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega), foram utilizados cerca de 2,5 μL do tampão *2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase* (60mM de Tris-HCl, pH 7.8; 20mM de MgCl_2 ; 20mM de DTT; 2mM de ATP e 10% de polietilenoglicol), 25 ng do vetor (0,5 μL), 25 ng do produto de DNA amplificado e 0,5 μL da enzima T4 DNA ligase (3 U/ μL) (Promega) para um volume final de 5 μL . Incubou-se a ligação a 4°C durante 16 horas.

4.2.3.3 Transformação bacteriana do produto clonado no vetor pGEM-T

O produto de ligação foi transformado utilizando 100 μL de bactérias competentes de *Escherichia coli* (linhagem DH5 α) preparadas previamente conforme descrito (Sambrook, Fritsch et al. 1989). As mesmas foram incubadas em gelo durante 30 minutos, transferidas para banho maria à 42°C por 1 minuto e 30 segundos e então incubadas novamente no gelo durante 5 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 mL de meio LB (Luria Bertani) (10 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl; pH 7,2). As bactérias recombinantes foram incubadas a 37°C por cerca de 1 hora com agitação constante e depois foram plaqueadas em LB contendo ágar (1,5 g/L) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Previamente ao plaqueamento, foi ainda adicionado 100 μL de IPTG 100 mM e 20 μL de X-Gal (substrato da enzima β -galactosidase) 50 mg/mL. Uma vez plaqueadas, as bactérias foram incubadas em estufa a 37°C durante 16h.

4.2.3.4 Extração do DNA plasmidial por lise alcalina e digestão com enzimas de restrição

Para o isolamento do DNA plasmidial, as bactérias recombinantes tiveram o DNA do plasmídeo purificado utilizando o kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as especificações do fabricante. As colônias brancas, ou seja, aquelas que foram transformadas com o plasmídeo contendo o inserto esperado, foram coletadas com palitos estéreis e cultivadas em tubos contendo 4 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina à 37°C, sob agitação constante, durante 12 horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 2.880 *g* por dez minutos. Primeiramente, o sedimento bacteriano foi ressuspense em solução de ressuspensão contendo RNase. A seguir, foi adicionado o tampão de lise e incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, foi adicionada a solução de precipitação de DNA cromossomal seguido de centrifugação a 16.000 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado à coluna de purificação de DNA plasmidial que foi centrifugada a 16.000 *g* por 1 minuto. O volume residual acumulado no fundo da coluna foi descartado. A seguir, a coluna foi lavada com 700 µL da solução W9 (tampão de lavagem que contém etanol) e centrifugada a 16.000 *g* por 1 minuto, descartando-se novamente a solução de lavagem. Para a eluição do DNA, foi adicionado cerca de 50µL de água Milli-Q na coluna que foi centrifugada novamente a 16.000 *g* por 1 minuto. O DNA foi quantificado e armazenado a 4°C. O DNA plasmidial foi então digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, cujos sítios de restrição no vetor pGEM-T easy possibilitam a liberação do inserto. O resultado da digestão foi analisado em gel de agarose 0,8% acrescido de 0,75 µg/mL de brometo de etídio em tampão TBE 1x (Tris-borato 89 mM, EDTA dissódico 2mM). Foram selecionados assim, os plasmídeos contendo o inserto esperado para o posterior sequenciamento de nucleotídeos.

4.2.3.5 Sequenciamento de nucleotídeos

A sequência de nucleotídeos dos respectivos insertos foi determinada por sequenciamento automático segundo método descrito por (Sanger, Nicklen et al. 1977), utilizando iniciadores M13 (senso e anti-senso), além de iniciadores internos ao produto amplificado. As respectivas sequencias dos iniciadores utilizados foram: M13F (5'- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC -3'; M13R (5'-

TCACACAGGAAACAGCTATGAC -3'); L5.8SF (5'- TGATACCACTTATCGCACTT -3') e L5.8SR- (5'- AAGTGCGATAAGTGGTA -3'). Todas as reações de sequenciamento foram realizadas pela empresa Myleus Biotecnologia, utilizando o seu serviço de sequenciamento. O aparelho utilizado é o ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Para as reações de sequenciamento foram utilizados os terminadores fluorescentes do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Applied Biosystems) conforme as instruções do fabricante. As sequências consenso da região do ITS de cada isolado foram geradas a partir de pelo menos três sequências senso e três sequências anti-senso independentes. As análises das sequências de DNA foram realizadas utilizando os softwares Lasergene (DNASTAR) e Clone Manager 9.0. As respectivas sequências de nucleotídeos do ITS de cada um dos isolados foram alinhadas utilizando o software ClustalW (Larkin, Blackshields et al. 2007) e editadas manualmente. A porcentagem de identidade entre as sequências foi determinada com o software GeneDoc (Nicholas et al., 1997). A relação filogenética entre os isolados foi inferida no software SplitsTree v4.11.3 utilizando o método Neighbor-net (Huson e Bryant 2006). Foram utilizadas sequências da região do ITS de espécies e cepas de *Leishmania* spp. disponíveis no GenBank para as análises.

4.3 Fármaco

A PAR, em pó, foi obtida da companhia Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Esta foi diluída em água Milli-Q e então filtrada utilizando filtro de 0,22 µM.

4.4 Avaliação da suscetibilidade de promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. à PAR

A atividade da PAR contra formas promastigotas dos isolados clínicos e das cepas referência foi avaliada utilizando o teste do MTT (3-(4,5- dimetiltiliazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O protocolo utilizado foi aquele previamente descrito (Zauli-Nascimento, Miguel et al. 2010). Após contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, cerca de 2×10^6 promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram incubados em concentrações crescentes de PAR (0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µM) em volume de 200 µL de meio M199 em placa de 96 poços por 24 horas a 25°C. Posteriormente foram adicionados 30 µL de solução de

MTT (5 mg/mL), sendo incubado por cerca 3 horas. Após esse período, a reação foi interrompida com 50 μ L de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) para a lise dos parasitos. O resultado foi avaliado por espectrofotometria, medindo a absorbância de 595 nm, utilizando como referência a absorbância de 690 nm. Os experimentos foram realizados em triplicada, utilizando as respectivas cepas referência como controle do experimento. Os valores de EC₅₀ e EC₉₀ (concentração de PAR que inibe a viabilidade celular em 50% e 90% respectivamente) foram determinados a partir de curvas de regressão sigmoide utilizando o programa GraphPad Prism 7. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes para cada isolado ou cepa referência de *Leishmania* spp.

A suscetibilidade de amastigotas intracelulares dos isolados foi avaliada utilizando macrófagos derivados de medula óssea que foram infectados e avaliados quanto a sua viabilidade após coloração com Giemsa e observação em microscópio óptico. Os macrófagos, diferenciados em meio R2020 contendo 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929 (que secretam fator de crescimento e diferenciação de macrófagos), 20% de soro fetal bovino e 50% de meio RPMI, foram cultivados em placas de 24 poços contendo previamente lamínulas redondas de vidro de 13 mm de diâmetro estéreis. Após incubação por 24 horas em estufa à 37°C e 5% CO₂, os macrófagos foram infectados com formas promastigotas das respectivas espécies em fase estacionária de crescimento. As infecções foram realizadas por cerca de 3-4 horas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a temperatura de 34°C. Após esse período, os parasitas não internalizados foram removidos e então foi adicionado meio RPMI contendo concentrações crescentes de PAR (0, 0,1, 1, 5, 10, 30, 50, 75, 100, 150, 300, 500 e 750 μ M). Os macrófagos infectados foram incubados à 34°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 72 horas. As lâminas então foram fixadas, coradas e observadas ao microscópio óptico. A porcentagem de infecção e o número de amastigotas por macrófago foram determinados e os valores de EC₅₀ e EC₉₀ foram calculados no programa GraphPad Prism 7 conforme previamente descrito. Foram realizados três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.5 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos derivados de medula de óssea

Macrófagos derivados de medula óssea foram plaqueados e cultivados em placas de 24 poços contendo RPMI completo durante 24 horas em estufa à 37°C

e 5% CO₂. Após a incubação inicial, os macrófagos foram incubados em meio RPMI 1640 completo com concentrações crescentes de PAR (0, 25, 50, 75, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000 e 3.000 µM) durante 48 ou 72 horas. Posteriormente, o meio RPMI contendo PAR foi removido e, em seguida, foram adicionados 100 µL de tripsina (2,5 g/L) por poço e incubado por 15 minutos. Após este período, 400 µL de PBS foram adicionados e então 10 µL dessa suspensão de células foram diluídos em 10 µL de uma solução de Trypan Blue 0,4% (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Dez microlitros da solução foram adicionados em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada a partir da contagem do número total de células viáveis. As células não viáveis adquirem o corante azul que atravessa a membrana da célula morta. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata e o valor de CC₅₀ (concentração de PAR que inibe a viabilidade celular em 50%) foi determinado a partir de curvas de regressão sigmoide utilizando o programa GraphPad Prism 7.

4.6 Avaliação da eficácia *in vivo* da PAR em modelo experimental de leishmaniose tegumentar

Grupos de cinco camundongos fêmeas BALB/c cada foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita utilizando 1x10⁶ promastigotas de fase estacionária de crescimento da cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) ou do isolado clínico ER256. Após cerca de quatro semanas de infecção, foi iniciado o tratamento com PAR, e os grupos foram separados naqueles tratados por via intraperitoneal e via intramuscular, a fim de avaliar a melhor via de administração para o tratamento. Também foi utilizado um grupo controle de animais não tratados. A evolução da lesão foi feita semanalmente através de um medidor de espessura (Mitutoyo), avaliando a espessura da pata infectada e da pata contralateral sadia. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e foi retirado cerca de 25-50 mg de tecido da pata infectada. O DNA da lesão foi extraído com o kit *PureLink Genomic DNA* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA genômico foi isolado por digestão com Proteinase K e RNase A no tampão de lise durante uma incubação de 10 minutos a 55°C. Em seguida, foi adicionado etanol e as amostras foram aplicadas a uma coluna de purificação. A centrifugação foi realizada para permitir que o DNA se ligue à coluna, seguido de lavagem e eluição com água Milli-Q. O DNA

recuperado da coluna foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific) e armazenado a -20°C até a realização do PCR em tempo real, para quantificação da carga parasitária dos animais infectados.

4.6.1 PCR em tempo real para análise de carga parasitária

A quantificação da carga parasitária foi feita através de PCR em tempo real (qPCR), pela detecção de DNA de *Leishmania* em tecido da pata de camundongos infectados tratados e não tratados, conforme descrito por Nicolas et al. (2002) e Wijnant et al. (2017). Para cada reação, foram utilizados 4 µL do DNA total extraído de tecido da pata infectada, previamente diluído (1:100), e que corresponde a quantidade de DNA de 1 mg de tecido, 10 µL de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad), 1,2 mM de MgCl₂ e 500 nM de cada iniciador. Para a reação de qPCR, foi utilizado um ciclo inicial de 3 minutos a 95°C para desnaturação, seguido de 40 ciclos de amplificação. As etapas de cada ciclo foram: 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Os iniciadores utilizados foram: G6PDH-F (5'- CGYCTYCCAGACGCTACGA - 3') e G6PDH-R (5'- AGCGGYGTGAAGATGCGCCA - 3'), que amplificam um fragmento de 110 pb do gene glicose-6-fosfato desidrogenase (*g6pdh*), um gene de cópia única em *L. (L.) amazonensis* (Castilho et al., 2008). Para a construção da curva padrão, foram incluídas triplicatas contendo DNA genômico equivalente a 2x10⁷ a 2 parasitos, em diluições seriadas de 10 vezes. O DNA genômico dos parasitos foi quantificado a partir das respectivas amostras de tecido dos animais tratados e não tratados e foram quantificados em duplicata. O aparelho utilizado foi StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, MA/EUA) disponível no Laboratório de Genômica e Expressão (LGE), IB-UNICAMP.

4.6.2 Determinação dos níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e creatinina no sangue de animais infectados e tratados com PAR

A análise bioquímica do sangue dos animais foi realizada pelo laboratório de análises clínicas Vetpat (Campinas, SP, Brasil), onde foram determinados os níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina. Para a coleta de sangue, a via escolhida foi a axilar (venossecção). O animal foi manualmente contido e, em seguida, foi administrado 100 mg/kg de

ketalar e 10 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal. A seguir, foi feita uma incisão na axila do animal, na parte lateral do tórax, e o sangue foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur (Neves et al., 2013) antes do animal ser eutanasiado.

O método utilizado para determinação das concentrações de ALT e AST foi o cinético UV. Para a realização dos ensaios, o reagente do kit (Interkit) (tampão Tris 100 mmol/L pH 7,5, L-alanina 500 mmol/L, malato desidrogenase ≥ 600 U/L, lactato desidrogenase ≥ 1.200 U/L, azida sódica 0,1 g/L, NADH 0,18 mmol/L, α -cetoglutarato 15 mmol/L, azida sódica 15,5 mmol/L) foi pré-aquecido durante 2 minutos a 37°C. Em seguida, foi pipetado em um tubo de ensaio 1 mL do reagente e 0,1 mL do soro de cada animal. A mistura foi homogeneizada e transferida para cubeta termostatizada a 37°C. Após 90 segundos, foi medida a absorbância inicial a 340 nm em espectrofotômetro semi-automático Bioplus BIO-2000 e novas leituras foram efetuadas após 1, 2 e 3 minutos. O valor da concentração foi determinado de acordo com os cálculos fornecidos pelo kit.

Para a quantificação de creatinina no sangue dos camundongos, foi utilizado o método cinético colorimétrico que utiliza 0,1 mL de cada amostra diluída em um tubo de ensaio contendo 1 mL do reagente do kit (NaOH 125 mmol/L, tetraborato de sódio 24 mmol/L, ácido pícrico 44 mmol/L). A mistura de cada amostra foi então homogeneizada e transferida para cubeta termostatizada a 37°C. Após 30 e 90 segundos, foram obtidos os valores de absorbância a 510 nm em espectrofotômetro semi-automático Bioplus BIO-2000. A diferença entre as duas leituras é proporcional à concentração de creatinina na amostra. O valor da concentração foi feito de acordo com os cálculos fornecidos pelo kit.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 7, utilizando o teste ANOVA de uma via e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene *hsp70* e digestão com a enzima de restrição *Hae* III (PCR-F-RFLP)

Para a identificação das espécies dos isolados utilizados neste estudo, foi utilizado o protocolo que amplifica um produto de 1.286 pb do gene *hsp70*, seguido da digestão com a enzima de restrição *Hae*III (Montalvo, Fraga et al. 2012). A análise dos perfis moleculares dos isolados clínicos, gerados pela digestão com enzima de restrição *Hae*III do produto de PCR do gene *hsp70*, identificou 8 isolados como sendo *L. (V.) braziliensis*, 5 isolados sendo *L. (L.) amazonensis*, 2 isolados sendo *L. (V.) guyanensis* e 1 isolado sendo *L. (V.) shawi* (Figura 3). Como controle, foi utilizado o DNA genômico de cepas referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) e (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e (MHOM/BR/94/H3227), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/79/M5533) e *L. (V.) lindenbergi* (MHOM/BR/96/M15732) (Figura 3).

Conforme observado na Figura 3B, os isolados de *L. (L.) amazonensis* (amostras 12, 13, 14, 16 e 17) apresentaram uma banda de aproximadamente 580 pb. Conforme previamente descrito por Espada et al. (2018), o gene *hsp70* de *L. (L.) amazonensis* pode ser polimórfico para alguns isolados desta espécie. Neste caso, em um dos alelos não há o sítio de restrição para a enzima *Hae*III (GG/CC) entre os fragmentos de 338 e 246 pb, resultando em um fragmento de 584 pb. Foi observado também um perfil de restrição distinto para o isolado ER114 (Figura 3D, amostra 21) em comparação com as demais espécies referência do parasito (Figura 3). Através do sequenciamento do gene *hsp70* e da região do ITS, foi possível identificar a espécie deste isolado como *L. (V.) braziliensis*. Foi observado uma identidade de 99% e 98% com as sequências de *hsp70* e ITS de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) respectivamente (dado não mostrado; Tabela 4). Através da análise da sequência de nucleotídeos do gene *hsp70*, a existência da banda de cerca de 600 pb se dá pela ausência de um sítio de restrição da enzima *Hae*III entre os fragmentos de 338 e 286 que resulta em um fragmento de 624 pb (Figura 3D, amostra 21).

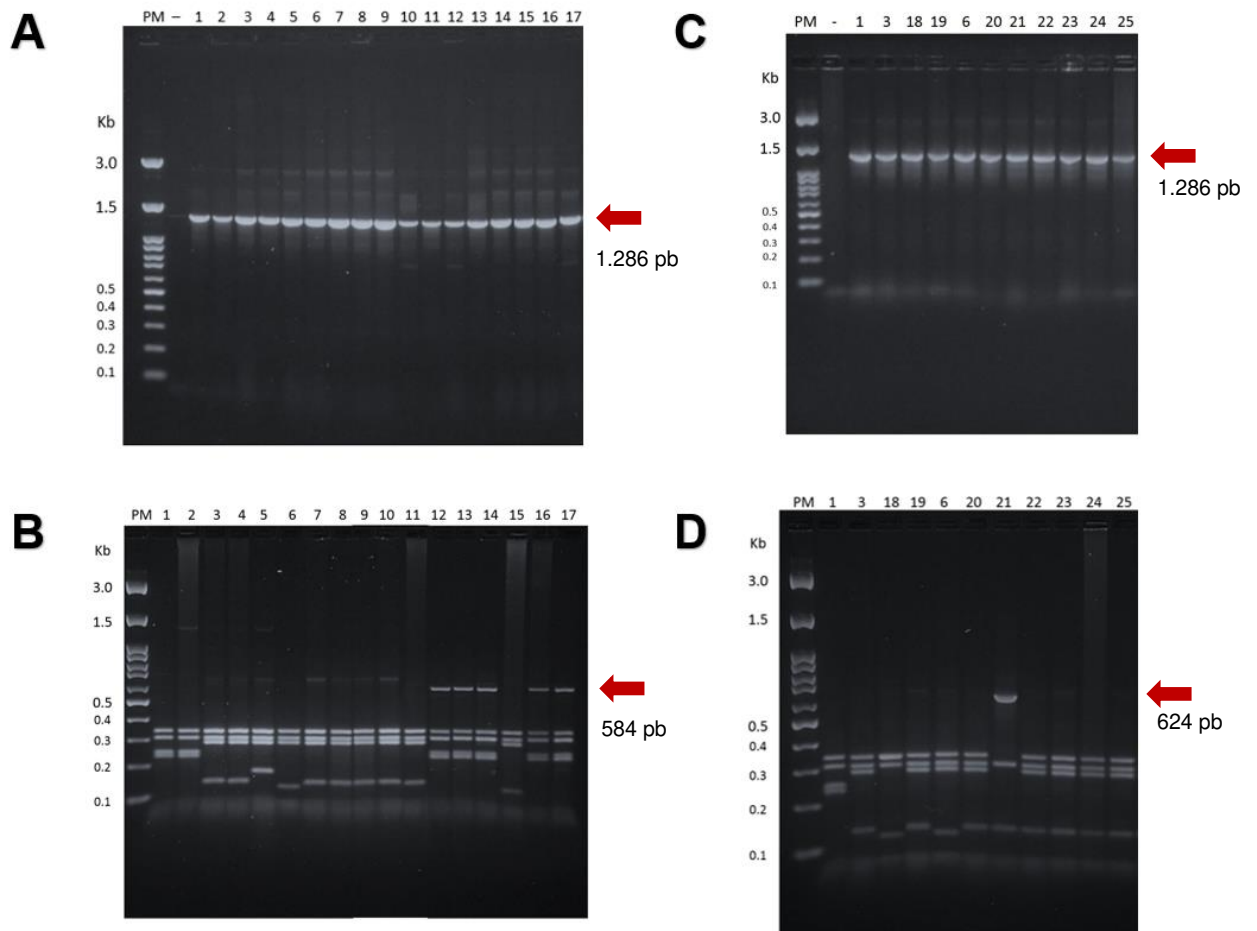


Figura 3. Tipagem molecular dos isolados clínicos utilizando o produto amplificado do gene *hsp70* seguido de digestão com a enzima de restrição *HaeIII*. (A e C) Produto amplificado do gene *hsp70* (1.286 pb) dos isolados clínicos do Instituto de Infectologia ER e das cepas referência de *Leishmania* spp. (B e D) Digestão com enzima de restrição *HaeIII* dos respectivos produtos amplificados. Legenda: PM – Marcador de Peso Molecular; 1- *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269); 2- *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); 3- *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227); 4- *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); 5- *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 6- *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408); 7- *L. (V.) lindenbergi* (MHOM/BR/96/M15732); 8- ER108; 9- ER004; 10- ER010; 11- ER044; 12- ER054; 13- ER117; 14- ER118; 15- ER192; 16- ER256; 17- UB017; 18- *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426); 19- *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/79/M5533); 20- ER098; 21- ER114; 22- ER135; 23- ER215; 24- ER267; 25- ER269.

