



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Instituto de Biologia

BIANCA ALVES FERREIRA

INVESTIGAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À ANFOTERICINA B E À  
MILTEFOSINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *LEISHMANIA* SPP.:  
ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY TO AMPHOTERICIN B  
AND MILTEFOSINE IN CLINICAL ISOLATES OF *LEISHMANIA*  
SPP.: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES

CAMPINAS  
2022

BIANCA ALVES FERREIRA

INVESTIGAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À ANFOTERICINA B E À  
MILTEFOSINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *LEISHMANIA* SPP.: ESTUDOS  
*IN VITRO* E *IN VIVO*

INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY TO AMPHOTERICIN B AND  
MILTEFOSINE IN CLINICAL ISOLATES OF *LEISHMANIA* SPP.: *IN VITRO*  
AND *IN VIVO* STUDIES

*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 BIANCA ALVES FERREIRA  
ORIENTADA PELO PROF. DR. ADRIANO  
CAPPELLAZZO COELHO.

CAMPINAS  
2022

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

F413i Ferreira, Bianca Alves, 1997-  
Investigação da suscetibilidade à anfotericina B e à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania* spp. : estudos *in vitro* e *in vivo* / Bianca Alves Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

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

1. Leishmaniose - Tratamento farmacológico. 2. Resistência a medicamentos. 3. Anfotericina B. 4. Miltefosina. I. Coelho, Adriano Cappellazzo, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Investigation of susceptibility to amphotericin B and miltefosine in clinical isolates of *Leishmania* spp. : *in vitro* and *in vivo* studies

**Palavras-chave em inglês:**

Leishmaniasis - Drug therapy

Drug resistance

Amphotericin B

Miltefosine

**Área de concentração:** Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

**Titulação:** Mestra em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Adriano Cappellazzo Coelho [Orientador]

Selma Giorgio

Juliana Quero Reimão Dalla Zanna

**Data de defesa:** 04-03-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9271-8049>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8459148969074255>

Campinas, 4 de março de 2022.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

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

Prof.(a). Dr.(a) Juliana Quero Reimão Dalla Zanna

*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.

Este trabalho é dedicado a  
minha família e a todos que  
contribuíram para sua  
realização.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais Eraldo e Vandilene e ao meu irmão Thiago, pelo carinho, apoio incondicional e por compreenderem a minha ausência em muitos momentos. Ao meu noivo Tiago Salvadori pelo companheirismo, carinho, dedicação, amizade, paciência e incentivo. Muito obrigada pelas doses diárias de otimismo e por estar sempre ao meu lado em todos as fases e momentos. Amo vocês!

Ao meu orientador Dr. Adriano Cappellazzo Coelho pela oportunidade de trabalhar nesta instituição e pela valiosa orientação no desenvolvimento desse trabalho. Minha gratidão, admiração e respeito.

A todos os meus colegas do Laboratório de Protozoologia (Elizabeth, Cristiele, Tábata, Viviane e Beatriz) pelo companheirismo, convivência durante todos esses anos e por fazerem os meus dias ficarem mais leves e felizes. Em especial a minha amiga Elizabeth, que está comigo desde 2017, muito obrigada pelos momentos, conselhos e por essa amizade única e especial, conte sempre comigo!

Aos professores do Departamento de Parasitologia, Marlene, Silmara, Fernanda, Danilo, Selma e Patrícia por terem participado do meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Nilson, Cirene e Camilo, pelo excelente trabalho, prontidão e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Angelo L. Lindoso do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, à Edite H. Yamashiro Kanashiro do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e a Profa. Dra. Mayara I. S. Lima da Universidade Federal do Maranhão, por disponibilizarem os isolados clínicos para que essa pesquisa fosse desenvolvida.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2020/01948-1, pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa, agregando no meu crescimento profissional através da participação de congressos e fornecendo os materiais necessários para a realização deste projeto. Além do apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada a realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso”.*

Albert Einstein

## RESUMO

### **Investigação da suscetibilidade à Anfotericina B e à Miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania* spp.: estudos *in vitro* e *in vivo***

A leishmaniose é uma doença negligenciada e endêmica em pelo menos 98 países, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Esses protozoários são parasitos digenéticos e são transmitidos através da picada de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos. Apesar da doença ter caráter eminentemente rural, a mesma encontra-se em expansão para regiões urbanas de médio a grande porte, tornando-se um crescente problema de saúde pública no Brasil. Anualmente são notificados 25 mil casos de leishmaniose tegumentar e 3 mil novos casos de leishmaniose visceral. A quimioterapia da leishmaniose no Brasil limita-se basicamente ao uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina. Estes fármacos possuem uma resposta clínica variável, são administrados via parenteral, além de possuírem vários efeitos colaterais, devido a toxicidade. Recentemente, a miltefosina foi aprovada para o tratamento clínico da leishmaniose tegumentar no Brasil, fármaco este que já vem sendo utilizado há quase duas décadas no tratamento da leishmaniose visceral na Ásia. Neste estudo, foi avaliada a suscetibilidade *in vitro* da anfotericina B e da miltefosina em todas as espécies endêmicas de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose tegumentar e visceral no Brasil e em um painel de 14 isolados clínicos de *Leishmania* spp. de um centro de referência para tratamento de leishmaniose tegumentar. A susceptibilidade *in vitro* à anfotericina B e à miltefosina dos isolados clínicos e cepas de *Leishmania* foi determinada nas formas promastigota e amastigota intracelular. Os resultados obtidos indicaram uma moderada variação na suscetibilidade a esses fármacos em ambas as formas do parasito, sendo a forma amastigota mais suscetível. Além disso, uma linhagem de *L. (L.) amazonensis* resistente à anfotericina B foi selecionada *in vitro*. Os ensaios *in vivo* foram realizados utilizando camundongos BALB/c infectados com a cepa selvagem de *L. (L.) amazonensis*, com a linhagem resistente e com um isolado clínico desta mesma espécie, proveniente de um paciente que não respondeu a esse fármaco. Os animais infectados com cada uma das três linhagens foram tratados com anfotericina B durante 20 dias por via intraperitoneal. Nas infecções com a cepa

selvagem, os animais tratados apresentaram redução significativa no tamanho da lesão e na carga parasitária de forma dose dependente. No entanto, os grupos de animais infectados com o isolado clínico ou com a linhagem resistente não apresentaram redução no tamanho da lesão, nem na carga parasitária. Estes resultados demonstraram que os animais infectados tanto com a linhagem resistente à anfotericina B, quanto com o isolado clínico já exposto ao fármaco na clínica, não responderam ao tratamento *in vivo* à anfotericina B. Estes achados podem contribuir para avaliar as limitações do uso de anfotericina B e da miltefosina no tratamento da leishmaniose tegumentar no Brasil.

## ABSTRACT

### **Investigation of susceptibility to Amphotericin B and Miltefosine in clinical isolates of *Leishmania* spp.: *in vitro* and *in vivo* studies**

Leishmaniasis is a neglected and endemic disease in at least 98 countries, caused by protozoa of the genus *Leishmania*. These protozoa are digenetic parasites and are transmitted through the bite of hematophagous insects known as sandflies. Although the disease has an eminently rural character, it has been expanding to medium and large urban areas and has become a growing public health problem in Brazil. Approximately 25,000 cases of tegumentary leishmaniasis and 3,000 new cases of visceral leishmaniasis are reported annually. Chemotherapy for leishmaniasis in Brazil is basically limited to the use of pentavalent antimonials, amphotericin B and pentamidine. These drugs have a variable clinical response, are costly, are administered parenterally, and have several side effects due to toxicity. Miltefosine was recently approved for the clinical treatment of tegumentary leishmaniasis in Brazil, a drug that has been used in the treatment of visceral leishmaniasis in Asia for nearly two decades. In this work, the *in vitro* susceptibility of amphotericin B and miltefosine in all endemic *Leishmania* species responsible for tegumentary leishmaniasis and visceral leishmaniasis in Brazil and in a panel of 14 clinical isolates of *Leishmania* spp. from a reference center for tegumentary leishmaniasis treatment was evaluated. The *in vitro* susceptibility to amphotericin B and miltefosine in clinical isolates and *Leishmania* strains was determined in the promastigote and intracellular amastigote forms. Results indicated a moderate variation in the susceptibility to these drugs in both forms of the parasite, with the amastigote form being more susceptible. Furthermore, a *L. (L.) amazonensis* resistant line to amphotericin B was selected *in vitro*. The *in vivo* assays were performed using BALB/c mice infected with the wild-type strain of *L. (L.) amazonensis*, the resistant line and a clinical isolate of the same species from a patient who did not respond to this drug. Animals infected with these three strains were treated with amphotericin B for 20 days intraperitoneally. For infections with the wild-type strain, treated animals showed a significant reduction in the size of the lesion and in the parasite burden in a dose-dependent manner. However, the groups of animals infected with the clinical isolate or with the resistant line did not show a

reduction in the size of the lesion, nor in the parasite burden in any of the groups treated with amphotericin B. These results demonstrated that both the amphotericin B-resistant line and the clinical isolate previously exposed to the drug in the clinic did not respond to the *in vivo* treatment of amphotericin B. These findings may contribute to assess the limitations of amphotericin B and of miltefosine for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formas do protozoário parasito do gênero *Leishmania*.
- Figura 2.** Distribuição por Estado brasileiro das principais espécies de leishmaniose e os vetores responsáveis pela transmissão do parasito.
- Figura 3.** Ciclo de vida do protozoário parasito do gênero *Leishmania*.
- Figura 4.** Suscetibilidade à MF na forma promastigota e amastigota intracelular das respectivas cepas e isolados clínicos de *Leishmania* spp.
- Figura 5.** Curva dose-resposta para determinação da citotoxicidade da MF em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos após incubação por 72 horas.
- Figura 6.** Porcentagem de infecção dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp. em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Na figura está representada a média e o desvio padrão.
- Figura 7.** Suscetibilidade à AmB na forma promastigota e amastigota intracelular das respectivas cepas e isolados clínicos de *Leishmania* spp.
- Figura 8.** Curva dose-resposta para determinação da citotoxicidade da AmB em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos após incubação por 72 horas.
- Figura 9.** Esquema de seleção gradual da linhagem resistente La AmB400 à AmB. Cada passagem da população de parasitos em cultura é indicada pelos círculos pretos.
- Figura 10.** Tratamento com AmB em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.
- Figura 11.** Análise histopatológica das lesões de camundongos infectados com a cepa M2269, a linhagem resistente La AmB400 ou o isolado clínico AAB.
- Figura 12.** Massa corporal média em gramas (g) dos grupos de animais tratados ou não tratados (controle), antes e após o tratamento com AmB (pré e pós-tratamento respectivamente).
- Figura 13.** Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c não infectados, infectados com a cepa M2269 e tratados com AmB (1, 5 ou 10 mg/kg/dia) durante 20 dias.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Propriedades químicas dos principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.