5.2 Sequenciamento da região do ITS em isolados clínicos de *Leishmania* spp.

Para confirmação dos resultados obtidos pelo perfil de digestão com a enzima *HaeIII* do produto amplificado do gene *hsp70*, as espécies dos isolados foram ainda identificadas através do sequenciamento da região do ITS (espaçador interno transcrito) de aproximadamente 1 kb e posterior alinhamento com as sequências das respectivas espécies de *Leishmania* disponíveis em bancos de dados como o GenBank. Foi observada uma identidade de pelo menos 98% entre as sequências dos isolados clínicos e das respectivas sequências das espécies referência correspondentes (Tabela 4). No entanto, os isolados ER044 e ER108 apresentaram identidade de 98% e 99%, respectivamente, com as cepas referência de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* (Tabela 4). Para identificar a espécie correspondente a estes isolados, foi inferida a relação filogenética entre os isolados e as duas cepas referência destas espécies no software SplitsTree v4.11.3 utilizando o método Neighbor-net. O resultado obtido agrupou os isolados ER044 e ER108 mais próximo com a cepa referência de *L. (V.) guyanensis* do que com a cepa referência de *L. (V.) shawi* (Figura 4 e Figura 5). Deste modo, concluiu-se que a espécie destes dois isolados é *L. (V.) guyanensis* (Tabela 5). Da maneira similar, as análises filogenéticas demonstraram que a sequência do isolado ER114 agrupou-se mais proximamente da sequência de ITS (Figura 6) da cepa referência de *L. (V.) braziliensis* do que da cepa referência de *L. (V.) shawi* que também apresenta identidade de 98%, indicando que a espécie deste isolado é *L. (V.) braziliensis* (Tabela 5). Na Tabela 5, temos um resumo das espécies identificadas dos respectivos isolados utilizados neste estudo.

Tabela 4. Identidade das sequências consenso da região do ITS de cada isolado clínico com as sequências das principais cepas referência [*L. (V.) braziliensis* M2903, *L. (L.) amazonensis* M2269, *L. (V.) guyanensis* M4147, *L. (V.) shawi* M8408 e *L. (V.) naiffi* M5533].

Isolados	<i>L. braziliensis</i> M2903	<i>L. amazonensis</i> M2269	<i>L. guyanensis</i> M4147	<i>L. shawi</i> M8408	<i>L. naiffi</i> M5533
ER004	98%	68%	95%	97%	95%
ER010	98%	68%	96%	97%	94%
ER044	96%	66%	98%	98%	95%
ER054	68%	99%	66%	67%	67%
ER098	98%	68%	96%	97%	95%
ER108	97%	68%	99%	99%	95%
ER114	98%	68%	96%	98%	96%
ER117	68%	99%	67%	68%	67%
ER118	68%	99%	66%	67%	66%
ER135	98%	63%	96%	97%	94%
ER192	97%	67%	98%	99%	95%
ER215	98%	68%	96%	97%	94%
ER256	68%	99%	66%	67%	67%
ER267	98%	68%	96%	97%	94%
ER269	98%	68%	96%	97%	95%
UB017	68%	99%	66%	67%	67%

As sequências dos isolados que apresentaram maior identidade com as respectivas sequências das cepas referência estão destacadas em negrito na Tabela.

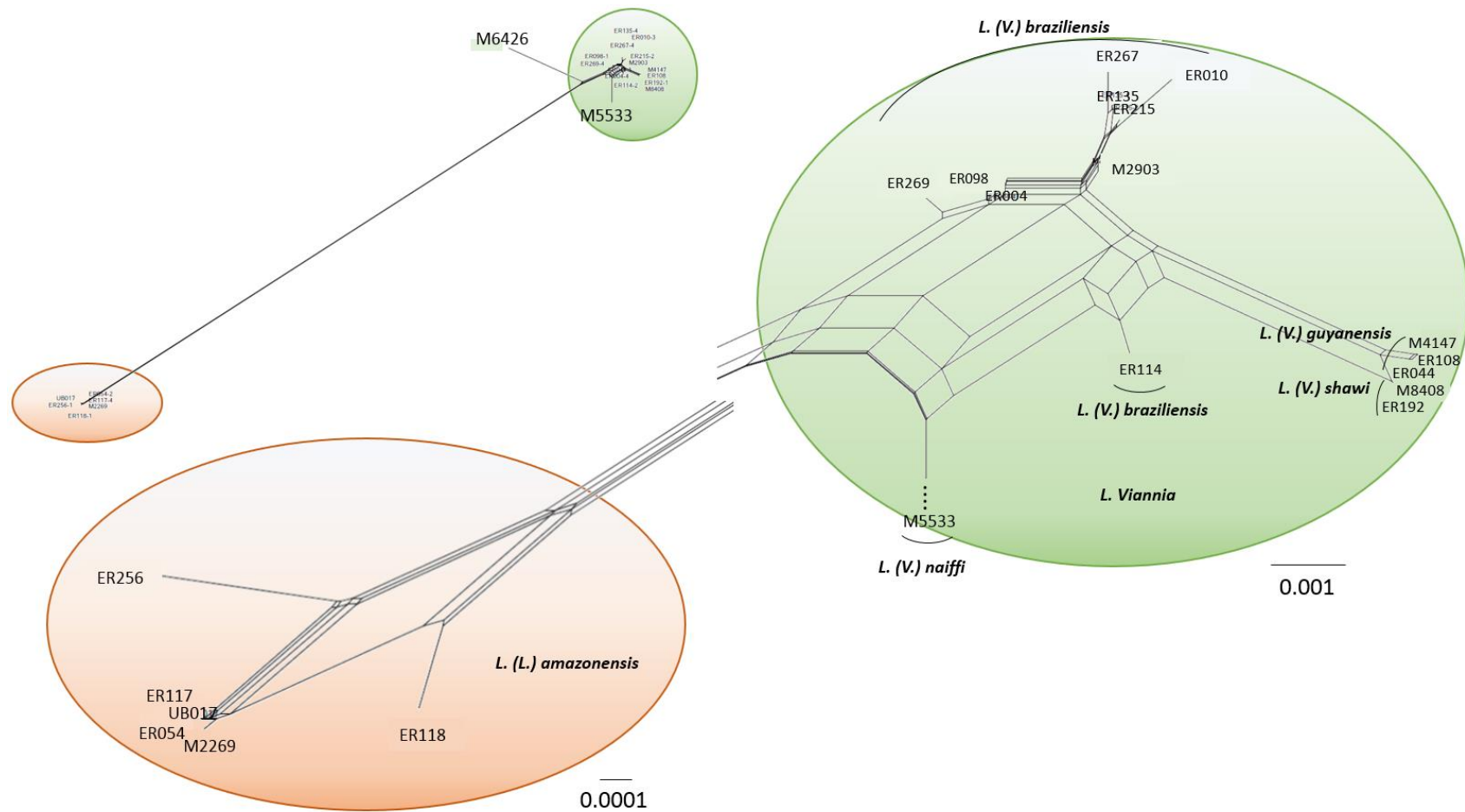


Figura 4. Neighbor-net utilizando o software SplitsTree v4.11.3 mostrando a relação entre as sequências de ITS dos isolados clínicos e das espécies de *Leishmania* indicadas [*L. (V.) braziliensis* M2903, *L. (L.) amazonensis* M2269, *L. (V.) guyanensis* M4147, *L. (V.) shawi* M8408, *L. (V.) naiffi* M5533 e *L. (V.) lainsoni* M6426].

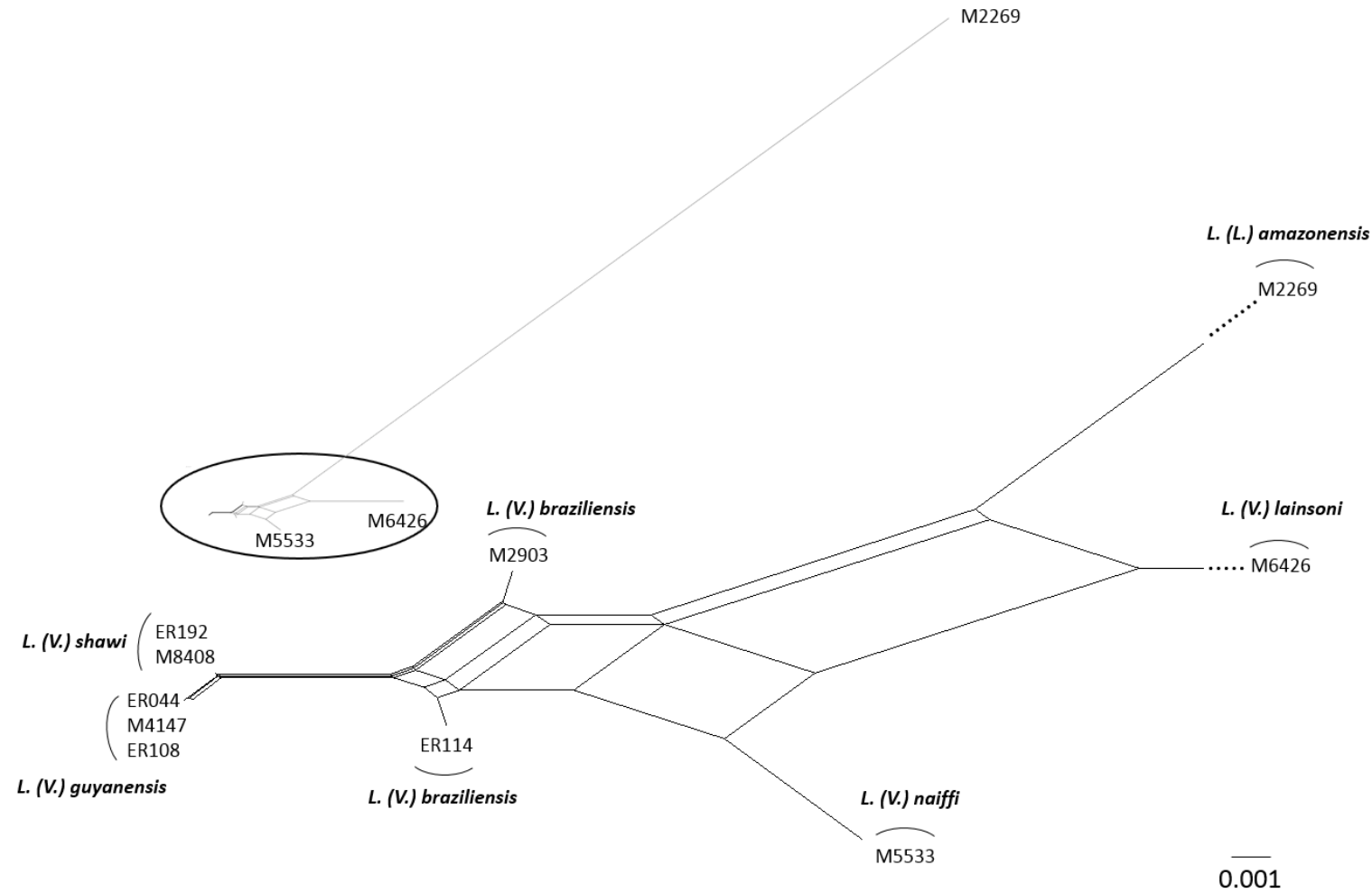


Figura 5. Neighbor-net utilizando o software SplitsTree v4.11.3 mostrando a relação entre as sequências de ITS dos isolados clínicos ER044 e ER108 e das espécies de *Leishmania* indicadas [*L. (V.) braziliensis* M2903, *L. (L.) amazonensis* M2269, *L. (V.) guyanensis* M4147, *L. (V.) shawi* M8408, *L. (V.) naiffi* M5533 e *L. (V.) lainsoni* M6426].

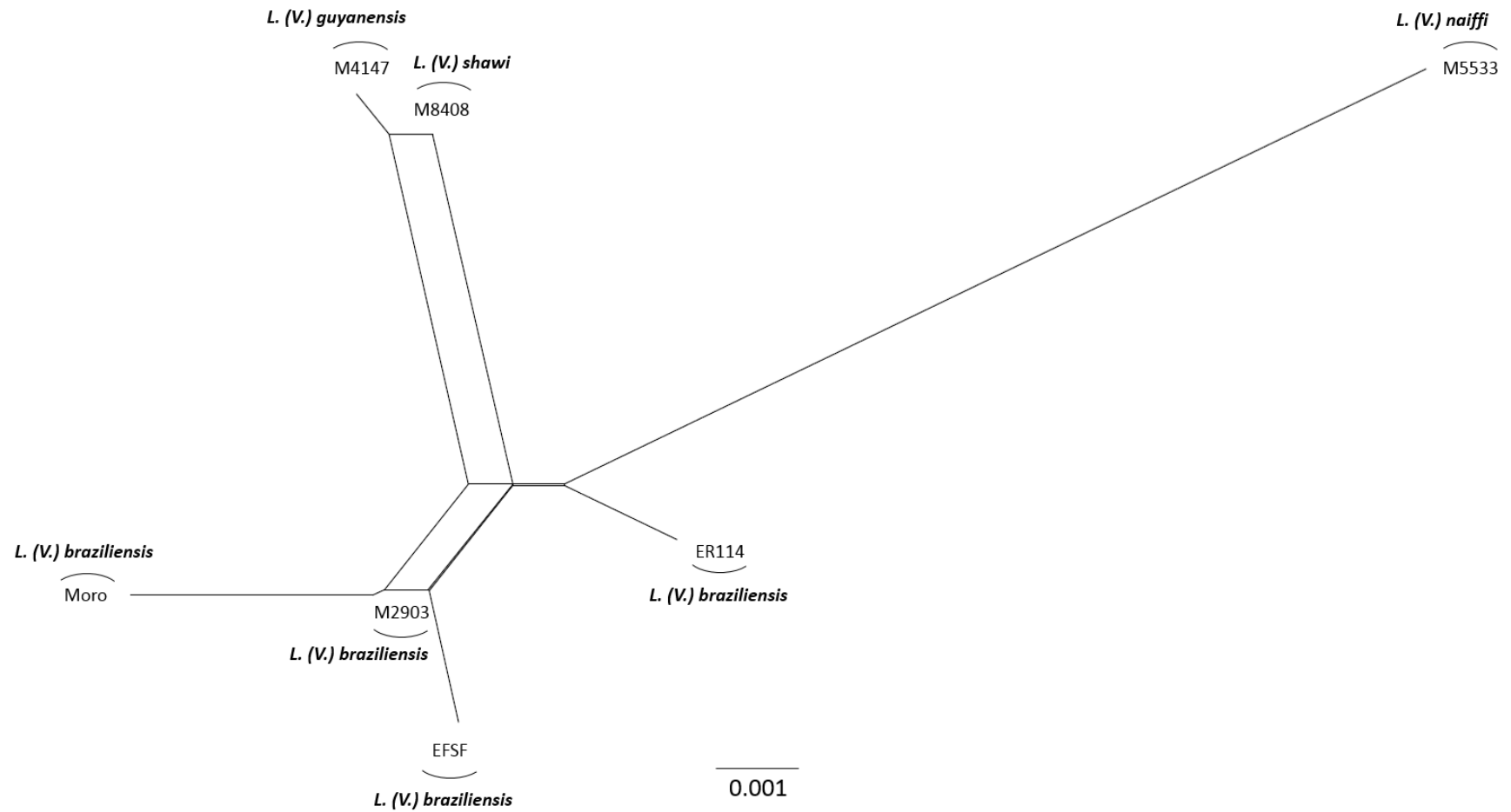


Figura 6. Neighbor-net utilizando o software SplitsTree v4.11.3 mostrando a relação entre as sequências de ITS do isolado clínico ER114 e das espécies de *Leishmania* indicadas [*L. (V.) braziliensis* M2903, *L. (V.) braziliensis* EFSF, *L. (V.) braziliensis* Moro, *L. (V.) guyanensis* M4147, *L. (V.) shawi* M8408 e *L. (V.) naiffi* M5533].

Tabela 5. Lista dos isolados clínicos de pacientes com leishmaniose do Instituto de Infectologia ER e a identificação das respectivas espécies dos isolados através dos métodos moleculares previamente descritos.

	Código do isolado	Identificação do paciente (iniciais)	Forma clínica	Espécie do isolado
1	ER 004	PJTG	Cutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i>
2	ER 010	NPC	Mucosa	<i>L. (V.) braziliensis</i>
3	ER 044	AG	Mucosa	<i>L. (V.) guyanensis</i>
4	ER 054	KJM	Cutânea	<i>L. (L.) amazonensis</i>
5	ER 098	PJTG	Cutânea	<i>L. (L.) braziliensis</i>
6	ER 108	GFC	Cutânea	<i>L. (V.) guyanensis</i>
7	ER 117	OFS	Mucosa	<i>L. (L.) amazonensis</i>
8	ER 118	JMS	Cutânea	<i>L. (L.) amazonensis</i>
9	ER 114	NJS	Cutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i>
10	ER 135	HPS	Cutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i>
11	ER 192	RSB	Mucosa	<i>L. (V.) shawi</i>
12	ER 215	GBC	Cutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i>
13	ER 256	MMA	Cutânea	<i>L. (L.) amazonensis</i>
14	ER 267	LVSS	Cutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i>
15	ER 269	KPLR	-	<i>L. (V.) braziliensis</i>
16	UB 017	-	Cutânea	<i>L. (L.) amazonensis</i>

5.3 Avaliação da suscetibilidade de promastigotas de *Leishmania* spp. à PAR

A suscetibilidade *in vitro* dos isolados clínicos e das cepas referência à PAR em promastigotas foi determinada utilizando o teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), sempre utilizando as cepas de referência como controle do experimento. Após os experimentos, foram realizadas curvas de inibição de crescimento celular para determinar a concentração de PAR que inibe a viabilidade celular em 50% e 90% (EC₅₀ e EC₉₀). Foi observado variação nos valores de EC₅₀, cujos valores variaram de 4,95 a 147,8 µM entre os isolados clínicos (Tabela 6). Os três isolados clínicos que apresentaram os maiores valores de EC₅₀ foram: ER114 [*L. (V.) braziliensis*], ER117 [*L. (L.) amazonensis*] e ER192 [*L. (V.) shawi*]. Já as cepas referência *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) e *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) apresentaram valores de EC₅₀ que variaram entre 27,79 e 205,03 µM (Tabela 6; Figura 7). Na Figura 8, temos um comparativo dos valores de EC₅₀ dos isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis* e suas respectivas cepas referência,

bem como dos isolados e das cepas referência de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*.

Tabela 6. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota das respectivas cepas referência e dos isolados clínicos de *Leishmania* spp.