**Tabela 2.** Tratamento das leishmanioses segundo apresentação, dose, via de administração, eficácia e toxicidade.

**Tabela 3.** Lista dos isolados clínicos provenientes de pacientes com LT utilizados neste estudo.

**Tabela 4.** Suscetibilidade à MF *in vitro* dos isolados e das cepas de *Leishmania* spp.

**Tabela 5.** Suscetibilidade à AmB *in vitro* dos isolados e das cepas de *Leishmania* spp.

**Tabela 6.** Suscetibilidade à AmB *in vitro* da cepa M2269 (La M2269), da linhagem resistente La AmB400 (população) e dos respectivos clones.

**Tabela 7.** Suscetibilidade *in vitro* nas formas promastigota e amastigota intracelulares da cepa M2269, da linhagem resistente La AmB400 e do isolado clínico AAB aos fármacos utilizados na quimioterapia das leishmanioses.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AmB	Anfotericina B
AmB-L	Anfotericina B lipossomal
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica 50%
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva 50%
CE <sub>90</sub>	Concentração efetiva 90%
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética de Uso Animal
DE <sub>50</sub>	Dose efetiva 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Grama
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
GTP	Guanosina trifosfato
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>hsp70</i>	<i>Heat shock protein 70</i>
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
ITS	Espaçador interno transcrito
kDNA	DNA mitocondrial
kg	Quilograma
L	Litro
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LM	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MT	Transportador de miltefosina
MF	Miltefosina
mg	Miligrama

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
PEN	Pentamidina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNAse	Ribonuclease
SbV	Antimoniais pentavalentes
SbIII	Antimoniais trivalentes
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
U	Unidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1. As leishmanioses .....	18
1.2. Tratamento.....	24
1.2.1. Anfotericina B.....	28
1.2.2. Miltefosina .....	29
1.3. Resistência aos fármacos e falha do tratamento na leishmaniose .....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1 Cultivo dos isolados clínicos e das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	37
4.2 Fármacos .....	38
4.3 Suscetibilidade <i>in vitro</i> dos parasitos aos fármacos .....	38
4.3.1 Determinação da atividade dos fármacos contra promastigotas dos isolados clínicos e das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	38
4.3.2 Ensaio de citotoxicidade aos fármacos miltefosina e anfotericina B.....	39
4.3.3 Determinação da atividade dos fármacos contra amastigotas intracelulares dos isolados clínicos e das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	40
4.4 Seleção de parasitos resistentes à AmB.....	41
4.5 Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da AmB contra <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	41
4.5.1 Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real .....	42
4.5.2 Determinação dos níveis séricos de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e creatinina dos camundongos infectados e tratados com AmB .....	42
4.5.3 Análise histopatológica das lesões de animais infectados e tratados com AmB.....	43
4.6 Análise estatística .....	44
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
5.1 Determinação da atividade da MF contra promastigotas dos isolados clínicos e das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	45
5.2 Citotoxicidade <i>in vitro</i> da MF .....	48
5.3 Determinação da atividade da MF contra amastigotas intracelulares dos isolados clínicos e das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	49
5.4 Determinação da atividade da AmB contra promastigotas dos isolados clínicos e das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	51
5.5 Citotoxicidade <i>in vitro</i> da AmB.....	54
5.6 Determinação da atividade da AmB contra amastigotas intracelulares dos isolados clínicos e das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	55
5.7 Seleção de uma linhagem resistente à AmB .....	56
5.8 Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da AmB contra <i>L. (L.) amazonensis</i> em modelo experimental de LT .....	58
5.9 Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> da cepa M2269, da linhagem resistente à AmB e do isolado clínico AAB aos demais fármacos utilizados na quimioterapia das leishmanioses .....	65

<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>89</b>
9.1 Certificado CEUA/UNICAMP .....	89
9.2 Alteração de título em certificado CEUA/UNICAMP .....	90
9.3 Declaração de direitos autorais .....	92

## 1. INTRODUÇÃO

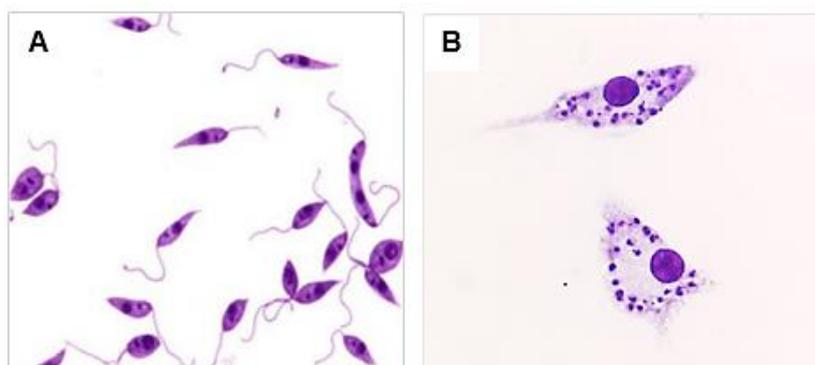
### 1.1. As leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas, negligenciadas e de evolução crônica, causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*. Este gênero pertence a ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae que agrupa organismos dotados de um único flagelo e que possuem organelas como os acidocalcissomos, glicossomos e cinetoplasto, organelas restritas a esse grupo (Uliana 2012). Os acidocalcissomos são organelas eletrondensas acídicas, ricas em pirofosfatase e polifosfatase, e atuam no controle do pH, manutenção de íons e pressão osmótica (Docampo et al. 2005). Os glicossomos são peroxissomos modificados, que atuam principalmente na glicólise, mas que também atuam na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, via da pentose-fosfato e na biossíntese de pirimidinas (Michels et al. 2006). O cinetoplasto possui moléculas circulares de DNA mitocondrial chamado de kDNA, e é formado por duas classes de moléculas circulares de diferentes tamanhos, denominados maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos são responsáveis por codificar RNAs ribossomais, enquanto que os minicírculos codificam pequenos RNAs guia (Schneider 2001, Uliana 2012).

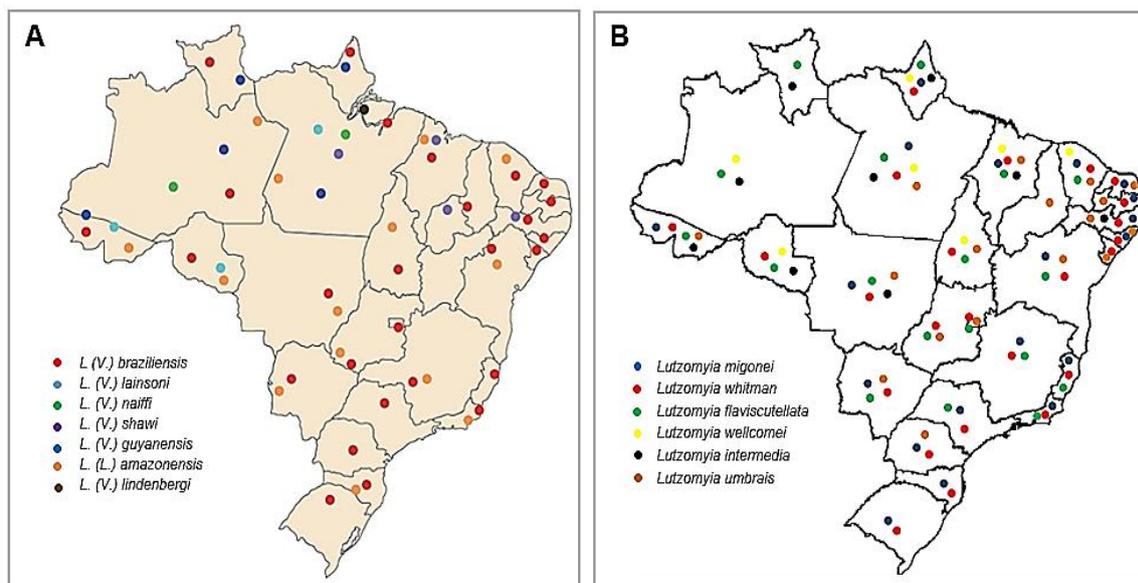
Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos digenéticos, caracterizados por possuírem duas formas distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota apresenta corpo celular alongado e fusiforme, com cinetoplasto localizado na região anterior do parasito, próximo ao bolso flagelar, e é encontrada no tubo digestório do inseto vetor flebotomíneo (Figura 1A). Enquanto que a forma amastigota é intracelular obrigatória e apresenta corpo celular ovóide ou esférico, com comprimento de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$  e largura 1,5 a 2  $\mu\text{m}$ . Nesta forma, o cinetoplasto em forma de bastão está associado a um flagelo rudimentar. A mesma é encontrada no interior de vacúolos parasitóforos de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente em macrófagos, além de neutrófilos e células dendríticas de hospedeiros mamíferos (Figura 1B) (Murray et al. 2005, Uliana 2012).