Cepa/Código do isolado	Espécie do isolado	EC ₅₀ ± DP (µM)	EC ₉₀ (µM)	(n) ¹
M2269	<i>L. (L.) amazonensis</i>	145,23 ± 23,04	730,4	3
PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i>	95,63 ± 15,45	556,7	3
ER054	<i>L. (L.) amazonensis</i>	37,19 ± 6,48	134	3
ER117	<i>L. (L.) amazonensis</i>	54,36 ± 7,32	370,6	3
ER118	<i>L. (L.) amazonensis</i>	29,3 ± 8,05	231,93	3
ER256	<i>L. (L.) amazonensis</i>	9,98 ± 2,97	101,8	5
UB017	<i>L. (L.) amazonensis</i>	17,46 ± 4,17	78,29	6
M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	27,79 ± 3,23	149,8	3
H3227	<i>L. (V.) braziliensis</i>	28,58 ± 2,55	101,6	3
ER004	<i>L. (V.) braziliensis</i>	40,1 ± 4,78	372	5
ER010	<i>L. (V.) braziliensis</i>	4,95 ± 2,81	55,8	4
ER098	<i>L. (V.) braziliensis</i>	30,12 ± 3,12	69,21	3
ER114	<i>L. (V.) braziliensis</i>	147,8 ± 19,2	813,1	3
ER135	<i>L. (V.) braziliensis</i>	96,75 ± 8,98	558	3
ER215	<i>L. (V.) braziliensis</i>	112,56 ± 6,04	1013,04	3
ER267	<i>L. (V.) braziliensis</i>	53,05 ± 4,86	107,3	3
ER269	<i>L. (V.) braziliensis</i>	49,1 ± 2,6	95,33	3
M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>	101,5 ± 6,68	280	6
ER044	<i>L. (V.) guyanensis</i>	13,53 ± 6,1	223,5	5
ER108	<i>L. (V.) guyanensis</i>	36,26 ± 1,9	250,1	3
M5533	<i>L. (V.) naiffi</i>	205,03 ± 7,07	634,9	3
M8408	<i>L. (V.) shawi</i>	162,9 ± 14,27	1466	3
ER192	<i>L. (V.) shawi</i>	45,73 ± 4,8	411,57	4

Média de pelo menos três experimentos realizados em triplicata. As cepas referência utilizadas nos ensaios de suscetibilidade estão destacadas em cinza na Tabela.

¹n: número de experimentos independentes realizados por cepa ou isolado.

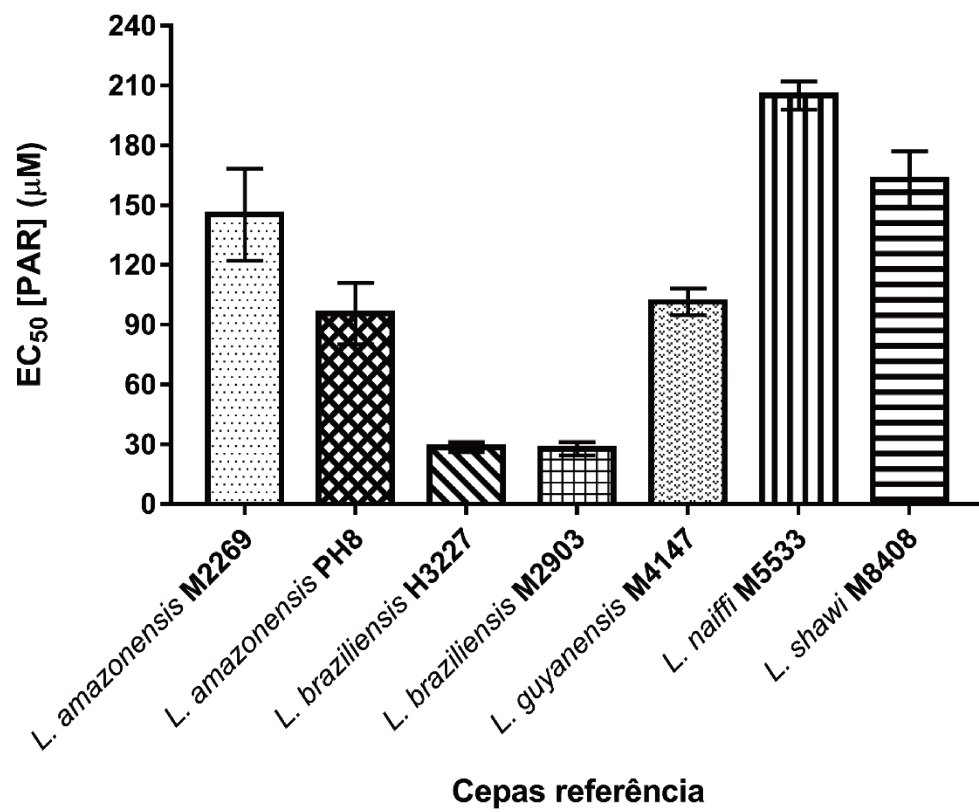


Figura 7. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota. Está representado a média e desvio padrão dos valores de EC_{50} das cepas referência de *Leishmania* spp.

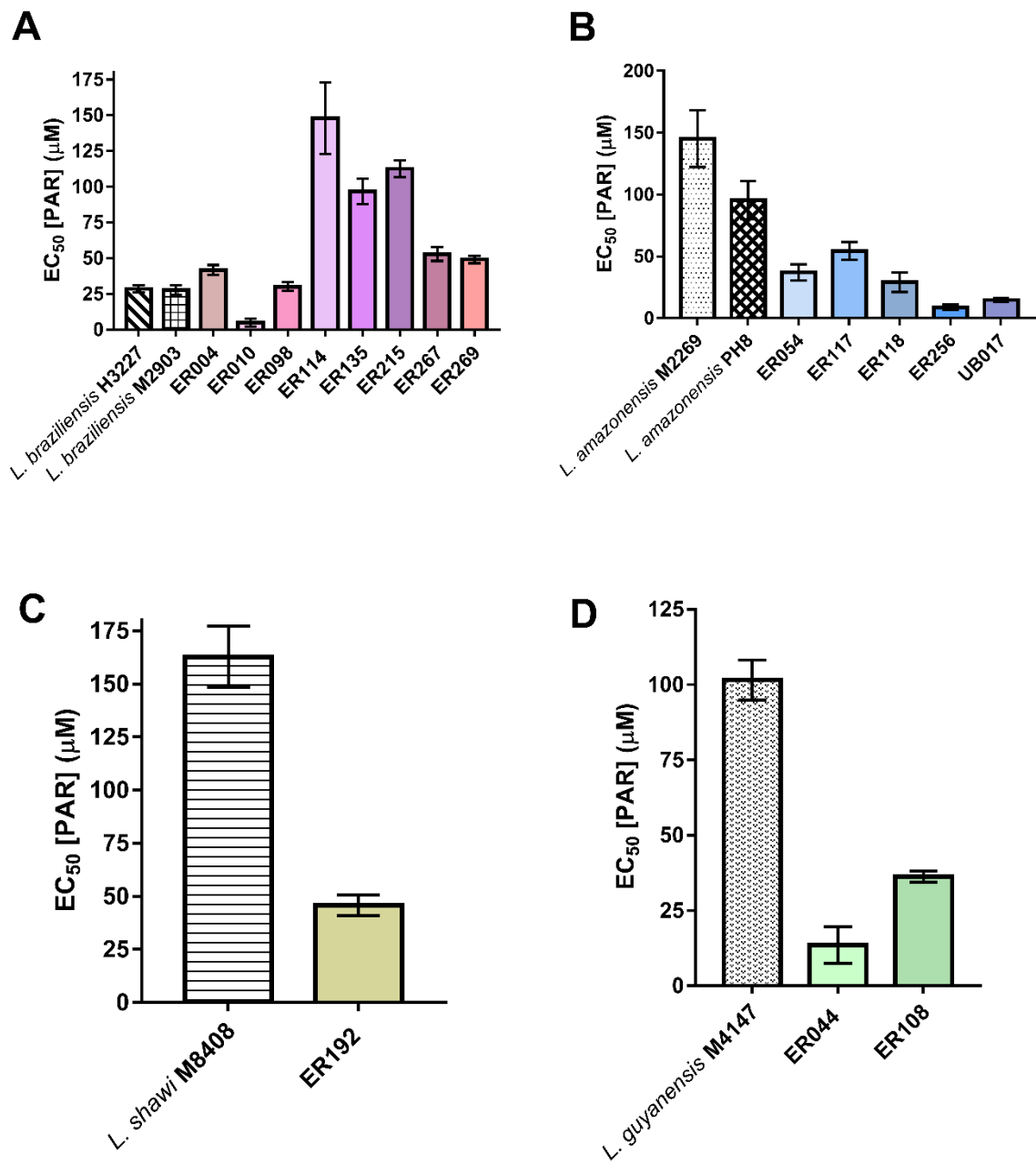


Figura 8. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota das respectivas cepas referência e dos isolados clínicos de *Leishmania* spp. (A) Média e desvio padrão dos valores de EC₅₀ dos isolados e das cepas referência de *L. (V.) braziliensis*; de *L. (L.) amazonensis* (B); de *L. (V.) shawi* (C) e de *L. (V.) guyanensis* (D).

5.4 Citotoxicidade

Para os ensaios de suscetibilidade à PAR em amastigotas intracelulares, foi determinado previamente, a citotoxicidade da PAR na célula hospedeira (macrófago derivado de medula óssea de camundongo BALB/c) utilizada nas infecções com o parasito. O método utilizado para a determinação dos valores de citotoxicidade à PAR para macrófagos provenientes de medula óssea baseou-se na contagem de células viáveis através do uso do corante Trypan Blue. O ensaio de citotoxicidade demonstrou que a PAR têm baixa toxicidade para os macrófagos. Os resultados obtidos mostraram que o valor de CC_{50} após 48 horas é de $962,4 \pm 65,1 \mu M$ (Figura 9A), enquanto que após 72 horas o CC_{50} diminui para $536,6 \pm 27,1 \mu M$ (Figura 9B).

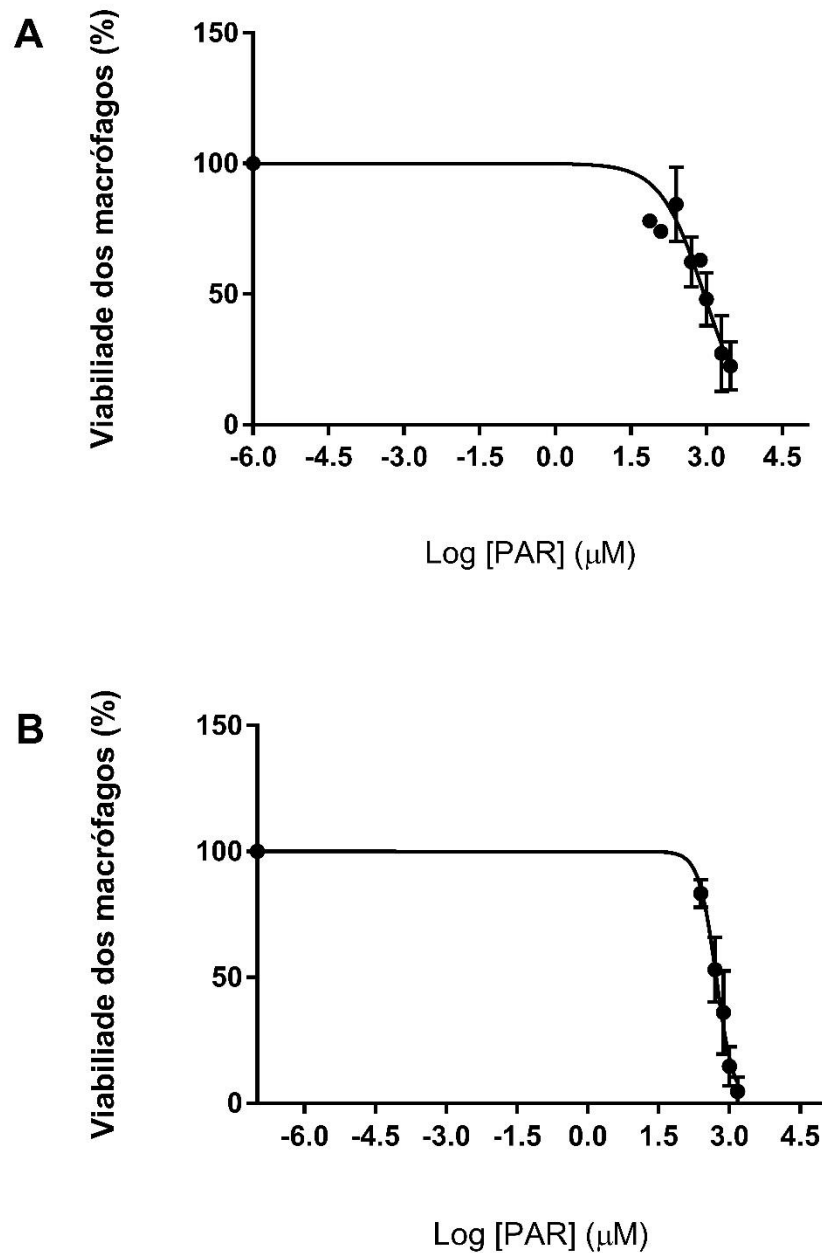


Figura 9. Curva dose-resposta utilizando Trypan Blue 0,4% para citotoxicidade em macrófagos derivados de medula óssea em presença de concentrações crescentes de PAR após 48 (A) e 72 horas (B).

5.5 Avaliação da suscetibilidade de amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. à PAR

A atividade da PAR *in vitro* contra as formas amastigotas intracelulares foi avaliada em macrófagos derivados da medula óssea previamente infectados com os respectivos isolados clínicos e cepas referência de *Leishmania* sp. Os resultados

estão representados na Tabela 7. Inicialmente, foi avaliada a taxa de infecção dos isolados e das cepas referência (Figura 10). As taxas de infecção variaram de cerca de 10% a 90% entre isolados e cepas referência das respectivas espécies. O valor médio de infecção entre os isolados clínicos e a espécies referência variaram de $65,8\% \pm 13,35$ para *L. (V.) braziliensis*; $42,44\% \pm 20,8$ para *L. (L.) amazonensis*; $58,67\% \pm 4,62$ para *L. (V.) guyanensis* e $80,5\% \pm 13,44$ para *L. (V.) shawi*.

Os valores de EC_{50} nas cepas referência *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) variaram entre 0,62 e 61,9 μM (Tabela 7; Figura 11). O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão da concentração citotóxica de PAR para 50% nos macrófagos ($CC_{50} = 536,6 \pm 27,1 \mu\text{M}$ após 72 horas de incubação) e a concentração que inibe o crescimento do parasito em 50% (EC_{50}) para cada um dos isolados ou cepa referência do parasito (Tabela 7). Foi observado variação nos valores de EC_{50} entre os isolados clínicos, cujos valores foram de 0,2 a 111,2 μM (Tabela 7 e Figura 12). Os três isolados clínicos que apresentaram os maiores valores de EC_{50} na forma amastigota foram: ER114, ER135 e ER192 (Tabela 7).

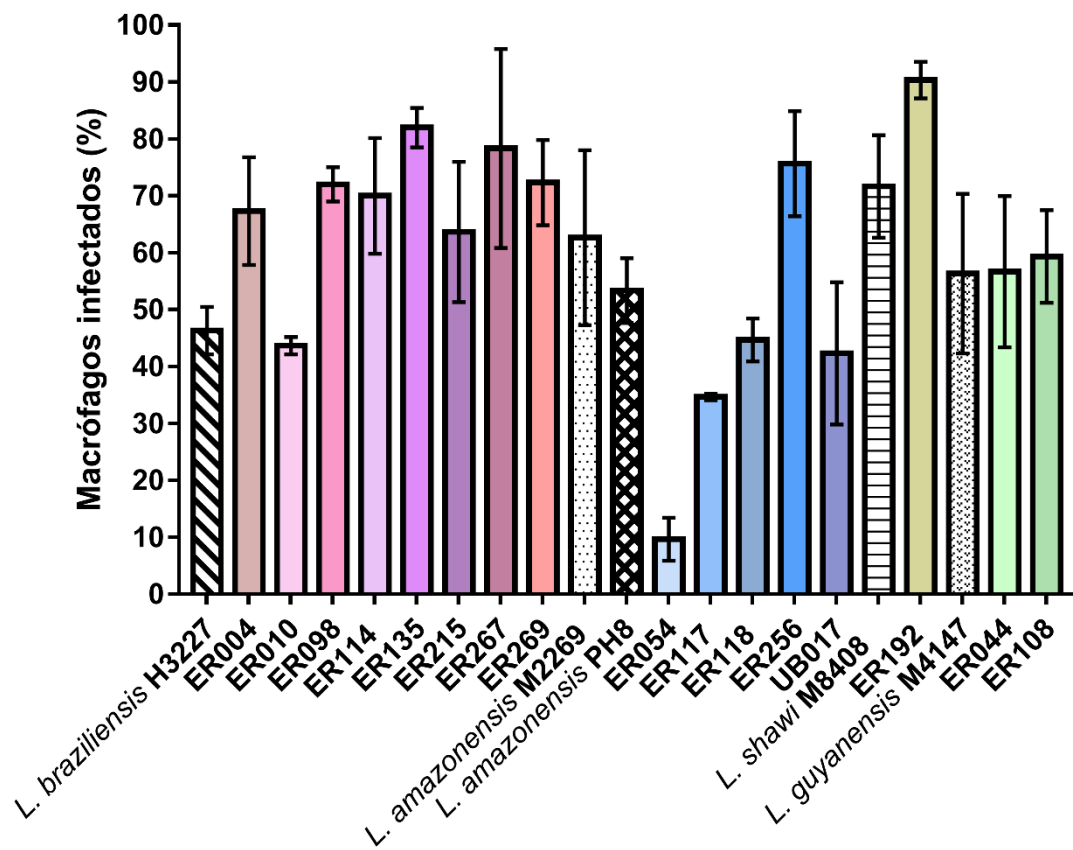


Figura 10. Porcentagem de infecção das cepas referência e dos isolados clínicos em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Está representado a média e desvio padrão na Figura.

Tabela 7. Suscetibilidade à PAR na forma amastigota das cepas referência e dos isolados clínicos.

Cepa/Código do isolado	Espécie do isolado	EC ₅₀ ± DP (µM)	EC ₉₀ (µM)	(n) ¹	IS
M2269	<i>L. (L.) amazonensis</i>	61 ± 9,48	111,9	3	8,6
PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i>	42,93 ± 3,52	73,59	3	12,5
ER054	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,57 ± 0,08	15,35	3	941,4
ER117	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,73 ± 0,03	17,46	3	735,1
ER118	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,2 ± 0,03	4,90	3	2683
ER256	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,54 ± 0,11	4,86	4	993,7
UB017	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,86 ± 0,11	7,74	3	655,3
H3227	<i>L. (V.) braziliensis</i>	2,97 ± 0,75	23,76	3	180,6
ER004	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3,1 ± 0,56	27,9	3	173,1
ER010	<i>L. (V.) braziliensis</i>	0,8 ± 0,06	33,12	3	670,7
ER098	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3,1 ± 0,42	31,68	3	173,1
ER114	<i>L. (V.) braziliensis</i>	6,83 ± 0,8	61,47	3	78,5
ER135	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3,57 ± 0,4	32,13	3	157,9
ER215	<i>L. (V.) braziliensis</i>	2,8 ± 0,41	25,2	3	191,6
ER267	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1,37 ± 0,32	12,33	3	391,6
ER269	<i>L. (V.) braziliensis</i>	0,67 ± 0,16	17,4	3	800,9
M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>	13,28 ± 2,55	102,9	3	40,4
ER044	<i>L. (V.) guyanensis</i>	1,74 ± 0,34	15,66	3	308,4
ER108	<i>L. (V.) guyanensis</i>	0,8 ± 0,1	18,43	3	670,75
M8408	<i>L. (V.) shawi</i>	5,83 ± 0,37	52,47	3	92,04
ER192	<i>L. (V.) shawi</i>	111,2 ± 6,88	337,8	4	4,82
M5533	<i>L. (V.) naiffi</i>	0,62 ± 0,17	14,72	3	865,5

Média de pelo menos três experimentos realizados em duplicata. As cepas referência utilizadas nos ensaios de suscetibilidade estão destacadas em cinza na Tabela.