A transmissão da leishmaniose ocorre através picada de insetos dípteros hematófagos conhecidos como flebotomíneos, pertencentes à família

Psychodidae. Apenas as fêmeas se alimentam de sangue, sendo estas capazes de transmitir o parasito. Os flebotomíneos possuem hábitos noturnos, são silenciosos, pequenos (de dois a três milímetros), apresentam coloração castanho escura e corpo revestido por inúmeras cerdas. Esses vetores são adaptados para viver em ambientes úmidos, escuros e se alimentam de fontes naturais de açúcar. Os mesmos, apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientais, localizados predominantemente em regiões subtropicais e tropicais do mundo (Barral e Costa, 2011, Rey 2008, Killick-Kendrick 1999). Existem mais de 800 espécies de flebotomíneos conhecidas, mas apenas 30 delas podem transmitir a doença. Essas espécies pertencem ao gênero *Phlebotomus*, responsável pela transmissão na África, Ásia e Europa, e aos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* encontrados nas Américas (Maroli et al. 2013, Uliana 2012). No Brasil as principais espécies de flebotomíneos transmissores da Leishmaniose tegumentar (LT) são: *Lutzomyia migonei*, *Lu. whitmani*, *Lu. aviscutellata*, *Lu. wellcomei*, *Lu. intermedia* e *Lu. umbratilis* (Figura 2B), enquanto que o vetor *Lu. longipalpis* é a principal espécie transmissora da leishmaniose visceral (LV) (Ministério da Saúde, 2017, Marcondes e Rossi, 2013).



**Figura 1.** Formas do protozoário parasito do gênero *Leishmania*. **A.** Forma promastigota em meio de cultura. **B.** Forma amastigota no interior de macrófagos. Fonte: CDC, 2017 (Adaptado).

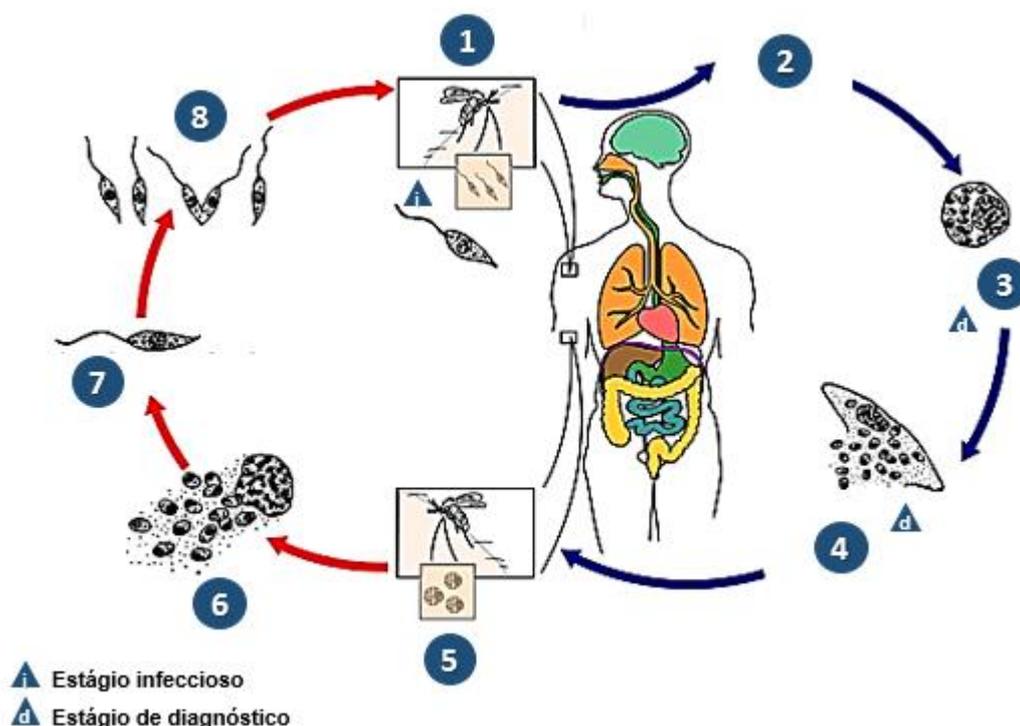


**Figura 2.** Distribuição por Estado brasileiro das principais espécies de *Leishmania* causadoras de LT **(A)** e os vetores responsáveis pela transmissão do parasito **(B)**. Fonte: Ministério da Saúde, 2017 (Adaptado).

Existem dois tipos de transmissão da leishmaniose em humanos, a transmissão zoonótica e a transmissão antroponótica. A transmissão zoonótica é aquela transmitida de animais reservatórios, como o cão no ciclo urbano e roedores e marsupiais no ciclo silvestre, para os vetores flebotomíneos e, na sequência, para seres humanos, sendo o homem um hospedeiro acidental. Enquanto que a transmissão antroponótica, é aquela transmitida de seres humanos para flebotomíneos e novamente para humanos, sendo o homem o reservatório do parasito (Alvar et al. 2012, Bern et al. 2008). No Brasil a forma mais comum de transmissão da leishmaniose é a transmissão zoonótica (Ministério da Saúde, 2017).

O protozoário do gênero *Leishmania*, possui um ciclo de vida heteróximo e a infecção no flebotomíneo inicia-se quando a fêmea realiza hematofagia no mamífero infectado e durante o repasto sanguíneo, juntamente com o sangue, ingere macrófagos contendo formas amastigotas do parasito (Figura 3). No trato digestório do inseto, os macrófagos se rompem liberando os amastigotas que diferenciam-se rapidamente em promastigotas procíclicos. Os promastigotas procíclicos sobrevivem ao meio extracelular e se multiplicam por divisão binária, nutrindo-se principalmente da glicose e prolina presentes no intestino do inseto. Quando os nutrientes presentes no tubo digestório do inseto cessam, os promastigotas procíclicos se diferenciam em promastigotas

metacíclicos, forma infectante e incapaz de se multiplicar. Os promastigotas metacíclicos migram de forma retrógrada até a porção anterior do esôfago do vetor. Durante novo repasto sanguíneo, os promastigotas metacíclicos são introduzidos no local da picada e dentro de quatro a oito horas, os parasitos são fagocitados por macrófagos e/ou células do SFM do hospedeiro mamífero. No interior do macrófago, dentro do vacúolo parasitóforo, os promastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas. As formas amastigotas resistem à ação dos lisossomos e multiplicam-se por divisão binária até que haja o rompimento da célula a qual se encontram. Neste momento, os amastigotas são liberados no meio extracelular, podendo ser novamente fagocitados por outros macrófagos ou alternativamente migrar para outros órgãos do hospedeiro (Uliana 2021, Neves et al. 2011). O curso da infecção é altamente variável, dependente da espécie de *Leishmania*, das características genéticas e da resposta imune do hospedeiro (Neves et al. 2011).



**Figura 3.** Ciclo de vida do protozoário parasito do gênero *Leishmania*. 1. O agente etiológico da leishmaniose é transmitido através da picada de um flebotomíneo infectado. Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos injetam promastigotas metacíclicos. 2. Os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos e por outras células do SFM. 3. Nessas células, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas. 4. Os amastigotas multiplicam-se até que haja o rompimento da membrana macrófago, liberando-os e infectando novas células

do SFM. **5-6.** Durante novo repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, os flebotomíneos são infectados pela ingestão de macrófagos infectados com amastigotas. **7.** No intestino médio dos flebotomíneos, os amastigotas diferenciam-se em promastigotas. **8.** Estes multiplicam, desenvolvem e migram para a região anterior do esôfago. Fonte: CDC, 2017 (Adaptado).

As espécies do gênero *Leishmania* são classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Uliana 2012, Pace 2014). No subgênero *Leishmania*, as formas promastigotas se desenvolvem de forma restrita na porção anterior do tubo digestório do inseto vetor, enquanto que no subgênero *Viannia*, os promastigotas se estabelecem inicialmente na porção posterior do trato digestório do inseto e durante seu desenvolvimento migram para as porções anteriores do mesmo. Parasitos do subgênero *Leishmania* são encontrados nas Américas, Europa, Ásia e África, já os parasitos do subgênero *Viannia*, estão presentes apenas nas Américas (Ashford 2000, Uliana 2012, Lainson et al. 1987, Pace 2014). Existem 30 espécies de *Leishmania* e cerca de 20 destas são consideradas patogênicas para o homem, das quais oito são endêmicas no Brasil: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, sendo as sete primeiras causadoras da LT (Figura 2A) e a última causadora da LV.

A LT pode apresentar quatro formas clínicas distintas: a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose mucocutânea (LM), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) ou a leishmaniose cutânea disseminada (LD). A LCL é a forma mais comum da LT, caracterizada por uma pápula eritematosa que evolui para uma úlcera geralmente indolor gerada no local da picada do vetor. A mesma possui tendência à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento; no entanto, pode evoluir para infecções secundárias, além de deixar cicatrizes permanentes, sendo causada predominantemente por *L. (V.) braziliensis*, seguida de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. A LM é considerada uma lesão secundária da LCL e atinge a orofaringe, com comprometimento do septo cartilaginoso e áreas associadas, produzindo lesões destrutivas na face e é restrita apenas aos países da América Latina, causada por *L. (V.) braziliensis*. Já a LCD é menos comum que as demais e inicia-se de forma insidiosa, com lesão única que progride lentamente com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas em todo o corpo, causada por *L. (L.) amazonensis*.