¹n: número de experimentos independentes realizados por isolado. IS: índice de seletividade.

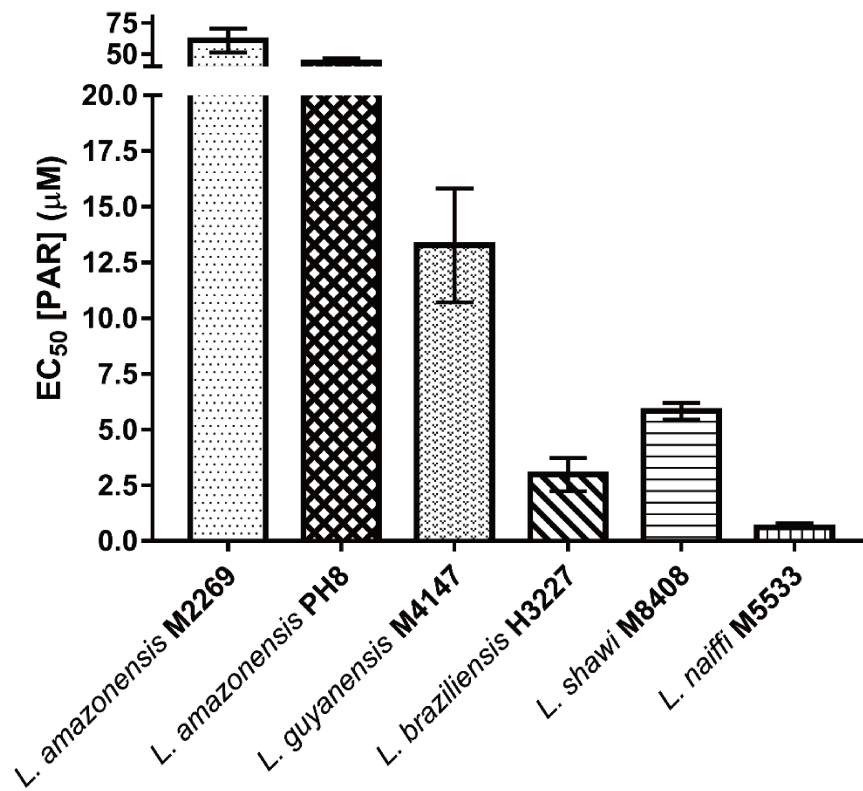


Figura 11. Suscetibilidade à PAR na forma amastigota intracelular. Está representado a média e desvio padrão dos valores de EC₅₀ das cepas referência de *Leishmania* spp.

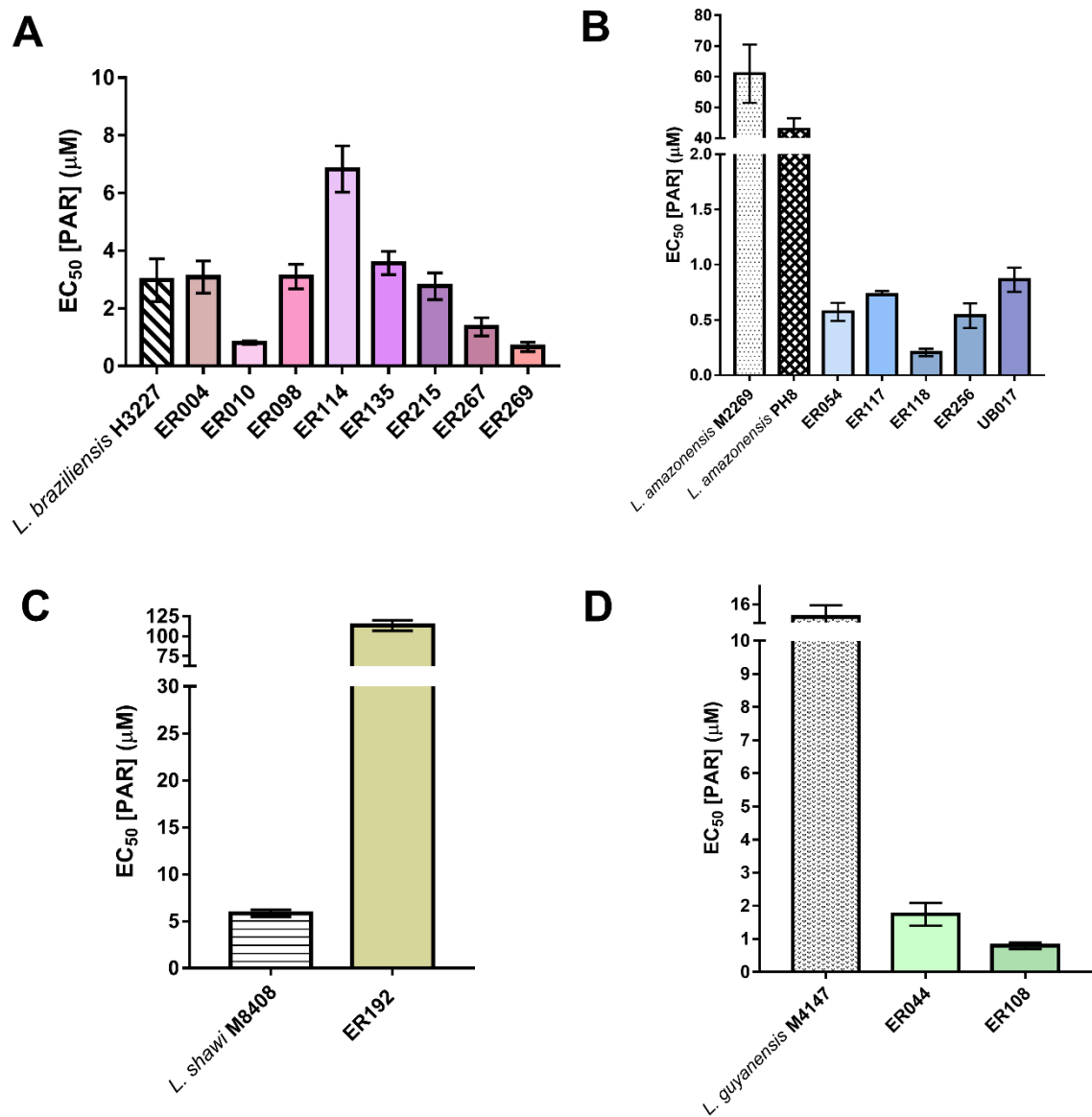


Figura 12. Suscetibilidade à PAR na forma amastigota intracelular das respectivas cepas referência e dos isolados clínicos de *Leishmania* spp. (A) Média e desvio padrão dos valores de EC₅₀ dos isolados e da cepa referência de *L. (V.) braziliensis*, de *L. (L.) amazonensis* (B); de *L. (V.) shawi* (C) e de *L. (V.) guyanensis* (D).

5.6 Avaliação da eficácia *in vivo* da PAR em modelo experimental de leishmaniose tegumentar

5.6.1 Avaliação da eficácia *in vivo* da PAR contra a cepa referência de *L. (L.) amazonensis*

Devido a existência de poucos estudos na literatura sobre o tratamento *in vivo* com PAR utilizando o modelo experimental de camundongo, primeiramente foi realizado um experimento piloto de infecção em BALB/c com *L. (L.) amazonensis*, baseando-se na dosagem do fármaco utilizado no tratamento em humanos (11 mg/kg/dia) (Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015), além de uma dosagem mais alta (75 mg/kg/dia). Cinco grupos de cinco camundongos fêmeas BALB/c cada foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). Os grupos foram tratados por via intraperitoneal (11 ou 75 mg/kg/dia) (Figura 13) ou via intramuscular (11 ou 75 mg/kg/dia) (Figura 14), além de um grupo controle não tratado. Após cinco semanas de infecção, foi iniciado o tratamento com PAR e a eficácia do tratamento foi avaliada pela espessura da lesão da pata infectada.

A partir dos resultados obtidos *in vivo* no experimento piloto utilizando dosagens de 11 e 75mg/kg/dia por vias intramuscular e intraperitoneal, verificou-se que a PAR apresentou atividade *in vivo* contra o parasito, porém a dosagem maior de 75 mg/kg/dia, não foi suficiente para a redução significativa do tamanho da lesão por ambas as vias de administração (Figura 13; Figura 14). A redução no tamanho da lesão diferiu para as duas dosagens, utilizando as duas vias de administração. Pela via intramuscular, foi observado uma redução de pouco mais de 40% para as dosagens de 11 e 75 mg/kg/dia (Figura 14B), enquanto que na via intraperitoneal houve maior redução na dosagem de 75 mg/kg/dia (cerca de 50%) quando comparado com a dosagem de 11 mg/kg/dia que reduziu apenas 10% do tamanho médio da lesão dos animais não tratados (controle) (Figura 13B).

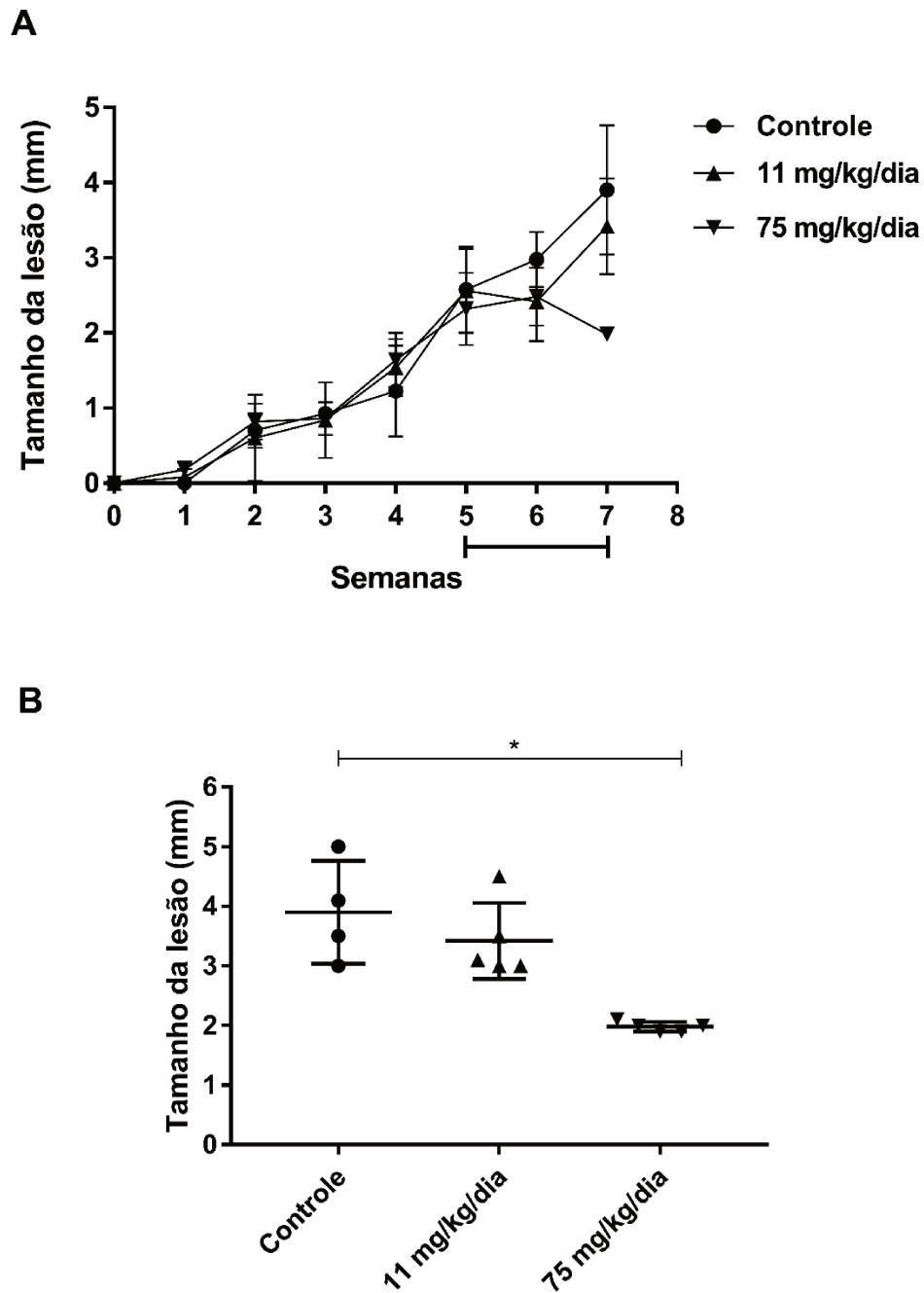


Figura 13. Tratamento com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita utilizando 1×10^6 promastigotas de fase estacionária de crescimento da cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). (A) Evolução da lesão dos camundongos BALB/c ao longo das semanas. O tratamento foi iniciado a partir da 5ª semana pós-infecção, durante 14 dias conforme as dosagens indicadas na Figura. A barra horizontal preta indica o período de tratamento com PAR. (B) Média do tamanho da lesão dos grupos de animais ao final do tratamento (14 dias). *: $P < 0,05$ em comparação com o grupo não tratado (controle) utilizando o teste “One way ANOVA” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. Controle: grupo de animais infectados não tratados com PAR.

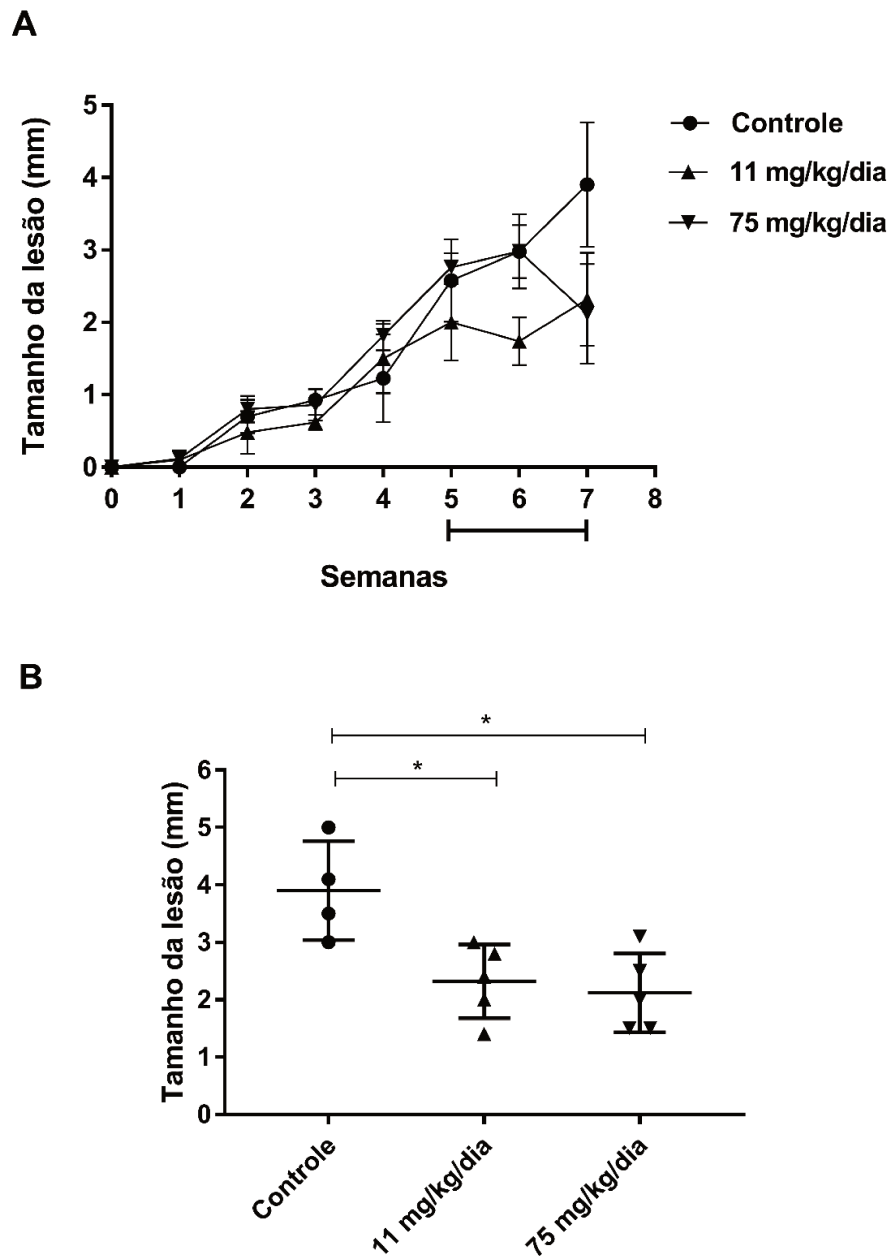


Figura 14. Tratamento com PAR por via intramuscular de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita utilizando 1×10^6 promastigotas de fase estacionária de crescimento da cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). (A) Evolução da lesão dos camundongos BALB/c ao longo das semanas. O tratamento foi iniciado a partir da 5ª semana pós-infecção, durante 14 dias conforme as dosagens indicadas na Figura. A barra horizontal preta indica o período de tratamento com PAR. (B) Média do tamanho da lesão dos grupos de animais ao final do tratamento (14 dias). *: $P < 0,05$ em comparação com o grupo não tratado (controle) utilizando o teste “One way ANOVA” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. Controle: grupo de animais infectados não tratados com PAR.

Baseando-se nos resultados obtidos previamente, foi realizado um segundo experimento *in vivo* com dosagens maiores de PAR (150 mg/kg/dia, 300 mg/kg/dia e 600 mg/kg/dia) por um período de 14 dias de tratamento. Este segundo experimento foi realizado apenas pela via intraperitoneal, devido ao fato de que a solubilidade da PAR em água é de 50 mg/mL e o volume máximo a ser administrado por via intramuscular em camundongos é de 30 μ L (Neves et al., 2013). Portanto, a dosagem máxima de PAR que poderia ser utilizada por via intramuscular em camundongos seria de 75 mg/kg.

Conforme apresentado na Figura 15, as dosagens de 300 e 600 mg/kg/dia apresentaram maior eficácia (Figura 15A), reduzindo o tamanho da lesão em aproximadamente 75% e 80% respectivamente (Figura 15B e 15C). Além disso, dois animais do grupo de 600 mg/kg/dia tiveram a espessura da pata infectada igual a espessura da pata não infectada (Figura 15B). Posteriormente, foi realizado um ensaio de PCR em tempo real para quantificar a carga parasitária nos animais tratados e no grupo não tratado (controle), utilizando como alvo, o gene *g6pdh*, um gene cópia única em *L. (L.) amazonensis*. Inicialmente, a reação de PCR foi validada utilizando os iniciadores a serem utilizados nos ensaios de PCR em tempo real. Foi observado que os iniciadores utilizados são específicos para *L. (L.) amazonensis*, não havendo amplificação inespecífica a partir do DNA extraído de tecido de camundongo não infectado (Fig. 16A). Por outro lado, esses iniciadores foram capazes de amplificar DNA de *L. (L.) amazonensis*, a partir de amostras de tecido da pata dos animais infectados com o parasito, assim como de DNA isolado de promastigotas em cultura (Fig. 16A). Neste caso foi amplificada uma banda de 110 pb, que corresponde ao tamanho do produto amplificado do gene *g6pdh*. Foram ainda utilizados iniciadores dirigidos ao gene de β -actina de camundongo, com o intuito de se verificar a qualidade do DNA extraído do tecido da pata do animal infectado e não infectado (Fig. 16B).

Os resultados de quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real indicaram que embora parasitos ainda tenham sido detectados na dosagem mais alta (600 mg/kg/dia), houve uma redução de aproximadamente 90% no número de parasitos dos animais tratados com a dosagem de 600 mg/kg/dia (Figura 17). Além disso, pode-se verificar que a redução da carga parasitária nas lesões dos animais infectados é dose dependente (Figura 17).

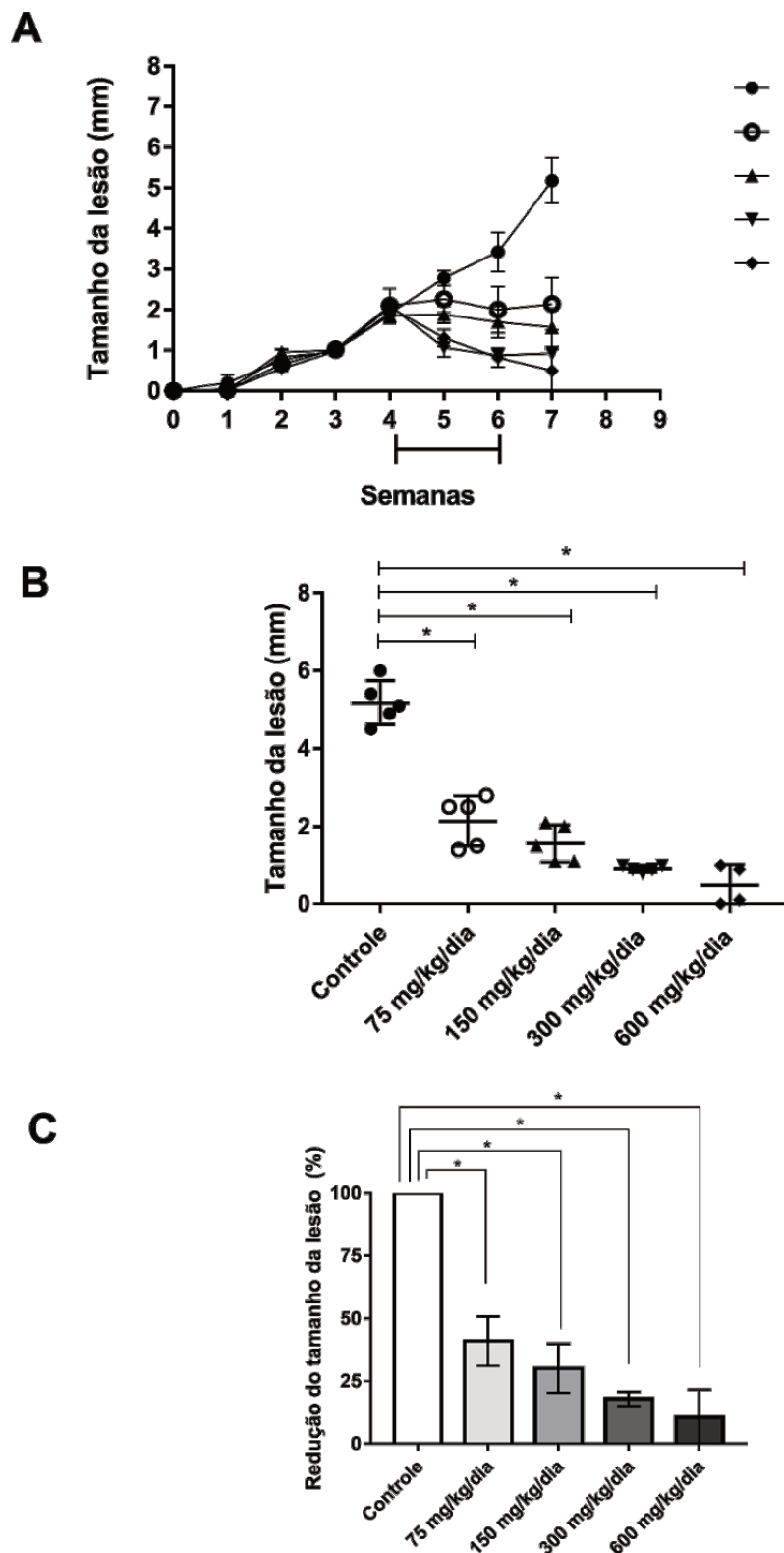


Figura 15. Tratamento com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita utilizando 1×10^6 promastigotas de fase estacionária de crescimento da cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). (A) Evolução da lesão dos camundongos BALB/c ao longo das semanas. O tratamento foi iniciado a partir da 4ª semana pós-infecção, durante 14 dias conforme

as dosagens indicadas na Figura. A barra horizontal preta indica o período de tratamento com PAR. (B) Média do tamanho da lesão dos grupos de animais ao final do tratamento. (C) Redução do tamanho da lesão ao final do tratamento em porcentagem. *: $P < 0,05$ em comparação com o grupo não tratado utilizando o teste “One way ANOVA” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. Controle: grupo de animais infectados não tratados com PAR.

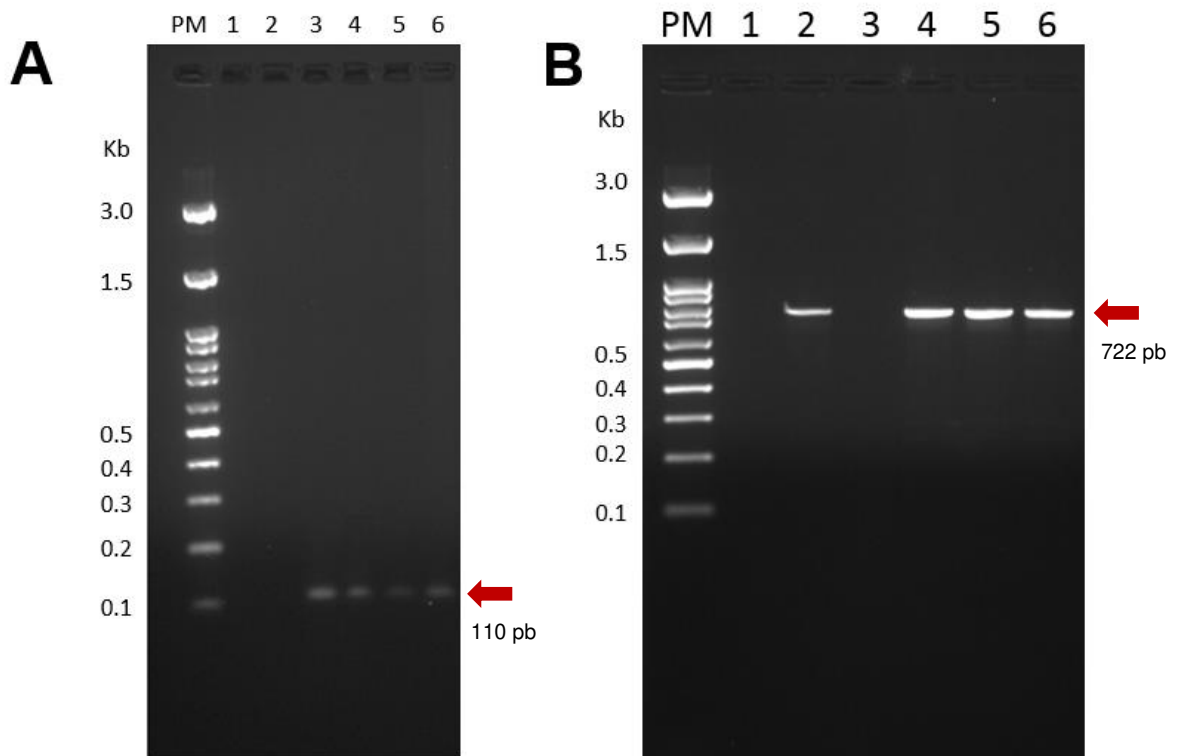


Figura 16. Validação dos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR em tempo real. Amplificação por PCR do gene *g6pdh* (110 pb) de *Leishmania amazonensis* (A) e do gene de β -actina (722 pb) de camundongo (B). Legenda: (A) PM - Marcador de Peso Molecular; 1 - Controle negativo da reação de PCR do gene *g6pdh* (A) ou do gene de β -actina (B); 2 - DNA total de pata de camundongo BALB/c não infectado; 3 - DNA genômico de cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269); 4 - DNA total de lesão da pata de camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) amazonensis*; 5 - DNA total de lesão da pata de camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) amazonensis* tratado com PAR (11 mg/kg/dia); 6 - DNA total de lesão da pata de camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) amazonensis* tratado com PAR (75 mg/kg/dia).

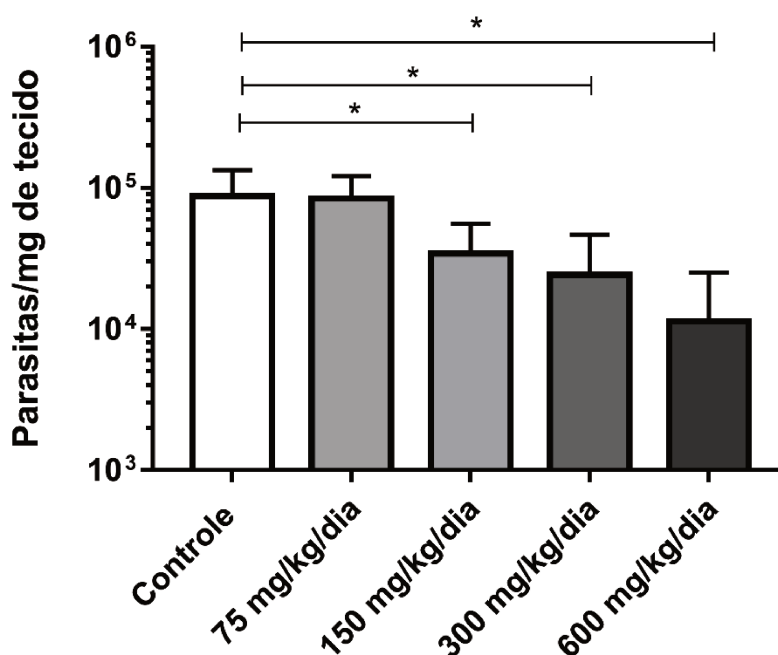


Figura 17. Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados ou não com PAR. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e uma amostra de tecido da pata infectada foi retirada para a extração do DNA da lesão. *: $P < 0,05$ em comparação com o grupo não tratado (controle) utilizando o teste “One way ANOVA” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. Controle: grupo de animais infectados não tratados com PAR.

Considerando que altas dosagens de PAR foram administradas nos animais tratados, particularmente as dosagens de 300 e 600 mg/kg/dia, foi verificado se estas altas dosagens poderiam ser tóxicas para os animais. Ao final do tratamento, os respectivos animais de cada grupo tiveram sua massa determinada. Os valores médios dos grupos estão indicados na Figura 18. Conforme representado nesta Figura, não houve diferença significativa na massa corporal média dos grupos de animais não tratados e tratados com PAR, sugerindo não haver toxicidade significativa nas dosagens administradas.

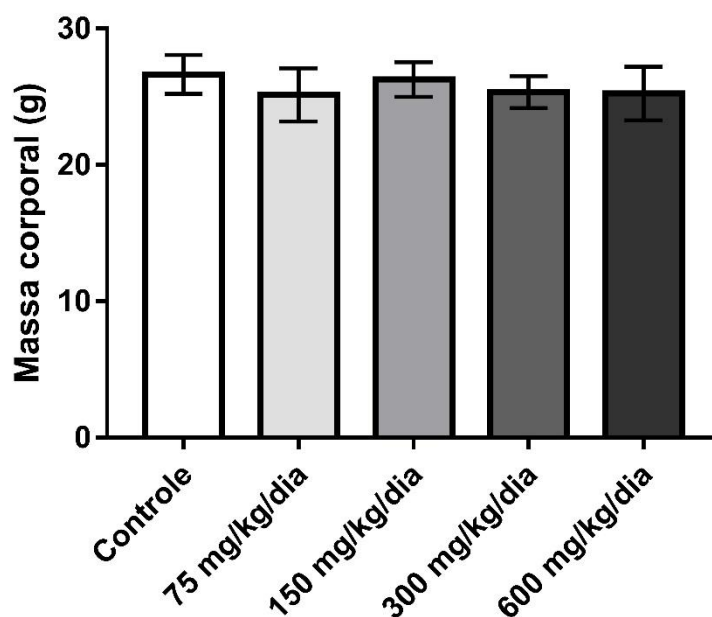


Figura 18. Massa corporal média dos grupos de animais tratados e não tratados (controle) com PAR. A diferença entre os respectivos grupos não foi considerada estatisticamente significativa utilizando o teste “*One way ANOVA*” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. (g - gramas).

5.6.2 Avaliação da eficácia *in vivo* da PAR contra a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* e o isolado clínico ER256

Com base no experimento realizado previamente com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), foi feito um segundo experimento *in vivo*, no qual foi avaliada a eficácia de PAR em animais infectados com o isolado clínico ER256, que apresentou ser aproximadamente 100 vezes mais sensível que a cepa referência da respectiva espécie na forma amastigota intracelular (Tabela 7 e Figura 12). Como foi observado uma redução significativa no tamanho da lesão de animais infectados com a cepa referência tratados com PAR (Figura 15), avaliamos a atividade da PAR em animais infectados com este isolado, afim de observar se existe uma correlação entre a suscetibilidade *in vitro* e a eficácia do tratamento *in vivo*.

Três grupos de cinco camundongos fêmeas BALB/c cada foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) e três grupos de cinco camundongos fêmeas BALB/c cada também foram infectados com o isolado clínico ER256. Após cinco

semanas de infecção, foi iniciado o tratamento com PAR (Figuras 19 e 20), no qual os animais infectados foram tratados com 150 mg/kg/dia ou 600 mg/kg/dia para cada cepa/isolado, tendo um grupo infectado não tratado como controle.

Conforme apresentado nas Figuras 19 e 20, a dosagem de 600 mg/kg/dia de PAR apresentou maior eficácia nos animais infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis*, assim como com o isolado ER256, com redução significativa do tamanho da lesão. Para a cepa referência, os resultados obtidos foram similares aos resultados do experimento anterior.

A quantificação da carga parasitária foi realizada através de PCR em tempo real. Como resultado, houve uma diminuição significativa no número de parasitos nos animais infectados com cada uma das linhagens e tratados com PAR (Figura 21). Uma diminuição de cerca de 90% da carga parasitária em animais infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* e tratados com 600 mg/kg/dia de PAR foi observada (Figura 21). Já os animais infectados com o isolado clínico ER256 e tratados com 600 mg/kg/dia apresentaram uma diminuição de aproximadamente 99% no número de parasitos nas lesões (Figura 21). As doses efetivas que eliminaram 50% dos parasitos nas lesões (ED_{50}), de acordo com os valores obtidos no ensaio de PCR em tempo real, foram calculadas e corresponderam a 200 mg/kg para a cepa M2269 e 60 mg/kg para o isolado clínico ER256.

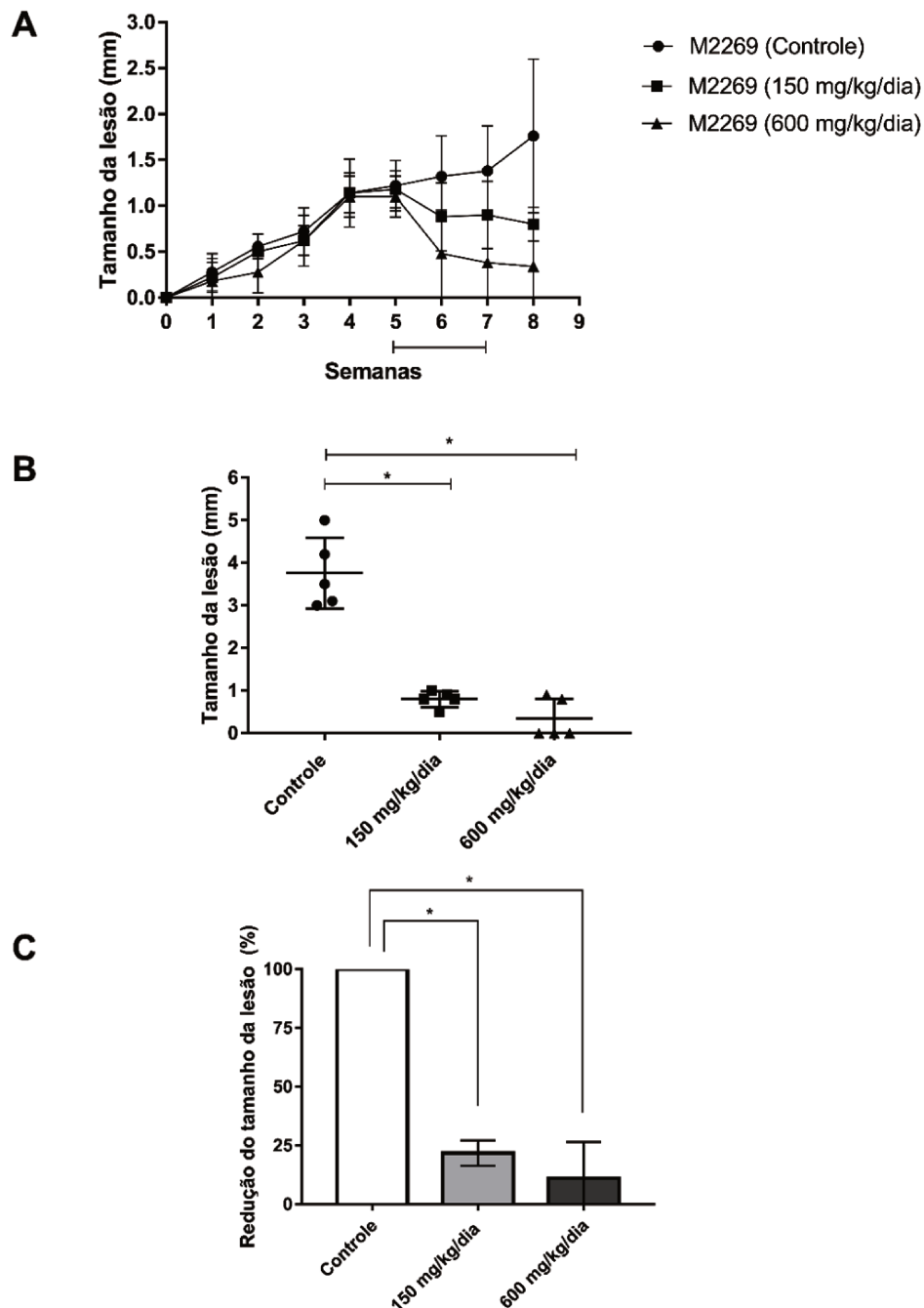


Figura 19. Tratamento com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita utilizando 1×10^6 promastigotas de fase estacionária de crescimento da cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). (A) Evolução da lesão dos camundongos BALB/c ao longo das semanas. O tratamento foi iniciado a partir da 5ª semana pós-infecção, durante 14 dias conforme as dosagens indicadas na Figura. A barra horizontal preta indica o período de tratamento com PAR. (B) Média do tamanho da lesão dos grupos de animais ao final do tratamento. (C) Redução do tamanho da lesão ao final do tratamento em porcentagem. *: $P < 0,05$ em comparação com o grupo não tratado utilizando o teste “One way ANOVA” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. Controle: grupo de animais infectados não tratados.