Finalmente, a LD é observada em até 2% dos casos e é majoritariamente causada por *L. (V.) braziliensis*. Apesar das lesões estarem presentes em várias regiões do corpo, como no caso da LCD, os indivíduos com LD podem apresentar múltiplas lesões pelo todo o corpo que podem ser ulceradas, papulosas, crostosas ou nodulares (Desjeux 1996, Ahluwalia et al. 2004, Ministério da Saúde, 2017). No Brasil, a maioria dos casos de LT é causada por *L. (V.) braziliensis*, seguida por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (Figura 2A). Os casos de LT causados por *L. (V.) braziliensis* estão distribuídos em todo o território nacional e os quadros mais comuns são de LCL, LM e LCD. Em menor quantidade estão os casos de LT causados por *L. (L.) amazonensis*, distribuídos pelas florestas da Amazônia Legal, ampliando-se para o Centro-Oeste, Nordeste, Sul e Sudeste e são associados a quadros de LCL e LCD. Alguns casos de infecções por *L. (V.) guyanensis* foram reportados na Região Norte, associados a quadros de LCL, casos esses considerados de difícil tratamento. As demais espécies causadoras da LT no Brasil são menos prevalentes e estão distribuídas principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país: *L. (V.) lainsoni* é encontrada nos Estados do Acre, Pará e Rondônia; *L. (V.) naiffi* nos Estados do Amazonas e Pará; *L. (V.) lindenbergi* no Estado do Pará e *L. (V.) shawi* nos Estados do Pará e Maranhão (Figura 2A) (Ministério da Saúde, 2014, Ministério da Saúde, 2017).

Além das formas clínicas mencionadas, a LV causada por *L. (L.) infantum*, é considerada a forma mais grave das leishmanioses e pode levar o paciente ao óbito em 95% dos casos, se esta não for tratada adequadamente (Murray et al. 2005, Harhay et al. 2011). Apesar da LV ser a forma mais grave das leishmanioses, os casos de LT são os mais prevalentes no mundo, com uma estimativa anual de 0,7 a 1,5 milhão de novos casos, enquanto que o número de casos de LV podem atingir até 300 mil novos casos por ano (WHO, 2016, Alvar et al. 2012). No Brasil, são notificados anualmente cerca de 25 mil novos casos de LT e 3 mil novos casos de LV (Alvar et al. 2012, Ministério da Saúde, 2017). A leishmaniose, apesar de ser uma doença eminentemente rural, encontra-se em expansão para regiões urbanas de médio a grande porte, tornando-se um crescente problema de saúde pública no Brasil (Jeronimo et al. 1994, Jeronimo et al. 2004, Harhay et al. 2011). O aumento dos casos estão ligados a vários fatores, como transformações ambientais, eco-epidemiológicos e sócio-

econômicos (Desjeux 1996). Estas transformações têm sido provocadas por desmatamento de florestas nativas, intensos processos migratórios humanos, crescimento desordenado das cidades, associado às baixas condições econômicas e sociais da população (Harhay et al. 2011).

A diferença da infecção da LT para a LV, de forma geral, é que na LT o parasito infecta macrófagos presentes na derme e se multiplicam continuamente nesta região, enquanto que na LV, as amastigotas liberadas disseminam-se pela circulação sanguínea até infectarem células do SFM do fígado, baço, linfonodos e medula óssea, ou seja, se proliferam nos órgãos linfóides do hospedeiro mamífero (Steverding 2017).

A coinfeção da leishmaniose com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é considerada emergente e de alta gravidade em várias regiões do mundo. No Brasil, sua distribuição acompanha grupos de riscos para a transmissão do vírus HIV, com prevalência maior em indivíduos jovens do sexo masculino (Rabello et al. 2003). A coinfeção pode levar a um aumento na taxa de letalidade e no número de recaídas da leishmaniose, devido ao agravamento da doença, causado pela imunossupressão (Molina et al. 2003, Rabello et al. 2003).

## **1.2. Tratamento**

No Brasil, o tratamento das leishmanioses é limitado a basicamente quatro medicamentos: os antimoniais pentavalentes (SbV), anfotericina B (AmB), anfotericina B lipossomal (AmB-L) e o isetionato de pentamidina (PEN) (Tabela 1 e 2). Além do número restrito de medicamentos, estes ainda apresentam várias limitações de uso, referente a toxicidade, reações adversas graves e difícil aceitação dos pacientes por serem administrados por via parenteral, necessitando de hospitalização para a efetivação do tratamento (Croft e Olliaro 2011, Uliana et al. 2017).

O SbV utilizado no Brasil é o antimoniato de N-metil-glucamina que foi introduzido como quimioterápico na década de 40, sendo ainda o principal medicamento utilizado no tratamento das leishmanioses (LT e LV) (Uliana 2012). O antimoniato de N-metilglucamina possui uma eficácia variável de 35 a 95% tanto para LT, quanto para LV (Zulfiqar et al. 2017) e é obtido sinteticamente a

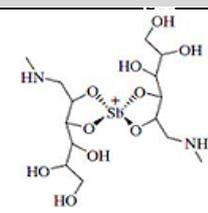
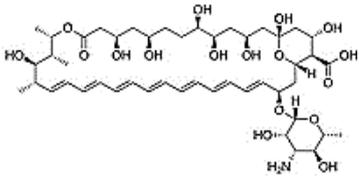
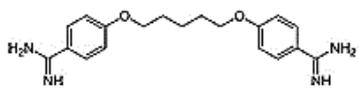
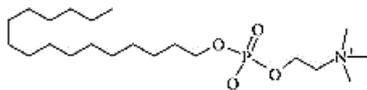
partir do ácido antimônico e da N-metilglucamina, sendo considerado um pró-fármaco (Ponte-Sucre et al. 2017). Após administração parenteral, o SbV é convertido na sua forma trivalente (SbIII), sendo esta forma responsável pela atividade antiparasitária (Roberts et al. 1998, Ponte-Sucre et al. 2017). Tanto o SbIII como o SbV são responsáveis por mediar a fragmentação do DNA do parasito, indicando que os antimônios conduzem o parasito a morte celular, similar ao processo de apoptose, além de inibirem a glicólise, a oxidação dos ácidos graxos, e a produção de ATP (Balaña-Fouce et al. 1998, Lee, Berthlet et al. 2002, Croft et al. 2006).

O esquema terapêutico do SbV preconizado pelo Ministério da Saúde para a LV são de doses de 20 mg/Sb<sup>V</sup>/kg/dia por via endovenosa ou intramuscular, durante 30 dias consecutivos e para a LT é dependente da forma clínica que o paciente apresenta. Para a LCL, recomenda-se de 10 a 20 mg/Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 20 dias e para LCD e LM, 20 mg/Sb<sup>V</sup>/kg/dia durante 20 e 30 dias, respectivamente, como demonstrado na Tabela 2. Os efeitos adversos mais graves são dependentes da dose e tempo de uso, recorrentes nas doses de 20 mg/Sb<sup>V</sup>/kg/dia, quando o SbV pode atingir seu limiar de toxicidade, ocasionando alterações cardíacas, pancreáticas, hepáticas ou renais, com frequentes recidivas. Esses parâmetros indicam a necessidade de modificação ou interrupção do tratamento. Além disso, o SbV é contraindicado em pacientes acima de 50 anos, gestantes, hipersensíveis aos constituintes da fórmula ou mesmo pacientes com alguma comorbidade associada aos efeitos adversos citados (Ministério da Saúde, 2009, Ministério da Saúde, 2017, Zulfiqar et al. 2017).

A PEN é um fármaco pertencente às diamidinas aromáticas e seu uso é feito em casos de insucesso ao tratamento convencional pelo SbV. A alta toxicidade deste fármaco é o fator limitante para seu uso e está associada a hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade e hipotensão. Além disso, sua eficácia varia de 36 a 96% para as formas cutâneas e visceral, com uma dosagem de 3 a 4 mg/kg/dia por 4 dias (Tabela 2). Outros inconvenientes, como problemas locais, devido a injeções dolorosas e abscessos ou mesmo gerais, como náuseas e dores abdominais, têm colocado este medicamento como última opção para o tratamento das leishmanioses. Quanto ao mecanismo de ação, sabe-se que a PEN interfere no transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos

ácidos nucleicos e pode também, ligar-se ao DNA do cinetoplasto do parasito (de Paula, et al. 2003, Zulfiqar et al. 2017).

**Tabela 1.** Propriedades químicas dos principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.

Antimonial pentavalente		
Propriedades		Estrutura molecular
Peso Molecular	365,98 g/mol	
Fórmula molecular	$C_7H_{17}NO_5 \cdot HSbO_3$	
Anfotericina B		
Propriedades		Estrutura molecular
Peso Molecular	924,079 g/mol	
Fórmula molecular	$C_{47}H_{73}NO_{17}$	
Pentamidina		
Propriedades		Estrutura molecular
Peso Molecular	340,41 g/mol	
Fórmula molecular	$C_{19}H_{24}N_4O_2$	
Miltefosina		
Propriedades		Estrutura molecular
Peso Molecular	407,6 g/mol	
Fórmula molecular	$C_{21}H_{46}NO_4P$	

Fonte: Van Bocxlaer e Croft 2021, Zulfiqar et al. 2017.

**Tabela 2.** Tratamento das leishmanioses segundo apresentação, dose, via de administração, eficácia e toxicidade.

<b>Antimonial pentavalente</b>	
<b>Apresentação</b>	Ampolas contendo 81 mg/mL de SbV.
<b>Dose e via de aplicação</b>	LV: 20 mg/Sb <sup>V</sup> /kg/dia por via intramuscular ou endovenosa, uma vez ao dia durante 30 dias, com dose máxima de 3 ampolas ao dia.
	LT: O esquema terapêutico é recomendado para as formas clínicas abaixo:
	LCL: 10 a 20 mg/Sb <sup>V</sup> /kg/dia durante 20 dias.
	LD: 20 mg/Sb <sup>V</sup> /kg/dia durante 20 dias.
LM: 20 mg/Sb <sup>V</sup> /kg/dia durante 30 dias.	
<b>Eficácia</b>	35 a 95%.
<b>Toxicidade</b>	Cardiotoxicidade grave, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e pancreatite.
<b>Anfotericina B</b>	
<b>Apresentação</b>	Frasco contendo 50 mg de desoxicolato sódico de AmB liofilizada.
<b>Dose e via de aplicação</b>	LV: 1 mg/kg/dia por infusão venosa de 14 a 20 dias, com dose máxima diária de 50 mg.
	LT: 1 mg/kg/dia diariamente ou em dias alternados, com dose máxima diária de 50 mg, até atingir a dose máxima abaixo:
	Para LCL: 1 a 1,5 g e para LM: 2,5 a 3 g.
<b>Eficácia</b>	90%.
<b>Toxicidade</b>	Nefrotoxicidade grave, tromboflebite e hipocalcemia.
<b>Anfotericina B lipossomal</b>	
<b>Apresentação</b>	Frasco/ampola contendo 50 mg de AmB-L liofilizada.
<b>Dose e via de aplicação</b>	LV: 3 mg/kg/dia, durante 7 dias ou 4 mg/kg/dia, durante 5 dias por infusão venosa, em uma dose única.
	LT: 1 a 4 mg/kg/dia diariamente por infusão venosa, em dose única, até atingir a dose máxima abaixo:
	Para LCL: 1 a 1,5 g e para LM: 2,5 a 3 g.
<b>Eficácia</b>	>96%.
<b>Toxicidade</b>	Nefrotoxicidade leve, calafrios e febre durante a infusão.
<b>Pentamidina</b>	
<b>Apresentação</b>	Frasco/ampola com 300 mg de isetonato de PEN.
<b>Dose e via de aplicação</b>	Para LV e LT: 3 a 4 mg/kg/dia, em dias alternados, com dose máxima diária de 300 mg, por via intramuscular ou endovenosa lenta, durante 4 dias.
<b>Eficácia</b>	36 a 96%.
<b>Toxicidade</b>	Hiperglicemia grave, hipotensão, taquicardia e miocardite.
<b>Miltefosina</b>	
<b>Apresentação</b>	Cápsulas nas apresentações de 10mg e 50mg de MF.
<b>Dose e via de aplicação</b>	Para LV e LT: 2 a 2,5 mg/kg/dia, com dose máxima diária de 150 mg via oral, durante 28 dias.
<b>Eficácia</b>	60 a 94%.
<b>Toxicidade</b>	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade.

Fonte: Ministério da Saúde, 2009, Ministério da Saúde, 2017, Zulfiqar et al. 2017, Carnielli et al. 2019.

### 1.2.1. Anfotericina B

A AmB e sua forma lipossomal (AmB-L), são fármacos de segunda linha no tratamento das leishmanioses no Brasil e são utilizados quando não se obtém resposta terapêutica ao uso do SbV, ou em casos de coinfeção por HIV (Léonard e Gerber 1996, Croft et al. 2006, Uliana et al. 2017, Ministério da Saúde, 2017). A AmB-L, pode ainda ser indicada como tratamento de primeira escolha em quatro grupos prioritários: Paciente acima de 50 anos; com insuficiência hepática, renal ou cardíaca de qualquer faixa etária; transplantados hepáticos, renais ou cardíacos, bem como gestantes (Ministério da Saúde, 2017). A AmB é um antibiótico produzido por *Streptomyces nodosus* e foi descoberta em 1953 (Donovick et al. 1955, Stiller et al. 1955). Seu mecanismo de ação baseia-se na interação específica com ergosterol, formando poros na membrana lipídica do parasito, alterando a permeabilidade a íons e metabólitos e levando conseqüentemente a morte celular do parasito (Brajtburg e Bolard 1996, Ramos et al. 1996, Uliana et al. 2017).

O esquema terapêutico da AmB preconizado pelo Ministério da Saúde para LV e para LT são doses de 1 mg/kg/dia por infusão venosa durante 14 a 20 dias consecutivos, com dose máxima diária de 50 mg, obtendo-se eficácia em 90% dos casos (Tabela 1 e 2). No caso da administração da AmB-L, para LV, são indicados doses de 3 mg/kg/dia por 7 dias ou 4 mg/kg/dia durante 5 dias, ambas em infusão venosa em uma dose única diária. Já para LT, são indicadas doses de 1 a 4 mg/kg/dia em dose única, com eficácia >96% (Tabela 2) (Ministério da Saúde, 2009, Ministério da Saúde, 2017, Zulfiqar et al. 2017).

As reações adversas agudas e crônicas da AmB ocorrem pelas administrações repetidas, sempre associadas a um grau de disfunção renal que varia de paciente para paciente em função da dose total. As manifestações agudas que ocorrem frequentemente envolvem febre, náusea, vômitos, tremores, calafrios e recorrentes dores de cabeça. Já as manifestações crônicas englobam alterações cardiovasculares, disfunção renal, diminuição de magnésio e potássio, além de ocasionar anemia, leucopenia e trombocitopenia no paciente (Filippin 2006, Ministério da Saúde, 2017). No caso da AmB-L, este fármaco é significativamente mais tolerado que a AmB convencional, pois o mesmo atua especificamente sobre as células alvo, diminuindo os efeitos colaterais e

atingindo maior eficácia terapêutica (Janknegt et al. 1992, Adler-Moore et al. 2016). Vários estudos foram realizados comparando as reações agudas causadas pela AmB convencional e pela AmB-L, dos quais a AmB-L apresentou redução na incidência de reações agudas associadas a infusão e nefrotoxicidade, além da possibilidade de ser indicada em pacientes que já possuam dano renal ou que estejam em uso concomitante de medicação com efeito nefrotóxico (Wong-Beringer et al. 1998, Stone et al. 2016).

Devido aos problemas relatados na quimioterapia das leishmanioses no Brasil, é necessário avaliar fármacos alternativos com melhor eficácia para o tratamento da doença, bem como avaliar as limitações dos fármacos já em uso. A miltefosina (MF) e a paromomicina são dois fármacos que vêm sendo utilizados como alternativa no tratamento da LV na Ásia (Croft e Olliaro 2011). Ambos os medicamentos demonstraram resultados bastante satisfatórios no tratamento da LV, apresentando taxas de cura de 90% na Índia, Nepal e Bangladesh (Sundar et al. 2006, Sundar et al. 2007, Jamil et al. 2015).

### **1.2.2. Miltefosina**

A MF, também conhecida como hexadecilfosfocolina, é um análogo da fosfatidilcolina e foi desenvolvida inicialmente como composto antitumoral e atualmente constitui o único tratamento oral disponível para leishmaniose. No Brasil, a MF já vem sendo utilizada desde 2007, para o tratamento de cães com LV (Milteforan®, Virbac). Recentemente a MF foi aprovada para o tratamento clínico da LT (SUS, 2018). No sudeste asiático, a MF já vem sendo utilizada no tratamento de pacientes com LV, apresentando resultados bastante promissores, com taxas de cura maiores que 90% e sendo considerada como um dos fármacos de escolha para o tratamento da LV naquela região (Bhattacharya et al. 2004, Sundar et al. 2006). Os efeitos adversos mais comuns da MF são vômitos, diarreia e elevação transitória das enzimas hepáticas. Seu uso está associado a teratogenicidade e efeitos colaterais gastrointestinais (Sundar et al. 2006, Ministério da Saúde, 2009, Ministério da Saúde, 2017, Zulfiqar et al. 2017).

O mecanismo anti-*Leishmania* da MF ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que o fármaco interfere na biossíntese de fosfolipídios e

esteróis (Barratt et al. 2009). Estudos indicam que a MF inibe a citocromo C oxidase, induz a despolarização mitocondrial e diminui os níveis celulares de ATP, resultando em um efeito semelhante à apoptose no parasito (Paris et al. 2004, Verma e Dey 2004, Rakotomanga et al. 2005, Dorlo et al. 2012). A captação de MF pelo parasito se dá por uma maquinaria de translocação que inclui uma ATPase do tipo P denominado transportador de miltefosina (MT) e que é responsável pelo transporte de fosfolípídeos através da membrana plasmática do parasito. Sua função depende ainda da subunidade do MT, a proteína LRos3, que é essencial para a entrada e suscetibilidade à MF (Perez-Victoria et al. 2006).