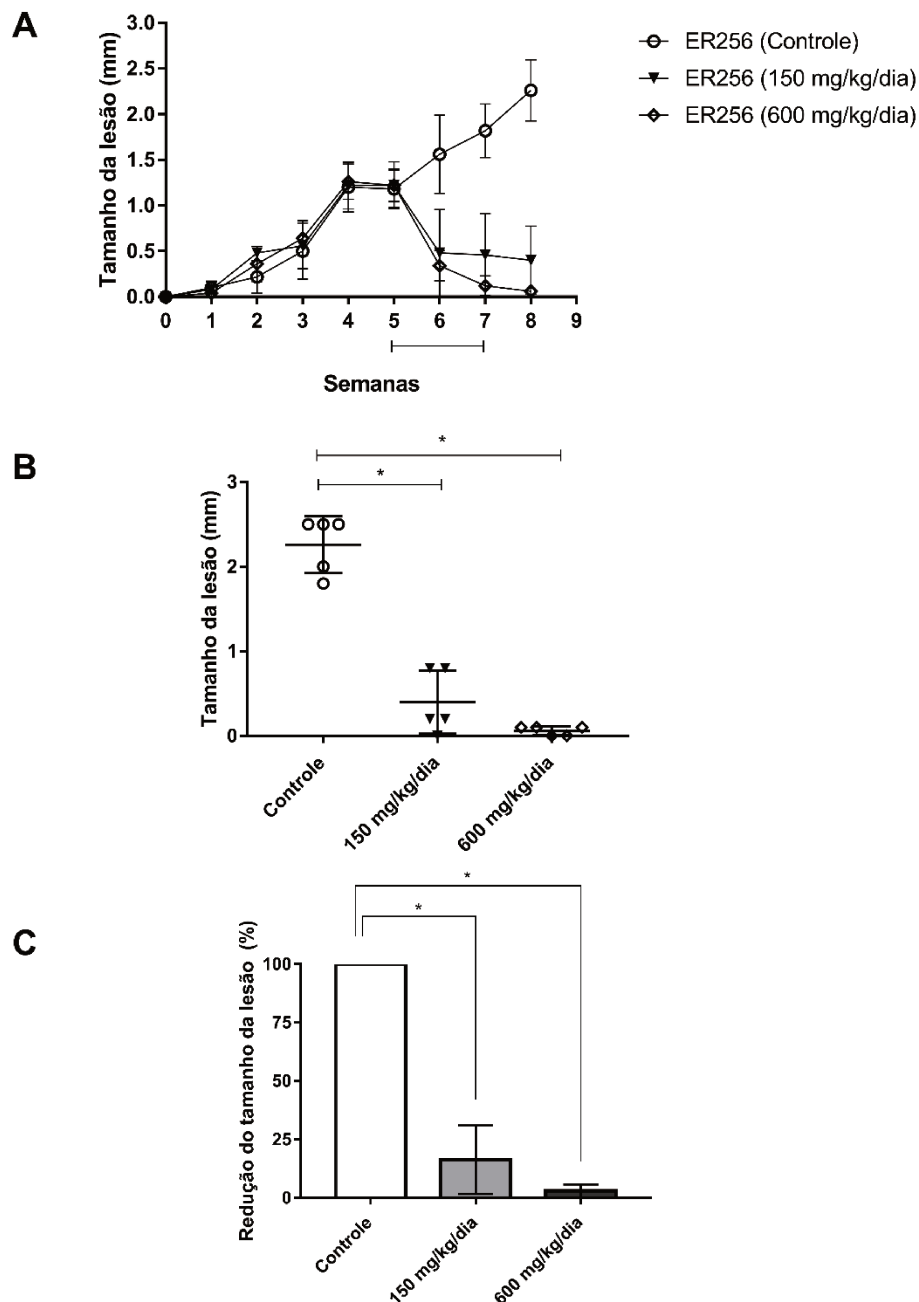


Figura 20. Tratamento com PAR por via intraperitoneal de camundongos BALB/c infectados com o isolado clínico ER256 de *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita utilizando 1×10^6 promastigotas de fase estacionária de crescimento do isolado. (A) Evolução da lesão dos camundongos BALB/c ao longo das semanas. O tratamento foi iniciado a partir da 5ª semana pós-infecção, durante 14 dias conforme as dosagens indicadas na Figura. A barra horizontal preta indica o período de tratamento com PAR. (B) Média do tamanho da lesão dos grupos de animais ao final do tratamento. (C) Redução do tamanho da lesão ao final do tratamento em porcentagem. *: $P < 0,05$ em comparação com o grupo não tratado utilizando o teste “One way ANOVA” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. Controle: grupo de animais infectados não tratados.

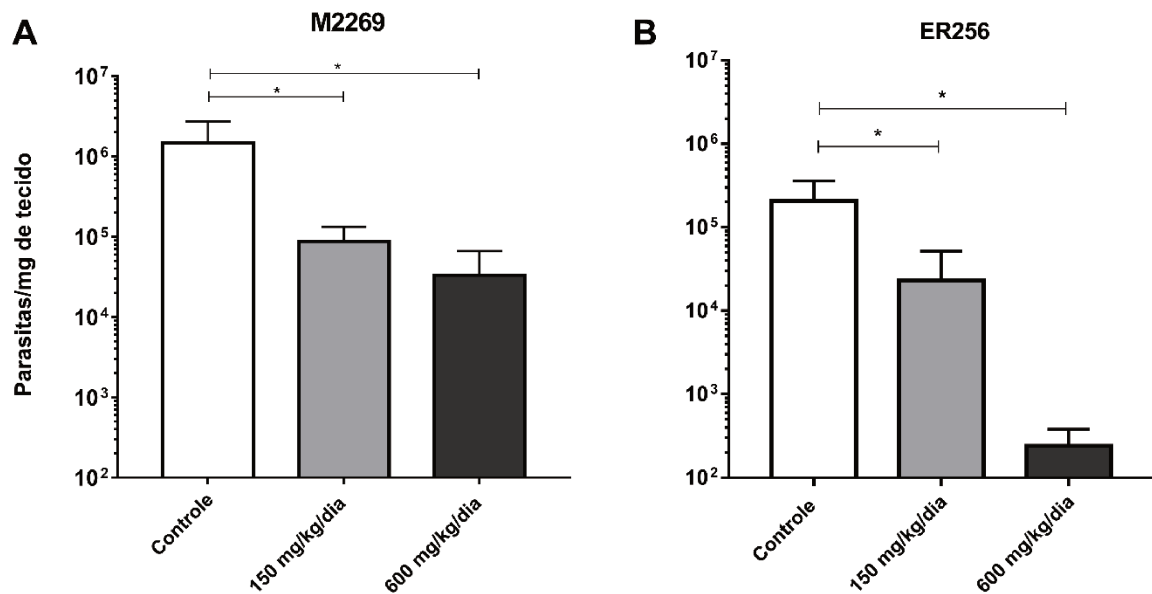


Figura 21. Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real dos animais infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (A) e com o isolado clínico ER256 (B) tratados ou não com PAR. Ao final do tratamento com as dosagens indicadas, os animais foram eutanasiados e uma amostra de tecido da pata infectada foi retirada para a extração do DNA da lesão. *: $P < 0,05$ em comparação com o grupo não tratado com PAR (controle) utilizando o teste “One way ANOVA” com pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 7. Grupo controle: grupo de animais infectados não tratados com PAR.

Para avaliar os possíveis efeitos das altas dosagens de PAR utilizada nos estudos *in vivo*, foram realizados exames bioquímicos para verificar possíveis alterações nos níveis séricos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST) e de creatinina. Os níveis aumentados das enzimas hepáticas ALT e AST podem ser causados por lesão das células hepáticas e consequente liberação na corrente sanguínea (McGill 2016), enquanto que níveis aumentados de creatinina indicam insuficiência renal, devido à redução na taxa de filtração glomerular (Srisawat e Kellum 2011).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 22, pode-se dizer que as altas dosagens de PAR utilizadas no tratamento, não levaram a alterações significativas nos níveis das enzimas hepáticas analisadas, assim como nos níveis de creatinina. Os resultados obtidos dos animais não infectados correspondem aos valores de referência encontrados na literatura (Suckow et al., 2001; Fernandes et al., 2018).

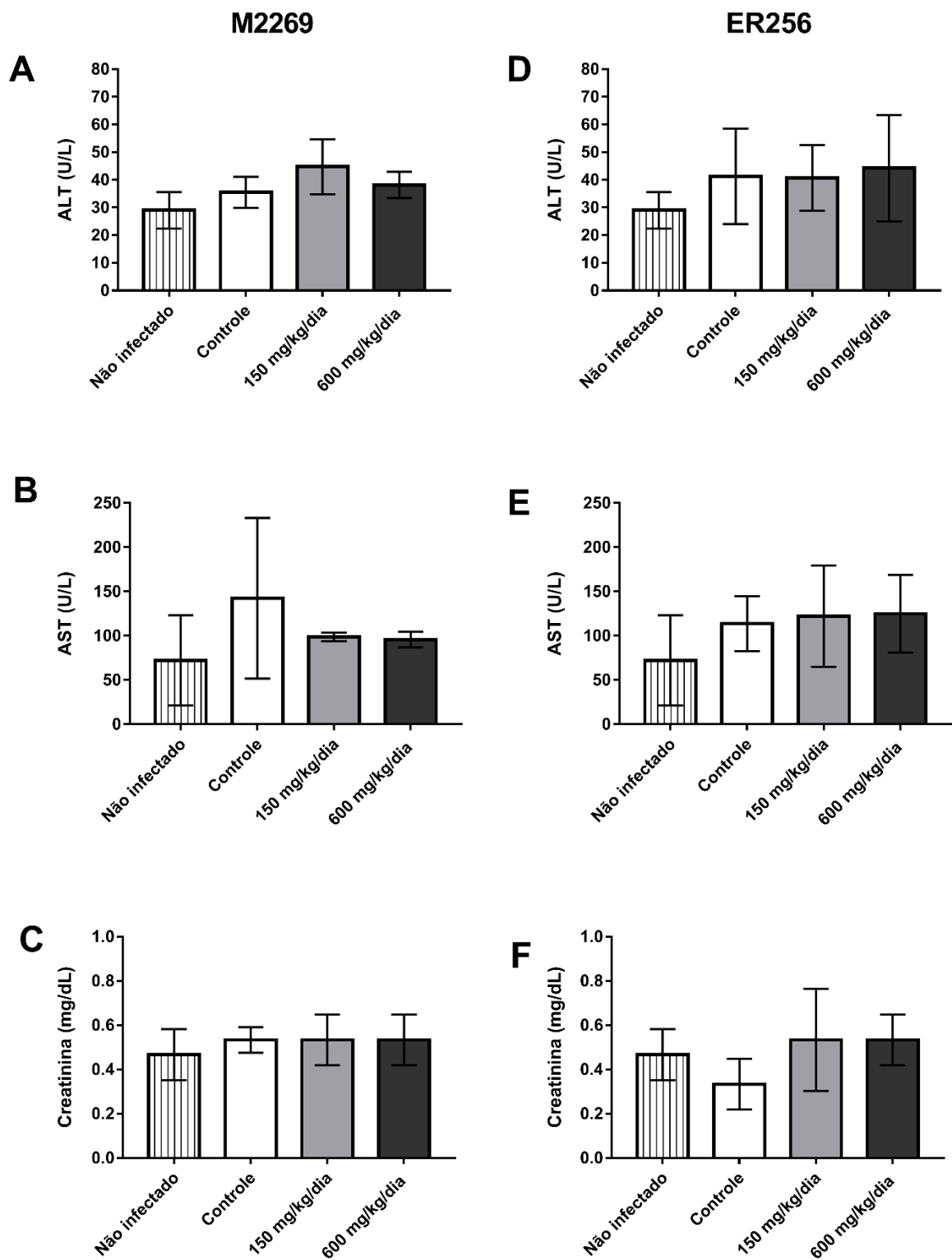


Figura 22. Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c não infectados, infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) (A, B e C) ou com o isolado ER256 (D, E e F) não tratados e tratados com PAR (150 ou 600 mg/kg/dia durante 14 dias). Estão representados os valores médios e o desvio padrão de 3 animais dos níveis de ALT (A e D), AST (B e E) e creatinina (C e F)

para cada um dos grupos de camundongos (não infectados, infectados e infectados e tratados com PAR).

6 DISCUSSÃO

Foi investigado nesse trabalho a suscetibilidade de cepas referência e isolados clínicos de *Leishmania* spp. à PAR, um fármaco que já vem sendo utilizado no sudeste Asiático no tratamento da LV causada por *L. (L.) donovani*. Além de ensaios de suscetibilidade *in vitro*, seu potencial no tratamento da LT foi analisado através de ensaios *in vivo* utilizando camundongos BALB/c.

O tratamento para ambas as formas clínicas da leishmaniose (LT e LV) é limitado a um número restrito de fármacos, principalmente no Brasil. Estes fármacos apresentam alta toxicidade, são de alto custo e são administrados por via parenteral. Além disso, os efeitos colaterais causados por esses medicamentos, pode levar a uma diminuição da adesão do paciente ao tratamento, podendo favorecer casos de falha terapêutica. Na Índia, a miltefosina e a PAR estão sendo utilizadas no tratamento da LV, devido ao alto índice de resistência clínica aos antimoniais pentavalentes. Esses fármacos apresentam efeitos colaterais mais brandos e apresentam alta taxa de cura (Sundar, Jha et al. 2006, Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015). No Brasil, apenas os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B estão em uso para o tratamento. Dessa forma, faz-se necessário avaliar a atividade de outros fármacos contra espécies do parasito circulantes no Brasil. A biodisponibilidade oral e uso de medicação por curto prazo tem sido priorizado para a escolha de fármacos, sendo a administração oral o método mais adequado para administrar fármacos devido à conveniência da dosagem, natureza não-invasiva e alta aceitação do paciente (Demicheli, Ochoa et al. 2004). Atualmente, para o tratamento da leishmaniose, a miltefosina é o único medicamento administrado por via oral utilizado na Ásia, contudo já foi observado relatos de casos de resistência clínica e de pacientes que apresentaram recaídas da doença após cura aparente (Rijal, Ostyn et al. 2013, Srivastava, Mishra et al. 2017, Alves, Bilbe et al. 2018). Deste modo, a PAR, mesmo que administrada por via parenteral, tem se mostrado ser uma alternativa para o tratamento da LV, particularmente no sudeste Asiático (Jha, Olliaro et al. 1998, Sundar e Rai 2005, Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015).

Inicialmente, foi avaliada a suscetibilidade à PAR *in vitro* em espécies causadoras da LT no Brasil, o que é de extrema importância, uma vez que não existem estudos relacionados ao tratamento com PAR em espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil e que causam a LT. Assim, foi avaliada a suscetibilidade à PAR *in vitro* em 7 cepas referência do parasito, destas 5 espécies endêmicas no Brasil e

responsáveis pela LT, além de 16 isolados clínicos provenientes de pacientes com LT do Instituto de Infectologia ER. Estes isolados clínicos foram previamente tipados molecularmente, sendo observada uma predominância de isolados de *L. (V.) braziliensis* (8), seguido de *L. (L.) amazonensis* (5), *L. (V.) guyanensis* (2) e *L. (V.) shawi* (1). Os resultados obtidos correspondem à predominância de espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil, sendo *L. (V.) braziliensis* a mais predominante, seguida de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (Ministério da Saúde, 2010).

Dentre esses isolados, o isolado ER114 apresentou um perfil de digestão com a enzima *HaeIII* utilizando o gene *hsp70* como marcador molecular diferente do que havia sido descrito previamente para *L. (V.) braziliensis* (Montalvo, Fraga et al. 2012, Espada, Ortiz et al. 2018). Em estudos realizados por Rugani et al. (2018) e Quaresma et al. (2018), esse perfil diferente já havia sido observado em isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes com lesões atípicas que apresentaram resistência ao antimonial pentavalente. Nestes estudos, isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis* foram tipados molecularmente através da amplificação do gene *hsp70* e sua posterior digestão com a enzima de restrição de *HaeIII*, o mesmo método utilizado neste estudo. Os isolados descritos nesses estudos, assim como o isolado ER114 apresentaram a presença de um fragmento de 624 pb quando o produto amplificado do gene *hsp70* era digerido com a enzima de restrição *HaeIII*. Este fragmento de restrição se dá pela ausência de um sítio de restrição *HaeIII* entre os fragmentos de 338 e 286 pb que são geralmente observados em isolados e cepas referência de *L. (V.) braziliensis* (Montalvo, Fraga et al. 2012, Espada, Ortiz et al. 2018). A ausência desse sítio foi confirmada pelo sequenciamento do produto amplificado do gene. Além disso, o sequenciamento da região do ITS, também confirmou a espécie do isolado ER114 como *L. (V.) braziliensis*, correspondendo também ao que havia sido previamente descrito com a sequência do gene *hsp70*.

Em relação a suscetibilidade *in vitro*, de maneira geral, pode-se observar que a forma amastigota dos isolados clínicos e das cepas referência apresentaram maior suscetibilidade à PAR do que a forma promastigota. Esses dados são relevantes, uma vez que indicam uma maior atividade do fármaco contra a forma do parasito responsável pela doença humana. Estudos prévios demonstraram que a miltefosina e a anfotericina B também apresentam maior atividade contra a forma amastigota quando comparados com a forma promastigota de espécies causadoras

da LT no Brasil (Zauli-Nascimento, Miguel et al. 2010, Mesquita, Tempone et al. 2014, Espada, Ribeiro-Dias et al. 2017).

Foi observada uma variação na suscetibilidade *in vitro* à PAR na forma promastigota entre isolados clínicos e as cepas referência das respectivas espécies cujos valores variaram de 4,95 a 147,8 μM para *L. (V.) braziliensis*, 9,98 a 145,23 μM para *L. (L.) amazonensis*, 13,53 a 101,5 μM para *L. (V.) guyanensis* e 45,73 a 162,9 μM para *L. (V.) shawi*. Além disso, observou-se também uma variação significativa nos valores de EC_{50} das espécies de *Leishmania* responsáveis pela LT no Brasil, cujos valores variaram de 27,79 a 205,03 μM . Dados similares foram observados em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* que apresentaram suscetibilidade variável *in vitro* à PAR em ambas as formas do parasito (Kulshrestha, Singh et al. 2011, Prajapati, Mehrotra et al. 2012, Mishra, Madhubala et al. 2013). Variação na suscetibilidade à PAR também já foi previamente reportado em espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil, nesse caso, os dados de suscetibilidade ficaram restritos às cepas referência de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, apenas na forma amastigota do parasito (de Moraes-Teixeira, Gallupo et al. 2014). Os resultados obtidos neste estudo descrevem pela primeira vez a suscetibilidade à PAR nas principais espécies já descritas como causadoras da LT no Brasil, em ambas as formas do parasito, promastigota e amastigota intracelular *in vitro*.

Em sua maioria, na forma promastigota, os isolados clínicos foram mais sensíveis à PAR que as respectivas cepas referência. De maneira geral, os isolados clínicos também apresentaram valores de EC_{50} menores que os respectivos valores das cepas referência na forma amastigota. No caso do isolado clínico de *L. (V.) braziliensis* (ER114), este apresentou um valor de EC_{50} maior que a cepa referência, assim como o isolado de *L. (V.) shawi* (ER192). Diante disso, outra observação a ser ressaltada em relação ao isolado ER192 é sua baixa suscetibilidade ao fármaco, cujo valor de EC_{50} chega a cerca de 20 vezes maior que a respectiva cepa referência M8408 na forma amastigota. Para *L. (L.) amazonensis*, os isolados clínicos também foram mais sensíveis à PAR quando comparado com as duas cepas referência. Dentre esses isolados, os isolados de *L. (L.) amazonensis* ER118 e ER256 apresentaram um perfil de suscetibilidade *in vitro* de cerca de 300 e 100 vezes maior na forma amastigota respectivamente do que a cepa referência desta espécie (M2269). Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares responsáveis

pela variação de suscetibilidade em *Leishmania*, contudo é relevante avaliá-los futuramente, uma vez que algumas dessas cepas/isolados apresentam resistência intrínseca à PAR. Em uma linhagem resistente selecionada *in vitro* de *L. (L.) donovani* foi observada uma redução no acúmulo da PAR quando comparado com a cepa selvagem, além de uma inibição na síntese proteica e uma redução no potencial de membrana quando comparado com a cepa selvagem suscetível (Jhingran, Chawla et al. 2009). Dois genes mostraram-se amplificados em uma linhagem resistente à PAR, genes estes codificadores das enzimas D-lactato desidrogenase e uma aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018). Essas alterações podem, por exemplo, estar presentes nas cepas/isolados com baixa suscetibilidade à PAR, no entanto, é importante ressaltar que essas cepas/isolados clínicos jamais foram expostos à PAR e que outros fatores podem estar associados à resistência intrínseca dessas cepas/isolados. De qualquer forma, a resistência intrínseca encontrada nesses isolados pode, por exemplo, favorecer a seleção de linhagens resistentes caso a PAR venha a ser utilizada no tratamento da LT no Brasil.