O esquema terapêutico da MF para o tratamento das leishmanioses constitui-se de doses de 2 a 2,5 mg/kg/dia via oral, com dose máxima diária de 150 mg, durante 28 dias consecutivos (Tabela 2). Contudo, após uma década da implementação do uso da MF na Índia e no Nepal, foi notado um decréscimo de sua eficácia, com taxas de 10 a 20% de recidivas após um ano de tratamento. Neste caso, a diminuição da eficácia da MF não está relacionada à resistência adquirida pelo parasito, pois parasitos recuperados de pacientes não apresentaram diferenças na suscetibilidade *in vitro* à MF quando comparados com os isolados dos pacientes curados. Sugere-se que a falha ao tratamento esteja relacionada na maioria das vezes a fatores intrínsecos do hospedeiro (Rijal et al. 2013, Sundar et al. 2012). Posteriormente, foi observado uma redução da atividade *in vitro* da MF em dois isolados de *L. (L.) donovani* provenientes da Índia, quando comparados com a cepa selvagem desta espécie. Isso também ocorreu em isolados brasileiros de *L. (L.) infantum* provenientes de pacientes que não responderam ao tratamento com MF (Rijal et al. 2013, Carnielli et al. 2019). Além disso, no ano de 2016 foi reportado um isolado de *L. (L.) infantum* de um paciente coinfestado com o vírus HIV que também não respondeu ao tratamento, indicando uma diminuição gradual na suscetibilidade à MF (Mondelaers et al. 2018, Uliana et al. 2017). Uma alternativa adotada na Índia é a terapia combinada em casos de resistência clínica, associando uma única dose da AmB-L com MF ou uma única dose da AmB-L com paromomicina. A terapia combinada apresentou satisfatórios resultados com solução a curto prazo e com alta eficácia terapêutica (Alvaret al. 2006, Van Griensven et al. 2010).

No Brasil, uma eficácia de cerca de 60% foi observada em pacientes com LV de duas áreas endêmicas (Teresina, PI e Montes Claros, MG), com taxas de falha de tratamento em pacientes pediátricos e adultos de 52,2% e 26,3% respectivamente (Carnielli et al. 2019). Para a LT, foram realizados somente dois estudos clínicos com à MF no Brasil. Estes estudos apresentaram uma eficácia de cerca de 70% em pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* ou *L. (V.) guyanensis*, ambos com eficácia superior ao tratamento convencional do SbV (Machado et al. 2010, Chrusciak-Talhari et al. 2011).

### **1.3. Resistência aos fármacos e falha do tratamento na leishmaniose**

O tratamento é um fator fundamental para o controle da leishmaniose no Brasil e no mundo. No entanto, a falha ao tratamento e a resistência aos medicamentos, são um problema crescente e que causam grande impacto na clínica. Compreender como isso ocorre é de extrema importância para amenizar os danos e riscos ocasionados pelos mesmos, além de ser fundamental para a identificação de novos alvos e estratégias para a quimioterapia das leishmanioses.

A falha ao tratamento, muitas vezes está relacionada a resistência aos medicamentos, mas também pode estar relacionada ao hospedeiro, bem como a fatores inerentes aos parasitos (Ponte-Sucre et al. 2017). Hospedeiros portadores de imunodeficiência, como no caso de paciente infectados pelo vírus HIV, não possuem uma resposta imune efetiva e devido a isso, são dificilmente curados. Além disso, uma variação natural na resposta imunológica do hospedeiro ou a virulência intrínseca do parasito podem também influenciar a efetividade do fármaco (Alvar et al. 2008, Vanaerschot et al. 2014). As espécies do parasito do subgênero *Viannia* podem possuir ainda uma infecção pelo vírus LRV1 de RNA de cadeia dupla e que pode aumentar o risco de falha do tratamento, além de poder desencadear uma resposta imunológica distinta no hospedeiro (Vanaerschot et al. 2014, Adai et al. 2016). O insucesso do tratamento também pode ocorrer em casos clínicos similares, que respondem a uma dada terapia em alguns pacientes, mas que falham em outros quando a espécie de *Leishmania* é diferente (Romero et al. 2001). Além disso, existem fatores relacionados ao fármaco, devido uma dosagem inapropriada ocasionada

por erros profissionais ou mesmo automedicação por parte do paciente, que podem levar a uma dosagem menor ou maior que o indicado, efeitos colaterais indesejados e também induzir a seleção de parasitos resistentes a esses fármacos (Dorlo et al. 2014, Ponte-Sucre, 2013, Ponte-Sucre et al. 2017).

O parasito adquire resistência aos medicamentos devido ao tempo de exposição ao fármaco, que conseqüentemente seleciona potenciais mutações e/ou alterações genéticas no parasito que são responsáveis por diminuir a resposta a um determinado medicamento (Ponte-Sucre et al. 2017). No caso dos SbV, medicamentos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose no Brasil, estes devem ser reduzidos a sua forma trivalente (SbIII) para desencadear atividade e uma parte dessa redução ocorre dentro do macrófago. Posteriormente, a entrada no parasito do SbIII se dá pela AQP1 (Aquagliceroporina 1). Foi observado que o acúmulo de antimônio é menor em parasitos resistentes e a superexpressão de AQP1 leva a hipersensibilidade a SbIII, enquanto que a deleção gênica leva a resistência aos SbV (Brochu et al. 2003, Mandal et al. 2010, Marquis et al. 2005). A resistência ao antimônio também foi observada quando há diminuição da redução de SbV em SbIII, diminuição da internalização do fármaco e aumento dos níveis intracelulares de tripanotona e outros tióis que provêm o aumento do potencial redox do parasito (Croft et al. 2006, Maltezou 2010). A superexpressão dos transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) envolvidos no transporte dependente de ATP também tem mostrado influenciar no efluxo de fármacos e pode ter algum papel na resistência aos antimoniais (El Fadili, 2005). Um exemplo é a MRPA, um transportador ABC de membrana intracelular que ao ser superexpresso confere resistência aos antimoniais ao sequestrar tiol e conjugados metálicos em vesículas intracelulares. Outros transportadores, como ABCI4 e ABCG2 também podem contribuir com a resistência ao SbIII em *Leishmania* (Manzano et al. 2013, Perea et al. 2016).

Para PEN, foi observado em estudos *in vitro* que parasitos superexpressores da proteína PRP1, um transportador ABC, são resistentes à PEN (Coelho et al. 2003, Coelho et al. 2007, Kaur e Rajput 2014). Esse transportador também conferiu resistência cruzada ao SbIII (Coelho et al. 2003, Ashutosh et al. 2007). A resistência à PEN em *Leishmania* também pode estar relacionada a alterações na concentração de arginina e poliaminas na célula,

além de cepas resistentes não acumularem o fármaco dentro da mitocôndria e a fração citosólica do fármaco ser eliminada para fora da célula (Kaur e Rajput 2014).

O principal mecanismo de resistência à MF envolve mutações na maquinaria de translocação mediada pelo MT que é responsável pela translocação de fosfolípídeos (Pérez-Victoria et al. 2003). Foi descrito que a deleção do gene que codifica o MT leva a um fenótipo de resistência à MF (Pérez-Victoria et al. 2003, Coelho et al. 2012, Coelho et al. 2014). Além disso, a inativação do complexo (MT e Ros3) também gera um fenótipo de resistência, enquanto que a superexpressão dos mesmos, resulta em um maior acúmulo do fármaco, ocasionando um aumento da sensibilidade à MF (Pérez-Victoria et al. 2003, Perez-Victoria et al. 2006, Sanchez-Canete et al. 2009).

A resistência à MF também pode estar relacionada com o efluxo do fármaco mediado por transportadores ABC. Os transportadores ABCA1, ABCA2 e MDR1 podem estar associados com o aumento da resistência, devido ao aumento do efluxo de fármaco através da membrana e a redução intracelular do mesmo (Perez-Victoria et al. 2002, Pérez-Victoria et al. 2006). Outros fatores que também podem estar relacionados com o fenótipo de resistência à MF são alterações nos níveis de insaturação de ácidos graxos e redução de ergosterol, bem como a capacidade de tolerar espécies reativas de oxigênio (Rakotomanga et al. 2005, Das et al. 2013).

Apesar da utilização da AmB há mais de 70 anos, relatos de resistência clínica são raros e pouco descritos. Os primeiros relatos de falha terapêutica na clínica surgiram na Índia, com um paciente infectado com *L. (L.) donovani* resistente à AmB (Purkait et al. 2012). Na França e Suíça foram descritos casos de ausência de resposta à AmB em pacientes imunossuprimidos (Morizot et al. 2016, Eichenberger et al. 2017). Contudo, a resistência à AmB já foi induzida *in vitro* em *L. (L.) donovani* e em *L. (L.) mexicana* (Mbongo et al. 1998, Mwenechanya et al. 2017). Os parasitos resistentes possuem alterações de afinidade de ligação com o fármaco, devido a uma composição alterada de esteróis na membrana plasmática (Uliana et al. 2017, Singh et al. 2001, Mbongo et al. 1998, Mwenechanya et al. 2017). Além disso, é importante ressaltar que a utilização da AmB na clínica e sua meia-vida plasmática elevada aumentam a possibilidade de seleção de parasitos resistentes a esse medicamento, sendo

portanto necessários novos estudos nesta área (Croft et al. 2006).

Finalmente, alguns estudos já demonstraram variações na suscetibilidade *in vitro* à AmB e também à MF, havendo variações entre espécies e isolados clínicos do parasito (Escobar et al. 2002, Croft et al. 2006, Sánchez-Cañete et al. 2009, Prajapati et al. 2012). Pouco se sabe, no entanto, se existe ou não correlação da suscetibilidade *in vitro* com a resposta ao tratamento *in vivo*, particularmente para a AmB.

Neste estudo, foi investigada a atividade *in vitro* da MF e da AmB em espécies responsáveis pela LT no Brasil e da AmB *in vivo* em um isolado clínico de *L. (L.) amazonensis* com suscetibilidade diferencial *in vitro* e de uma linhagem resistente selecionada *in vitro*. A suscetibilidade *in vitro* a esses fármacos foi avaliada em 14 isolados clínicos, previamente tipados, representantes das principais espécies causadoras da LT no Brasil.

## 2. JUSTIFICATIVA

Levando em consideração a alta eficácia da MF no tratamento da LV na Ásia e da AmB no tratamento de ambas as formas clínicas das leishmanioses, foi proposto neste projeto investigar a atividade da MF (*in vitro*) e da AmB (*in vitro* e *in vivo*) em espécies responsáveis pela LT no Brasil. Foram avaliadas 11 cepas, representantes de 8 espécies endêmicas no Brasil, além de um painel de 14 isolados clínicos, provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), além de um isolado de paciente com LCD coinfectado com o vírus HIV e já exposto ao tratamento convencional desta parasitose (Corrêa Soares, Silva et al. 2020). Os dados obtidos neste estudo permitiriam avaliar se existe variação de sensibilidade entre espécies e isolados clínicos do parasito e se a possível variabilidade na suscetibilidade a esses fármacos pode afetar a resposta ao tratamento clínico, fornecendo dados para melhores condutas de tratamento das leishmanioses.

### 3. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo avaliar a atividade da MF (*in vitro*) e da AmB (*in vitro* e *in vivo*) em isolados e cepas das principais espécies causadoras da LT no Brasil. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* à MF e à AmB nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de cepas de 8 espécies responsáveis pela LT no Brasil, além de 14 isolados clínicos;
- Selecionar uma linhagem resistente *in vitro* à AmB de *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar a eficácia *in vivo* da AmB, utilizando o modelo murino de infecção por *L. (L.) amazonensis* visando a avaliação da eficácia do tratamento frente à cepa selvagem, à linhagem resistente e ao isolado clínico que apresentou susceptibilidade diferencial *in vitro* a esse fármaco.

## 4. MATERIAL E METÓDOS

### 4.1 Cultivo dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp.

Foram utilizadas as cepas de *L. (L.) amazonensis* [(MHOM/BR/1973/M2269), (IFLA/BR/1967/PH8), LV79 (MPRO/BR/1972/M1841)], *L. (V.) braziliensis* [(MHOM/BR/94/H3227), (MHOM/BR/1975/M2903)], *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.) lindenbergi* (MHOM/BR/96/M15732), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/79/M5533), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) e *L. (L.) infatum* (MHOM/BR/1972/LD), representantes das principais espécies endêmicas no Brasil e responsáveis pela LT e LV respectivamente. Os ensaios de suscetibilidade foram realizados nas cepas das respectivas espécies e em 13 isolados provenientes de pacientes com LT do IIER através de colaboração com o Prof. Jose A. Lindoso, além de um isolado de um paciente com LCD coinfestado com o vírus HIV, cedido gentilmente pela Profa. Dra. Mayara I. S. Lima da Universidade Federal do Maranhão (Tabela 3). Estes 14 isolados já haviam sido previamente tipados por PCR-RFLP do gene *hsp70* e através do sequenciamento do ITS (Cosser et al. 2020, Espada et al. 2021). As espécies dos isolados clínicos estão indicadas na Tabela 3 e correspondem as espécies mais prevalentes de LT no Brasil. As formas promastigotas dos isolados e cepas foram cultivadas em meio M199 (Sigma-Aldrich), complementado com 40 mM de HEPES em pH 7,4, 0,1 mM de adenina, 0,005% de hemina, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino inativado e estéril e mantidos em estufa a 25°C. O meio M199 foi ainda suplementado com 2% de urina masculina humana estéril, para as culturas de promastigotas do subgênero *Viannia* (Howard et al. 1991). Os macrófagos derivados de medula óssea residentes em camundongos fêmeas BALB/c foram cultivados em meio RPMI-1640, complementado com 10% de soro fetal bovino inativado e estéril, 0,1 M de piruvato de sódio, e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina e mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Zamboni e Rabinovitch 2003). Os animais foram adquiridos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP e os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da UNICAMP, protocolo de número 5571-1/2020 (Anexo 1).

**Tabela 3.** Lista dos isolados clínicos provenientes de pacientes com LT utilizados neste estudo.

	<b>Código do Isolado</b>	<b>Identificação do paciente (iniciais)</b>	<b>Forma clínica</b>	<b>Estado de origem</b>	<b>Espécie do isolado</b>
1	ER004	PJTG	LCL	Pará	<i>L. (V.) braziliensis</i>
2	ER010	NPC	LM	Bahia	<i>L. (V.) braziliensis</i>
3	ER054	KJM	LCL	São Paulo	<i>L. (L.) amazonensis</i>
4	ER117	OFS	LM	Bahia	<i>L. (L.) amazonensis</i>
5	ER118	JMS	LCL	Mato Grosso	<i>L. (L.) amazonensis</i>
6	ER114	NJS	LCL	Minas Gerais	<i>L. (V.) braziliensis</i>
7	ER192	RSB	LM	Pará	<i>L. (V.) guyanensis</i>
8	ER256	MMA	LCL	-	<i>L. (L.) amazonensis</i>
9	ER267	LVSS	LCL	Bahia	<i>L. (V.) braziliensis</i>
10	ER269	KPLR	LCL	Amazonas	<i>L. (V.) braziliensis</i>
11	ER271	IP	LCL	Amazonas	<i>L. (V.) braziliensis</i>
12	ER098	PJTG	LCL	Pará	<i>L. (V.) braziliensis</i>
13	UB017	RSS	LCL	São Paulo	<i>L. (L.) amazonensis</i>
14	AAB	AAB	LCD	Maranhão	<i>L. (L.) amazonensis</i>

(-) Dado não fornecido ou não disponível.

## 4.2 Fármacos

Para os ensaios de suscetibilidade *in vitro*, os fármacos utilizados foram a MF (Sigma-Aldrich), o desoxicolato de AmB (Sigma-Aldrich), o SbIII (Sigma-Aldrich), o SbV (Sanofi-Aventis) e a PEN (Sigma-Aldrich). Esses fármacos foram diluídos em água Milli-Q, em soluções estoque de 10-100 mM. A AmB foi diluída em DMSO (Sigma-Aldrich) em solução estoque de 1 mM. Os fármacos foram mantidos a -20°C até o momento do uso. Para os ensaios *in vivo*, foi utilizado o desoxicolato de AmB (Cristália), diluído em PBS em solução estoque de 5 mg/mL.

## 4.3 Suscetibilidade *in vitro* dos parasitos aos fármacos

### 4.3.1 Determinação da atividade dos fármacos contra promastigotas dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp.

Para avaliar a atividade dos fármacos contra promastigotas, foi utilizado o teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) conforme descrito (Zauli-Nascimento et al. 2010). Para isso, foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  promastigotas em fase logarítmica de crescimento em placas de 96 poços em volume de 200 µL de meio M199 com concentrações crescentes

de AmB (0; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 nM), SbIII (0; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250  $\mu$ M), PEN (0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25  $\mu$ M) ou MF (0; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200  $\mu$ M). Após 24 horas de incubação a 25°C, foi adicionado 30  $\mu$ L de 5 mg/mL de MTT e incubado por 3 horas. Posteriormente, foi adicionado 50  $\mu$ L de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio), para a posterior verificação da absorbância no espectrofotômetro Multiskan Sky (Thermo-Scientific). Foi medida uma absorbância inicial de 595 nm e uma absorbância de 690 nm como referência. Os resultados foram obtidos de ao menos três experimentos independentes realizados em triplicata e a concentração efetiva de fármaco que inibe a viabilidade celular em 50% e 90% (CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub>) foi determinada através de curvas de regressão sigmóide utilizando o software GraphPad Prism 7.

#### **4.3.2 Ensaio de citotoxicidade aos fármacos miltefosina e anfotericina B**

Para os ensaios de citotoxicidade, cerca de  $3 \times 10^5$  macrófagos derivados de medula óssea foram plaqueados em placas de 24 poços em volume de 300  $\mu$ L de RPMI-1640 completo e incubados durante 24 horas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio foi retirado e então foi adicionado 500  $\mu$ L de meio RPMI contendo concentrações crescentes de MF (0; 0,1; 1; 5; 10; 20; 40; 50; 75; 100; 250 e 500  $\mu$ M) ou de AmB (0; 0,001; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10 e 100  $\mu$ M), incubados por 72 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio RPMI contendo o fármaco foi removido e foi adicionado 100  $\mu$ L de 2,5 g/L de tripsina por poço. Após 15 minutos foi adicionado 400  $\mu$ L de PBS por poço e 10  $\mu$ L desta suspensão de células foi diluída em 10  $\mu$ L do corante *Trypan Blue* 0,4% (Sigma-Aldrich). Na câmara de Neubauer, foi adicionado cerca 10  $\mu$ L de suspensão para contagem do número total de células viáveis, considerando que aquelas não viáveis adquire coloração azulada. Os resultados foram obtidos de ao menos três experimentos independentes e a concentração citotóxica de MF ou AmB que inibe a viabilidade celular em 50% (CC<sub>50</sub>) foi determinada através de curvas de regressão sigmóide utilizando o software GraphPad Prism 7.

#### 4.3.3 Determinação da atividade dos fármacos contra amastigotas intracelulares dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp.