Considerando a atividade da PAR *in vitro*, foi avaliada a eficácia deste fármaco *in vivo* em modelo experimental murino. Contudo, para determinar as dosagens de PAR a serem utilizadas no tratamento, foi realizado um ensaio piloto com camundongos infectados com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis*, a segunda espécie mais prevalente no Brasil. O tratamento foi realizado após cinco semanas de infecção e os animais foram tratados com doses de 11 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia através de duas vias de administração distintas: via intraperitoneal e via intramuscular. A dosagem de 75 mg/kg/dia apresentou redução de 50% no tamanho da lesão, mas não foi o suficiente para reduzir significativamente o tamanho da lesão. Por esse motivo, foi realizado um segundo experimento com dosagens mais altas de PAR administrados por via intraperitoneal. Foi observado uma diminuição significativa nos tamanhos das lesões de animais tratados com 300 e 600 mg/kg/dia de PAR. Dois animais do grupo de 600 mg/kg/dia apresentaram redução total no tamanho da lesão, enquanto os demais reduziram aproximadamente 80%. Para a quantificação da carga parasitária, foram realizados ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) nos animais tratados e não tratados. Os dados do tamanho da lesão e carga parasitária demonstraram que a atividade da PAR é dose dependente, ou seja, a atividade antiparasitária aumenta com o aumento da dosagem do

fármaco. Conforme observado, o tratamento com 600 mg/kg/dia de PAR diminuiu em aproximadamente 90% o número de parasitos quando comparado ao grupo controle, embora ainda tenha sido observada a presença de parasitos nas lesões dos animais tratados com esta dose.

Em estudos realizados por Wijnant et al. (2017) e Wijnant et al. (2018), a PAR apresentou atividade antiparasitária contra *L. (L.) major* quando administrada na dosagem de 50 mg/kg/dia, tendo aproximadamente redução de 100% no tamanho da lesão e uma redução significativa no número de parasitos. Por outro lado, foi observado que essa mesma dosagem de PAR não apresentou atividade contra *L. (L.) mexicana*, não havendo redução no tamanho da lesão, bem como da carga parasitária quando comparados ao grupo controle não tratado com o fármaco. Com base nos resultados obtidos por Wijnant et al. (2017), pode-se inferir que talvez a dosagem utilizada (50 mg/kg/dia) não tenha sido o suficiente para a redução da carga parasitária de *L. (L.) mexicana* (Wijnant, Van Bocxlaer et al. 2017). Conforme demonstrado neste estudo, a dosagem de 75 mg/kg/dia diminuiu o tamanho da lesão em apenas 50%, e não reduziu de forma significativa o número de parasitos na lesão nos animais tratados com *L. (L.) amazonensis*. Outro ponto a ser considerado é que essa cepa de *L. (L.) mexicana* utilizada apresentou baixa suscetibilidade à PAR *in vitro* (valor de EC₅₀ na forma amastigota > 360 µM) (Wijnant, Van Bocxlaer et al. 2017) enquanto que as cepas de *L. (L.) amazonensis* M2269 e PH8 utilizadas neste estudo apresentaram valores de EC₅₀ de aproximadamente 61 e 43 µM respectivamente. Além disso, a cepa de *L. (L.) major* também apresentou alta suscetibilidade à PAR, cujo valor de EC₅₀ foi aproximadamente 58 µM (Wijnant, Van Bocxlaer et al. 2017). Nesse caso a dosagem de 50 mg/kg/dia de PAR, foi capaz de reduzir significativamente o tamanho da lesão e a quantidade de parasitos ao final do tratamento (Wijnant, Van Bocxlaer et al. 2017). Esses dados sugerem que a suscetibilidade intrínseca à PAR do parasito pode ser um fator essencial para a atividade antiparasitária do fármaco *in vivo*.

Considerando a variação de suscetibilidade à PAR *in vitro* observada nos isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, decidimos avaliar se existia alguma correlação da suscetibilidade *in vitro* com eficácia do tratamento *in vivo*. Para isso, foi realizado um experimento *in vivo* com a cepa referência de *L. (L.) amazonensis* (M2269) e o isolado clínico, da mesma espécie, ER256, cujos valores de EC₅₀ na

forma amastigota foram 61 e 0,54 μ M respectivamente. Os animais infectados com cada uma das linhagens foram tratados com dosagens de 150 e 600 mg/kg/dia de PAR durante 14 dias. Essas dosagens foram selecionadas de acordo com o experimento anterior, no qual a dosagem de 600 mg/kg/dia foi a mais efetiva para *L. (L.) amazonensis*, além de uma dosagem intermediária de 150 mg/kg/dia. Para a cepa referência (M2269), os resultados obtidos foram similares aos resultados anteriores. Já o isolado clínico ER256, a dosagem de 150 mg/kg/dia foi efetiva na redução no tamanho da lesão quando comparada com a mesma dosagem em animais infectados com a cepa referência. Na dosagem de 600 mg/kg/dia todos os animais apresentaram uma redução quase total do tamanho da lesão quando comparado ao grupo controle. Além disso, quando avaliada a carga parasitária por qPCR, a redução do número de parasitos foi significativamente maior nos animais infectados com o isolado ER256 do que com a cepa referência M2269. Embora o DNA do isolado ER256 ainda tenha sido detectado nos animais tratados com a dosagem mais alta de PAR, estes resultados indicam que a eficácia *in vivo* da PAR depende diretamente da suscetibilidade *in vitro* da cepa/isolado.

Ainda existem poucos estudos avaliando a eficácia clínica da PAR contra espécies responsáveis pela forma tegumentar da doença. Sabe-se que a PAR pode ser administrada por via tópica contra a LT, apresentando taxas de cura em humanos que variam entre 1,8 a 90% (Arana, Mendoza et al. 2001). As taxas de cura dos pacientes variaram dependendo da espécie, sendo os pacientes infectados por *L. (L.) mexicana*, aqueles que apresentaram as menores taxas de cura (Arana, Mendoza et al. 2001). Além disso, sabe-se que a atividade de formulações tópicas contendo apenas PAR é geralmente baixa, promovendo cura incompleta em animais infectados por *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* (El-On, Jacobs et al. 1984, Neal, Allen et al. 1995, Groggl, Schuster et al. 1999). Em estudo realizado por Gonçalves et al. (2005), foi avaliada a atividade de uma formulação hidrofílica de PAR em animais infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. O tratamento tópico de *L. (L.) amazonensis* contendo 10% de PAR em gel levou a redução significativa da lesão, seguido de recaída 40 dias pós-tratamento (Goncalves, Fernandes et al. 2005). Quando em combinação com o antimonial pentavalente administrado por via parenteral (5 mg/kg/dia), foi observado uma taxa de cura da lesão de aproximadamente 63% nos animais infectados (Goncalves, Fernandes et al. 2005). Para *L. (V.) braziliensis*, o tratamento tópico de PAR ou em combinação com o

antimonial pentavalente não apresentou diferença estatística entre os grupos, e apesar da redução no tamanho da lesão, as recaídas foram observadas em ambos os grupos de animais tratados (Goncalves, Fernandes et al. 2005). A atividade da PAR lipossomal também foi avaliada por via tópica em animais infectados com *L. (L.) major* (Carneiro, Santos et al. 2010). Foi observada diminuição no tamanho da lesão nos animais tratados com PAR lipossomal, com 100% de cura ao final do tratamento e recaídas 60 dias pós-tratamento e taxa de cura de apenas 30% (Carneiro, Santos et al. 2010).

Nanopartículas sólidas carreadoras de PAR também foram avaliadas quanto a sua eficácia *in vivo*, como alternativa de se aumentar a eficácia do fármaco (Heidari-Kharaji, Taheri et al. 2016). Em estudo realizado por Heidari-Kharaji et al. (2016), foi avaliada a eficácia desta formulação através de duas vias de administração em animais infectados com *L. (L.) tropica*. Animais tratados intramuscularmente com a combinação contendo 50 mg/kg de PAR apresentaram diminuição na carga parasitária quando comparados com o grupo tratado apenas com PAR (30 mg/kg). Os animais tratados intralesionalmente com a combinação contendo 15 mg/kg de PAR tiveram menos parasitos na lesão do que aqueles tratados somente com PAR (Heidari-Kharaji, Taheri et al. 2016). Ambas as vias de administração apresentaram eficácia similar (Heidari-Kharaji, Taheri et al. 2016). Quando analisada a eficácia da PAR tópica associada a anticorpos anti-TNF α em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*, o tratamento em combinação se mostrou mais eficaz em relação a redução do tamanho das lesões e da carga parasitária quando comparado com os animais tratados apenas com PAR por via tópica (Schwartz, Moreno et al. 2018). Neste estudo, a via parenteral foi utilizada para o tratamento de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*, com redução significativa no tamanho da lesão. Neste caso, os animais não foram acompanhados após o final do tratamento, e uma possível recaída seria esperada mesmo na dosagem mais alta, uma vez que o DNA dos parasitos foi detectado ao final do tratamento.

Considerando as altas dosagens utilizadas no tratamento dos animais, particularmente 300 e 600 mg/kg, foi avaliado se estas poderiam interferir na massa corpórea dos animais. Os resultados indicaram que as altas dosagens de PAR utilizadas não afetaram a massa corpórea dos animais, indicando, portanto, baixa toxicidade. Além disso, foram avaliados os níveis sanguíneos das enzimas hepáticas

AST e ALT e de creatinina em animais saudáveis, infectados não tratados e tratados com as dosagens de 150 e 600 mg/kg/dia de PAR. Não foi observada diferença estatística entre os animais tratados com PAR em comparação com os animais infectados não tratados e saudáveis, indicando que as dosagens utilizadas não causam dano hepático significativo nem insuficiência renal. Em humanos, a dosagem de 11mg/kg/dia por um período de 21 dias, apresentou baixa toxicidade e apenas 1% dos pacientes tiveram os níveis de ALT e AST aumentados, sugerindo neste caso um possível dano hepático (Sinha, Jha et al. 2011).

Com a disseminação de parasitos resistentes aos antimoniais no sudeste Asiático (Chakravarty e Sundar 2010), a miltefosina e a PAR foram introduzidas para o tratamento da LV. Alguns casos de resistência à miltefosina têm sido reportados (Mondelaers, Sanchez-Canete et al. 2016, Srivastava, Mishra et al. 2017); para a PAR, não há casos de resistência clínica, contudo cepas resistentes ao fármaco já foram geradas em laboratório (Maarouf, Adeline et al. 1998, Hendrickx, Boulet et al. 2014). Diante disso, o tratamento combinado miltefosina e PAR tem sido uma alternativa para o tratamento da LV (Sundar, Sinha et al. 2011). O tratamento com a combinação miltefosina e PAR por 5 dias mostrou uma eficácia superior comparado com a monoterapia PAR ou miltefosina em animais infectados com *L. (L.) infantum* (Hendrickx, Van den Kerkhof et al. 2017). Neste caso, houve uma redução de parasitos no baço e fígado de 99% e na medula óssea (98%) nos animais tratados com 20 mg/kg de miltefosina e 350 mg/kg de PAR administrada intraperitonealmente por 5 dias (Hendrickx, Van den Kerkhof et al. 2017). Estes dados, juntamente com os obtidos neste trabalho, sugerem que a PAR associada a outros fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses possa vir a ser utilizada no tratamento da LT no Brasil, embora ainda seja necessário estudos de terapia combinada com as espécies endêmicas do país.

Finalmente, os dados deste estudo sugerem que a dosagem máxima de PAR utilizada no modelo animal parece não ser capaz de eliminar completamente os parasitos nos animais infectados. Por outro lado, a atividade antiparasitária da PAR, sugere que este fármaco possa ser eventualmente associado a outros fármacos no tratamento da LT. Além disso, os dados apresentados neste estudo podem contribuir para o desenvolvimento racional de novos e mais específicos derivados de PAR contra as diferentes espécies de *Leishmania* responsáveis pela LT no Brasil.

7 CONCLUSÃO

Através do estudo da avaliação da atividade da PAR *in vitro* e *in vivo* em isolados clínicos e cepas referência das espécies causadoras da LT no Brasil, pode-se concluir:

- Dos 16 isolados clínicos disponíveis, oito destes foram tipados como *L. (V.) braziliensis*, seguido de cinco isolados de *L. (L.) amazonensis*, dois de *L. (V.) guyanensis* e um de *L. (V.) shawi*;
- A determinação de concentrações inibitórias da PAR *in vitro* para as formas promastigotas indicou uma suscetibilidade variável entre as cepas referência e os respectivos isolados clínicos, bem como entre si;
- A suscetibilidade à PAR *in vitro* para as formas amastigotas intracelulares do parasito também foi variável entre as cepas referência e os respectivos isolados clínicos, sendo esta forma mais suscetível que a forma promastigota, com exceção do isolado ER192 [*L. (V.) shawi*];
- Os valores obtidos nos ensaios de citotoxicidade à PAR realizados em macrófagos derivados de medula óssea revelaram uma variação nos valores de CC₅₀ em intervalos de tempo diferentes.
- A PAR apresentou atividade contra *L. (L.) amazonensis in vivo* de forma dose dependente. A dosagem de 600 mg/kg/dia foi aquela que apresentou maior atividade antiparasitária, no entanto esta dosagem não foi capaz de eliminar completamente os parasitos da lesão na cepa referência M2269, assim como, no isolado clínico ER256.
- A PAR mostrou-se mais eficaz no tratamento dos animais infectados com o isolado clínico ER256 do que com a cepa referência M2269.

8 REFERÊNCIAS

- Adler-Moore, J. P., J. P. Gangneux and P. G. Pappas (2016). "Comparison between liposomal formulations of amphotericin B." Med Mycol **54**(3): 223-231.
- Ahluwalia, S., S. D. Lawn, J. Kanagalingam, H. Grant and D. N. Lockwood (2004). "Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America." Bmj **329**(7470): 842-844.
- Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin and M. den Boer (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.
- Alvar, J., S. Yactayo and C. Bern (2006). "Leishmaniasis and poverty." Trends Parasitol **22**(12): 552-557.
- Alves, F., G. Bilbe, S. Blesson, V. Goyal, S. Monnerat, C. Mowbray, G. Muthoni Ouattara, B. Pecoul, S. Rijal, J. Rode, A. Solomos, N. Strub-Wourgaft, M. Wasunna, S. Wells, E. E. Zijlstra, B. Arana and J. Alvar (2018). "Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives." Clin Microbiol Rev **31**(4).
- Arana, B. A., C. E. Mendoza, N. R. Rizzo and A. Kroeger (2001). "Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala." Am J Trop Med Hyg **65**(5): 466-470.
- Aspöck, H., T. Gerersdorfer, H. Formayer and J. Walochnik (2008). "Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change." Wien Klin Wochenschr **120**(19-20 Suppl 4): 24-29.
- Bern, C., J. H. Maguire and J. Alvar (2008). "Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **2**(10): e313.
- Cantanhede, L. M., C. B. Mattos, C. de Souza Ronconi, C. P. B. Filgueira, C. F. da Silva Junior, C. Limeira, H. P. de Jesus Silva, G. E. M. Ferreira, R. Porrozzi, R. G. M. Ferreira and E. Cupolillo (2019). "First report of *Leishmania* (Viannia) *lindenbergi* causing tegumentary leishmaniasis in the Brazilian western Amazon region." Parasite **26**: 30.
- Carneiro, G., D. C. Santos, M. C. Oliveira, A. P. Fernandes, L. S. Ferreira, G. A. Ramaldes, E. A. Nunan and L. A. Ferreira (2010). "Topical delivery and in vivo antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis." J Liposome Res **20**(1): 16-23.
- Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. (2008). A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am. J. Trop. Med. Hyg. **78**: 122–132.
- Chakravarty, J. and S. Sundar (2010). "Drug resistance in leishmaniasis." J Glob Infect Dis **2**(2): 167-176.
- Chrusciak-Talhari, A., R. Dietze, C. Chrusciak Talhari, R. M. da Silva, E. P. Gadelha Yamashita, G. de Oliveira Penna, P. R. Lima Machado and S. Talhari (2011). "Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the

treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil." Am J Trop Med Hyg **84**(2): 255-260.

Croft, S. L. and P. Olliaro (2011). "Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities." Clin Microbiol Infect **17**(10): 1478-1483.

Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.

Cupolillo, E., L. R. Brahim, C. B. Toaldo, M. P. De Oliveira-Neto, M. E. De Brito, A. Falqueto, M. De Farias Naiff and G. Grimaldi, Jr. (2003). "Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil." J Clin Microbiol **41**(7): 3126-3132.

Cupolillo, E., G. Grimaldi Junior, H. Momen and S. M. Beverley (1995). "Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 145-155.

Davidson, R. N., M. den Boer and K. Ritmeijer (2009). "Paromomycin." Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(7): 653-660.

de Moraes-Teixeira, E., M. K. Gallupo, L. F. Rodrigues, A. J. Romanha and A. Rabello (2014). "In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species." J Antimicrob Chemother **69**(1): 150-154.

Demicheli, C., R. Ochoa, J. B. da Silva, C. A. Falcao, B. Rossi-Bergmann, A. L. de Melo, R. D. Sinisterra and F. Frezard (2004). "Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 100-103.

Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control." Clin Dermatol **14**(5): 417-423.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.

Docampo, R. and S. N. Moreno (2001). "The acidocalcisome." Mol Biochem Parasitol **114**(2): 151-159.

el-On, J., F. Cawich, D. A. Evans and L. Weinrauch (1993). "Topical treatment of cutaneous leishmaniasis in Belize: in vitro and in vivo studies with *Leishmania mexicana*." Int J Parasitol **23**(1): 121-127.

El-On, J., G. P. Jacobs, E. Witzum and C. L. Greenblatt (1984). "Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals." Antimicrob Agents Chemother **26**(5): 745-751.

el-On, J., L. Weinrauch, R. Livshin, Z. Even-Paz and G. P. Jacobs (1985). "Topical treatment of recurrent cutaneous leishmaniasis with ointment containing paromomycin and methylbenzethonium chloride." Br Med J (Clin Res Ed) **291**(6497): 704-705.

Espada, C. R., P. A. Ortiz, J. J. Shaw, A. M. P. Barral, J. M. L. Costa, S. R. B. Uliana and A. C. Coelho (2018). "Identification of *Leishmania (Viannia)* species and clinical isolates of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of

the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations." Diagn Microbiol Infect Dis **91**(4): 312-318.

Espada, C. R., F. Ribeiro-Dias, M. L. Dorta, L. I. A. Pereira, E. M. Carvalho, P. R. Machado, A. Schriefer, J. K. U. Yokoyama-Yasunaka, A. C. Coelho and S. R. B. Uliana (2017). "Susceptibility to Miltefosine in Brazilian Clinical Isolates of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*." Am J Trop Med Hyg **96**(3): 656-659.

Fagundes-Silva, G. A., G. A. Romero, E. Cupolillo, E. P. Yamashita, A. Gomes-Silva, J. A. Guerra and A. M. Da-Cruz (2015). "*Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*: rare enough to be neglected?" Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(6): 797-800.

Fernandes, D. P., Pimentel, M. M., Santos, F. A., Praxedes, É. A., Brito, P. D., Lima, M. A., & Bezerra, M. B. (2018). Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, (AHEAD), 0-0.

Fernandez, M. M., E. L. Malchiodi and I. D. Algranati (2011). "Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells." Antimicrob Agents Chemother **55**(1): 86-93.

Goncalves, G. S., A. P. Fernandes, R. C. Souza, J. E. Cardoso, F. de Oliveira-Silva, F. C. Maciel, A. Rabello and L. A. Ferreira (2005). "Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*." Acta Trop **93**(2): 161-167.

Grogl, M., B. G. Schuster, W. Y. Ellis and J. D. Berman (1999). "Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and gentamicin." J Parasitol **85**(2): 354-359.

Guimaraes, E. S. A. S., S. O. Silva, R. C. Ribeiro da Silva, V. C. S. Pinheiro, J. M. M. Rebelo and M. N. Melo (2017). "*Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis." PLoS One **12**(8): e0179052.

Heidari-Kharaji, M., T. Taheri, D. Doroud, S. Habibzadeh, A. Badirzadeh and S. Rafati (2016). "Enhanced paromomycin efficacy by solid lipid nanoparticle formulation against *Leishmania* in mice model." Parasite Immunol **38**(10): 599-608.

Heidari-Kharaji, M., T. Taheri, D. Doroud, S. Habibzadeh and S. Rafati (2016). "Solid lipid nanoparticle loaded with paromomycin: in vivo efficacy against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice model." Appl Microbiol Biotechnol **100**(16): 7051-7060.

Hendrickx, S., G. Boulet, A. Mondelaers, J. C. Dujardin, S. Rijal, L. Lachaud, P. Cos, P. Delputte and L. Maes (2014). "Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*." Parasitol Res.

Hendrickx, S., M. Van den Kerkhof, D. Mabile, P. Cos, P. Delputte, L. Maes and G. Caljon (2017). "Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*." PLoS Negl Trop Dis **11**(5): e0005620.

Herwaldt, B. L. and J. D. Berman (1992). "Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies." Am J Trop Med Hyg **46**(3): 296-306.

Howard, M. K., M. M. Pharoah, F. Ashall and M. A. Miles (1991). "Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro." Trans R Soc Trop Med Hyg **85**(4): 477-479.

Huson, D. H. and D. Bryant (2006). "Application of phylogenetic networks in evolutionary studies." Mol Biol Evol **23**(2): 254-267.

Jamil, K. M., R. Haque, R. Rahman, M. A. Faiz, A. T. Bhuiyan, A. Kumar, S. M. Hassan, H. Kelly, P. Dhalaria, S. Kochhar, P. Desjeux, M. A. Bhuiyan, M. M. Khan and R. S. Ghosh (2015). "Effectiveness Study of Paromomycin IM Injection (PMIM) for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (VL) in Bangladesh." PLoS Negl Trop Dis **9**(10): e0004118.

Jennings, Y. L., A. A. de Souza, E. A. Ishikawa, J. Shaw, R. Lainson and F. Silveira (2014). "Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Para state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* x *Leishmania* (Viannia) *shawi shawi*." Parasite **21**: 39.

Jha, S. N., N. K. Singh and T. K. Jha (1991). "Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial." J Assoc Physicians India **39**(4): 314-316.

Jha, T. K., P. Olliaro, C. P. Thakur, T. P. Kanyok, B. L. Singhanian, I. J. Singh, N. K. Singh, S. Akhouri and S. Jha (1998). "Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India." Bmj **316**(7139): 1200-1205.

Jha, T. K., S. Sundar, C. P. Thakur, P. Bachmann, J. Karbwang, C. Fischer, A. Voss and J. Berman (1999). "Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med **341**(24): 1795-1800.

Jhingran, A., B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett and R. Madhubala (2009). "Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **164**(2): 111-117.

Kapler, G. M., C. M. Coburn and S. M. Beverley (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-1094.

Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.

Kornberg, A., N. N. Rao and D. Ault-Riche (1999). "Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions." Annu Rev Biochem **68**: 89-125.

Kulshrestha, A., R. Singh, D. Kumar, N. S. Negi and P. Salotra (2011). "Antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* are susceptible to paromomycin and sitamaquine." Antimicrob Agents Chemother **55**(6): 2916-2921.

Lainson, R., J. J. Shaw and F. T. Silveira (1987). "Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents." Trans R Soc Trop Med Hyg **81**(4): 702-703.

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947- 2948.

Lee, N., S. Bertholet, A. Debrabant, J. Muller, R. Duncan and H. L. Nakhasi (2002). "Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*." *Cell Death Differ* **9**(1): 53-64.

Lemke, A., A. F. Kiderlen and O. Kayser (2005). "Amphotericin B." *Appl Microbiol Biotechnol* **68**(2): 151-162.

Lux, H., N. Heise, T. Klenner, D. Hart and F. R. Opperdoes (2000). "Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*." *Mol Biochem Parasitol* **111**(1): 1-14.

Maarouf, M., M. T. Adeline, M. Solignac, D. Vautrin and M. Robert-Gero (1998). "Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes." *Parasite* **5**(2): 167-173.

Maarouf, M., Y. de Kouchkovsky, S. Brown, P. X. Petit and M. Robert-Gero (1997). "In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*." *Exp Cell Res* **232**(2): 339-348.

Machado, P. R., J. Ampuero, L. H. Guimaraes, L. Villasboas, A. T. Rocha, A. Schriefer, R. S. Sousa, A. Talhari, G. Penna and E. M. Carvalho (2010). "Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(12): e912.

Marcondes, M., & Rossi, C. N. (2013). Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **50**(5), 341-352.

Maroli, M., M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel and L. Gradoni (2013). "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern." *Med Vet Entomol* **27**(2): 123-147.

McGill, M. R. (2016). "The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers." *Excli j* **15**: 817-828.

Mehta, A. and C. Shaha (2004). "Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity." *J Biol Chem* **279**(12): 11798-11813.

Mesquita, J. T., A. G. Tempone and J. Q. Reimao (2014). "Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime(R), miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes." *Acta Trop* **130**: 112-116.

Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman and V. Hannaert (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." *Biochim Biophys Acta* **1763**(12): 1463-1477.

Ministério da Saúde (2014). Leishmaniose Tegumentar Americana: Descrição da Doença. Disponível em: http://www.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11324&catid=723&Itemid=250. Acesso em: 29 ago 2019.

Ministério da Saúde (2007). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Ministério da Saúde (2010). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 11 Dez 2019. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf.

Mishra, J., R. Madhubala and S. Singh (2013). "Visceral and post-Kala-Azar dermal leishmaniasis isolates show significant difference in their in vitro drug susceptibility pattern." *Parasitol Res* **112**(3): 1001-1009.

Mistro, S., M. Maciel Ide, R. G. de Menezes, Z. P. Maia, R. T. Schooley and R. Badaro (2012). "Does lipid emulsion reduce amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review and meta-analysis." *Clin Infect Dis* **54**(12): 1774-1777.

Mondelaers, A., M. P. Sanchez-Canete, S. Hendrickx, E. Eberhardt, R. Garcia-Hernandez, L. Lachaud, J. Cotton, M. Sanders, B. Cuypers, H. Imamura, J. C. Dujardin, P. Delputte, P. Cos, G. Caljon, F. Gamarro, S. Castanys and L. Maes (2016). "Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes." *PLoS One* **11**(4): e0154101.

Montalvo, A. M., J. Fraga, I. Maes, J. C. Dujardin and G. Van der Auwera (2012). "Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**(7): 1453-1461.

Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." *Lancet* **366**(9496): 1561-1577.

Neal, R. A., S. Allen, N. McCoy, P. Olliaro and S. L. Croft (1995). "The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine." *J Antimicrob Chemother* **35**(5): 577-584.

Neves, S. M. P., Mancini Filho, J., & Menezes, E. W. (2013). Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. *São Paulo: Fcf-iq/usp*.

Nicholas, K. B., & Nicholas, H. J. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. 1997. *Distributed by the author*.

Nicolas, Luc, et al. "Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues." *Journal of clinical microbiology* **40.5** (2002): 1666-1669.

Oliveira, C. C., H. G. Lacerda, D. R. Martins, J. D. Barbosa, G. R. Monteiro, J. W. Queiroz, J. M. Sousa, M. F. Ximenes and S. M. Jeronimo (2004). "Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface." *Acta Trop* **90**(2): 155-162.

Pace, D. (2014). "Leishmaniasis." J Infect **69 Suppl 1**: S10-18.

Peters, N. C. and D. L. Sacks (2009). "The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis." Cell Microbiol **11**(9): 1290-1296.

Pimenta, P. F. P., Freitas, V. C., & Secundino, N. F. C. (2012). A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. Copyright. INCT-EM.(Cap. 12). Brasil: Rio de Janeiro.*

Ponte-Sucre, A., F. Gamarro, J. C. Dujardin, M. P. Barrett, R. Lopez-Velez, R. Garcia-Hernandez, A. W. Pountain, R. Mwenechanya and B. Papadopoulos (2017). "Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge." PLoS Negl Trop Dis **11**(12): e0006052.

Prajapati, V. K., S. Mehrotra, S. Gautam, M. Rai and S. Sundar (2012). "In vitro antileishmanial drug susceptibility of clinical isolates from patients with Indian visceral leishmaniasis--status of newly introduced drugs." Am J Trop Med Hyg **87**(4): 655-657.

Quaresma, P. F., C. F. A. de Brito, J. M. N. Rugani, J. M. Freire, R. P. Baptista, E. C. Moreno, R. C. Gontijo, F. D. Rego, J. E. Diniz, M. N. Melo and C. M. F. Gontijo (2018). "Distinct genetic profiles of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil." Parasitology **145**(9): 1161-1169.

Rakotomanga, M., M. Saint-Pierre-Chazalet and P. M. Loiseau (2005). "Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2677-2686.

Ramos, H., M. Saint-Pierre-Chazalet, J. Bolard and B. E. Cohen (1994). "Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **38**(5): 1079-1084.

Ramos, H., E. Valdivieso, M. Gamargo, F. Dagger and B. E. Cohen (1996). "Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions." J Membr Biol **152**(1): 65-75.

Rastrojo, A., R. Garcia-Hernandez, P. Vargas, E. Camacho, L. Corvo, H. Imamura, J. C. Dujardin, S. Castanys, B. Aguado, F. Gamarro and J. M. Requena (2018). "Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **8**(2): 246-264.

Reithinger, R., J. C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander and S. Brooker (2007). "Cutaneous leishmaniasis." Lancet Infect Dis **7**(9): 581-596.

Rijal, S., B. Ostyn, S. Uranw, K. Rai, N. R. Bhattarai, T. P. Dorlo, J. H. Beijnen, M. Vanaerschot, S. Decuyper, S. S. Dhakal, M. L. Das, P. Karki, R. Singh, M. Boelaert and J. C. Dujardin (2013). "Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance." Clin Infect Dis **56**(11): 1530-1538.

Rugani, J. N., P. F. Quaresma, C. F. Gontijo, R. P. Soares and R. L. Monte-Neto (2018). "Intraspecies susceptibility of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions." Biomed Pharmacother **108**: 1170-1180.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.

Santos, V. C., R. N. Araujo, L. A. Machado, M. H. Pereira and N. F. Gontijo (2008). "The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control." J Exp Biol **211**(Pt 17): 2792-2798.

Schwartz, J., E. Moreno, A. Calvo, L. Blanco, C. Fernandez-Rubio, C. Sanmartin, P. Nguewa, J. M. Irache, E. Larrea and S. Espuelas (2018). "Combination of paromomycin plus human anti-TNF-alpha antibodies to control the local inflammatory response in BALB/ mice with cutaneous leishmaniasis lesions." J Dermatol Sci **92**(1): 78-88.

Sereno, D., P. Holzmüller, I. Mangot, G. Cuny, A. Ouaisi and J. L. Lemesre (2001). "Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes." Antimicrob Agents Chemother **45**(7): 2064-2069.

Sereno, D., G. Roy, J. L. Lemesre, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2001). "DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening." Antimicrob Agents Chemother **45**(4): 1168-1173.

Shalev-Benami, M., Y. Zhang, H. Rozenberg, Y. Nobe, M. Taoka, D. Matzov, E. Zimmerman, A. Bashan, T. Isobe, C. L. Jaffe, A. Yonath and G. Skiniotis (2017). "Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin." Nat Commun **8**(1): 1589.

Shalev, M., H. Rozenberg, B. Smolkin, A. Nasereddin, D. Kopelyanskiy, V. Belakhov, T. Schrepfer, J. Schacht, C. L. Jaffe, N. Adir and T. Baasov (2015). "Structural basis for selective targeting of leishmanial ribosomes: aminoglycoside derivatives as promising therapeutics." Nucleic Acids Res **43**(17): 8601-8613.

Sharma, U. and S. Singh (2008). "Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control." J Vector Borne Dis **45**(4): 255-272.

Shaw, J. (2007). "The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review." Mem Inst Oswaldo Cruz **102**(5): 541-547.

Silveira, F. T., E. A. Ishikawa, A. A. De Souza and R. Lainson (2002). "An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania* (Viannia) *lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region." Parasite **9**(1): 43-50.

Sinha, P. K., T. K. Jha, C. P. Thakur, D. Nath, S. Mukherjee, A. K. Aditya and S. Sundar (2011). "Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India." J Trop Med **2011**: 645203.

- Soto, J. and J. Berman (2006). "Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine." Trans R Soc Trop Med Hyg **100 Suppl 1**: S34-40.
- Srisawat, N. and J. A. Kellum (2011). "Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome." Curr Opin Crit Care **17**(6): 548-555.
- Srivastava, S., J. Mishra, A. K. Gupta, A. Singh, P. Shankar and S. Singh (2017). "Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India." Parasit Vectors **10**(1): 49.
- Steverding, D. (2017). "The history of leishmaniasis." Parasit Vectors **10**(1): 82.
- Stone, N. R., T. Bicanic, R. Salim and W. Hope (2016). "Liposomal Amphotericin B (AmBisome((R))): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions." Drugs **76**(4): 485-500.
- Suckow, M. A., Danneman, P., & Brayton, C. (2001). *The laboratory mouse*. CRC Press Inc.
- Sundar, S. (2001). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis." Trop Med Int Health **6**(11): 849-854.
- Sundar, S. and J. Chakravarty (2008). "Paromomycin in the treatment of leishmaniasis." Expert Opin Investig Drugs **17**(5): 787-794.
- Sundar, S. and J. Chakravarty (2013). "Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy." Expert Opin Pharmacother **14**(1): 53-63.
- Sundar, S. and M. Chatterjee (2006). "Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities." Indian J Med Res **123**(3): 345-352.
- Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, S. K. Bhattacharya and M. Rai (2006). "Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **100 Suppl 1**: S26-33.
- Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, P. K. Sinha and S. K. Bhattacharya (2007). "Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India." N Engl J Med **356**(25): 2571-2581.
- Sundar, S., H. Mehta, A. V. Suresh, S. P. Singh, M. Rai and H. W. Murray (2004). "Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations." Clin Infect Dis **38**(3): 377-383.
- Sundar, S. and H. W. Murray (2005). "Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India." Bull World Health Organ **83**(5): 394-395.
- Sundar, S. and M. Rai (2005). "Treatment of visceral leishmaniasis." Expert Opin Pharmacother **6**(16): 2821-2829.
- Sundar, S., P. K. Sinha, M. Rai, D. K. Verma, K. Nawin, S. Alam, J. Chakravarty, M. Vaillant, N. Verma, K. Pandey, P. Kumari, C. S. Lal, R. Arora, B. Sharma, S. Ellis, N. Strub-Wourgaft, M. Balasegaram, P. Olliaro, P. Das and F. Modabber (2011). "Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial." Lancet **377**(9764): 477-486.

Sundar, S., P. K. Sinha, D. K. Verma, N. Kumar, S. Alam, K. Pandey, P. Kumari, V. Ravidas, J. Chakravarty, N. Verma, J. Berman, H. Ghalib and B. Arana (2011). "Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar." Trans R Soc Trop Med Hyg **105**(2): 115-117.

Uliana, S. R. (2012). Leishmania e Leishmanioses. Parasitologia Contemporânea. G. Koogan. Rio de Janeiro: 47-56.

van Griensven, J., M. Balasegaram, F. Meheus, J. Alvar, L. Lynen and M. Boelaert (2010). "Combination therapy for visceral leishmaniasis." Lancet Infect Dis **10**(3): 184-194.

Vannier-Santos, M. A., A. Martiny and W. de Souza (2002). "Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading." Curr Pharm Des **8**(4): 297-318.

Warburg, A. and Y. Schlein (1986). "The effect of post-bloodmeal nutrition of Phlebotomus papatasi on the transmission of Leishmania major." Am J Trop Med Hyg **35**(5): 926-930.

WHO, Organization WH. (1990) "The Leishmaniasis" Report of a WHO Expert Committee, T. Technical Report Series 701, WHO, Geneva.

World Health Organization (WHO) (2016). Leishmaniasis. World Health Org Fact Sheet. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 13 ago 2019.

Wijnant, G. J., K. Van Bocxlaer, V. Yardley, A. Harris, M. Alavijeh, R. Silva-Pedrosa, S. Antunes, I. Mauricio, S. Murdan and S. L. Croft (2018). "Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome((R)) and AmBisome((R)) in murine cutaneous leishmaniasis." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **8**(2): 223-228.

Wijnant, G. J., K. Van Bocxlaer, V. Yardley, S. Murdan and S. L. Croft (2017). "Efficacy of Paromomycin-Chloroquine Combination Therapy in Experimental Cutaneous Leishmaniasis." Antimicrob Agents Chemother **61**(8).

Wingard, J. R., M. H. White, E. Anaissie, J. Raffalli, J. Goodman and A. Arrieta (2000). "A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. L Amph/ABLC Collaborative Study Group." Clin Infect Dis **31**(5): 1155-1163.

Yardley, V. and S. L. Croft (1997). "Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis." Antimicrob Agents Chemother **41**(4): 752-756.

Zamboni, D. S. and M. Rabinovitch (2003). "Nitric oxide partially controls Coxiella burnetii phase II infection in mouse primary macrophages." Infect Immun **71**(3): 1225-1233.

Zauli-Nascimento, R. C., D. C. Miguel, J. K. Yokoyama-Yasunaka, L. I. Pereira, M. A. Pelli de Oliveira, F. Ribeiro-Dias, M. L. Dorta and S. R. Uliana (2010). "In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania)

amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B." Trop Med Int Health **15**(1): 68-76.

Zauli, R. C., J. K. Yokoyama-Yasunaka, D. C. Miguel, A. S. Moura, L. Pereira, I. A. da Silva, Jr., L. G. Lemes, M. L. Dorta, M. A. de Oliveira, A. N. Pitaluga, E. A. Ishikawa, J. C. Rodrigues, Y. M. Traub-Cseko, A. T. Bijovsky, F. Ribeiro-Dias and S. R. Uliana (2012). "A dysflagellar mutant of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient." Parasit Vectors **5**: 11.

Zulfiqar, B., T. B. Shelper and V. M. Avery (2017). "Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development." Drug Discov Today **22**(10): 1516-1531.

9.1 Certificado de aprovação de uso de animais pela CEUA/UNICAMP



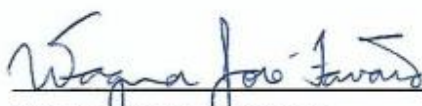
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da eficácia da paromomicina no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental**, registrada com o nº **4797-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Elizabeth M. Coser**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **08 de março de 2018**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2018-28/02/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	08/03/2018-28/02/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	100
Idade/Peso:	04 semanas / 23g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 08 de março de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Coordenador


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

9.2 Alteração de título de dissertação em certificado de aprovação de uso de animais pela CEUA/UNICAMP



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Avaliação da eficácia da paromomicina no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4797-1/2018), de responsabilidade do Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Elizabeth M. Coser, teve o título alterado para “Atividade da paromomicina *in vitro* contra isolados clínicos de *Leishmania* spp. e sua eficácia *in vivo* no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental”.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP e aprovado na reunião do dia 23/10/2018.

Campinas, 30 de outubro de 2019.

Profa. Dra. Cinthia Baú Betim Cazarin
Vice-Presidente da CEUA/UNICAMP

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

9.3 Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Atividade da paromomicina in vitro contra isolados clínicos de Leishmania spp. e sua eficácia in vivo no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 4 de fevereiro de 2020.

Assinatura : Elizabeth M. Coser
Nome do(a) autor(a): **Elizabeth Magiolo Coser**
RG n.º 49.914.122-2

Assinatura : Adriano C. Coelho
Nome do(a) orientador(a): **Adriano Cappellazzo Coelho**
RG n.º 26.111.655-1