Para avaliar a atividade dos fármacos contra amastigotas intracelulares, foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea conforme o protocolo descrito (Zamboni e Rabinovitch 2003). Os macrófagos foram obtidos a partir de fêmures e tíbias de camundongos BALB/c que tiveram suas respectivas epífises cortadas. A seguir, com o auxílio de uma agulha 21G acoplada a uma seringa, esta foi introduzida na cavidade medular com meio R2020 (50% de meio RPMI-1640, 20% de soro fetal bovino inativado e estéril e 20% do sobrenadante de cultura de fibroblastos L929) para remoção das células da medula óssea. Macrófagos diferenciados foram obtidos a partir da incubação por 7 dias em meio R2020 em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio R2020 foi retirado para remoção dos macrófagos não aderidos e/ou não diferenciados. Os macrófagos aderidos foram removidos da placa utilizando um *cell scraper* em presença de PBS gelado, transferidos para um tubo cônico de 15 mL, centrifugados a 480xg durante 10 minutos, a 4°C e então ressuspensos em meio RPMI-1640 completo. O número total de macrófagos foi obtido pela contagem em câmara de Neubauer. Cerca de 3x10<sup>5</sup> macrófagos foram plaqueados em 300 µL de meio RPMI-1640 completo em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro estéreis de 13 mm de diâmetro. Após incubação por 24 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, o meio RPMI foi retirado de cada poço e os macrófagos foram lavados duas vezes com PBS a 37°C a fim de retirar os macrófagos não aderidos à placa. Os macrófagos foram então infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* ou ainda espécies do subgênero *Viannia* em fase estacionária de crescimento, numa proporção de 5:1, 20:1 e 30:1 (parasitos:macrófago) respectivamente. Os parasitos foram ressuspensos em 300 µL de meio RPMI e as infecções foram realizadas por um período de 3 a 4 horas. Após esse período, os parasitos não internalizados foram removidos através de duas lavagens consecutivas com PBS previamente aquecido a 37°C e então foi adicionado 500 µL de meio RPMI contendo concentrações crescentes de AmB (0; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 150 nM), PEN (0; 0,01;

0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 e 0,4  $\mu\text{M}$ ) ou MF (0; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 ; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) incubados em estufa a 34°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas ou ainda SbV (0; 25; 50; 100; 250; 500; 750 e 1.000  $\mu\text{M}$ ) incubado durante 6 dias, com troca do meio de cultura com o fármaco no terceiro dia de infecção. A seguir, as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com o kit *Instant Prov (Newprov)* segundo as orientações do fabricante e então, visualizadas no microscópio óptico. Os resultados foram obtidos de ao menos três experimentos independentes, o número de amastigotas por macrófago e a porcentagem de infecção foram obtidos através da contagem de pelo menos 100 macrófagos e os valores de CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub> foram determinados através de curvas de regressão sigmóide utilizando o software GraphPad Prism 7.

#### **4.4 Seleção de parasitos resistentes à AmB**

Para a seleção dos mutantes resistentes, culturas de formas promastigotas da cepa selvagem de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), foram cultivadas em meio M199 e tratadas com concentrações crescentes de AmB conforme previamente descrito (Coelho et al. 2014). A seleção foi iniciada na concentração do fármaco correspondente ao valor de CE<sub>50</sub> (26,60  $\pm$  1,77 nM). A suscetibilidade da linhagem resistente à AmB foi avaliada pelo teste colorimétrico MTT conforme descrito anteriormente no item 4.3.1.

#### **4.5 Avaliação da eficácia *in vivo* da AmB contra *L. (L.) amazonensis***

Foram infectados quatro grupos, compostos por cinco camundongos fêmeas BALB/c cada. A infecção foi realizada no coxim plantar da pata posterior direita de cada animal, com 1x10<sup>6</sup> promastigotas em fase estacionária de crescimento da cepa selvagem de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), da linhagem resistente à AmB previamente selecionada (item 4.4) ou do isolado clínico AAB. Semanalmente, a espessura da pata posterior direita (infectada) e esquerda (não infectada) de cada animal foi medida utilizando medidor de espessura (Mitutoyo), para avaliar a evolução da lesão durante todo o experimento. O tratamento iniciou quatro semanas após a infecção, ministrando via intraperitonal 0, 1, 5 ou 10 mg/kg/dia de AmB,

durante 20 dias, com pausa de 2 dias a cada 5 dias de administrações consecutivas. No final do tratamento, os camundongos foram eutanasiados para retirada de 25 mg de tecido da lesão da pata infectada. O DNA das amostras de tecidos foi extraído através do kit *PureLink Genomic DNA* (Invitrogen), segundo as orientações do fabricante e o DNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop®2000 (Thermo-Scientific) e armazenado a -20°C para posterior realização do PCR em tempo real, a fim de determinar a carga parasitária.

#### **4.5.1 Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real**

O PCR em tempo real (qPCR) para quantificação da carga parasitária foi realizado em amostras de DNA das lesões de patas de camundongos BALB/c infectados que foram ou não tratados com AmB, conforme previamente descrito (Coser et al. 2020). Foram utilizados para cada reação 4 µL do DNA total diluído (1:100) (equivalente ao DNA de 1 mg de tecido), 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µL de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad) e 500 nM de cada iniciador (G6PDH-F (5'-CGYCTYCCAGACGCTACGA-3') e o G6PDH-R (5'-AGCGGYGTGAAGATGCGC CA-3')). Sob as seguintes condições de amplificação: 3 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Foi amplificado um fragmento de 110 pb do gene de cópia única de *L. (L.) amazonensis*, glicose-6-fosfato desidrogenase (*g6pdh*) (Castilho et al. 2008). A curva padrão foi realizada em triplicata, utilizando diluições seriadas do DNA genômico de  $2 \times 10^7$  a 2 parasitos da cepa selvagem de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269). Os resultados foram obtidos pelo equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), do Departamento de Genética e Evolução, IB, UNICAMP.

#### **4.5.2 Determinação dos níveis séricos de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e creatinina dos camundongos infectados e tratados com AmB**

A análise bioquímica do sangue dos camundongos para determinação dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina foi realizado pelo laboratório de análises

clínicas Vetpat (Campinas, SP, Brasil). A coleta de sangue foi feita antes do animal ser eutanasiado pela via axilar (venossecção) e para isso o animal foi manualmente contido e depois anestesiado pela via intraperitoneal com 100 mg/kg de ketalar e 10 mg/kg de xilazina. Posteriormente, foi realizada uma incisão na axila do animal (região lateral do tórax) e com auxílio de uma pipeta Pasteur o sangue foi coletado (Neves et al. 2013). As amostras foram centrifugadas a 480xg durante 10 minutos afim de separar o soro do plasma presente no sangue, e então armazenadas até a análise.

As concentrações de ALT e AST foram determinadas através do método cinético UV. Cerca de 0,1 mL do soro de cada animal foi diluído em 1 mL do reagente do kit *Liquiform* (Labtest) (100 mmol/L de tampão Tris em pH 7,5, 500 mmol/L de L-alanina,  $\geq$  600 U/L de malato desidrogenase,  $\geq$  1.200 U/L de lactato desidrogenase, 0,1 g/L de azida sódica, 0,18 mmol/L de NADH, 15 mmol/L de acetogluturato e 15,5 mmol/L de azida sódica) previamente pré-aquecido a 37°C, por 2 minutos. Os mesmos foram homogeneizados e transferidos para cubetas termostáticas na temperatura de 37°C. Depois de 90 segundos, foi determinada a absorbância inicial a 340 nm, seguido de novas leituras após 1, 2 e 3 minutos.

A concentração de creatinina foi determinada utilizando o método cinético colorimétrico. Cerca de 0,1 mL do soro de cada animal foi diluído em 1 mL do reagente do kit *Creatinina K* (Labtest) (125 mmol/L de NaOH, 24 mmol/L de tetraborato de sódio e 44 mmol/L de ácido pícrico). A seguir, as amostras foram homogeneizadas e transferidas para cubetas termostáticas na temperatura de 37°C. Depois de 30 e 90 segundos, foram determinadas as absorbâncias a 510 nm. Os valores das concentrações séricas de ALT, AST e creatinina foram calculados com base no cálculo fornecido pelo kit *Liquiform* para ALT e AST e kit *Creatinina K*, para creatinina e as absorbâncias foram obtidas pelo espectrofotômetro semi-automático Bioplus BIO-2000.

#### **4.5.3 Análise histopatológica das lesões de animais infectados e tratados com AmB**

A análise histopatológica foi realizada pelo laboratório de anatomia patológica Histocell (São Paulo, SP, Brasil). Para a análise, foram utilizadas

amostras de tecido da lesão no coxim plantar de camundongos fêmeas BALB/c infectados com a cepa selvagem de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), a linhagem resistente ou o isolado clínico AAB, tratados ou não com 1, 5 e 10 mg/kg de AmB. Os animais foram sacrificados ao final do tratamento (8ª semana pós-infecção) e, em seguida, as amostras de tecido foram lavadas com PBS, fixadas com formalina e processados em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e, em seguida, visualizados em microscópio óptico.

#### **4.6 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7, aplicando o teste ANOVA de uma via e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Determinação da atividade da MF contra promastigotas dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp.

A suscetibilidade *in vitro* na forma promastigota do parasito dos isolados clínicos e das cepas à MF foi determinada utilizando o teste colorimétrico MTT, utilizando as respectivas cepas das espécies como controle dos ensaios. Após os experimentos, os resultados foram convertidos em curvas de inibição de crescimento celular para determinar os valores de CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub> de MF. Dentre os isolados avaliados, foi possível observar variação nos valores de CE<sub>50</sub> que variaram de  $14,17 \pm 2,30 \mu\text{M}$  a  $33,25 \pm 4,14 \mu\text{M}$ , enquanto que as cepas de *Leishmania* spp. variaram de  $11,43 \pm 1,32 \mu\text{M}$  a  $52,67 \pm 3,29 \mu\text{M}$  (Tabela 4). O isolado ER117, tipado como *L. (L.) amazonensis*, foi o mais suscetível à MF, enquanto que o isolado de ER267 [*L. (V.) braziliensis*], foi o menos suscetível (Tabela 4). Dentre as espécies responsáveis pela LT e LV no Brasil, a *L. (V.) lainsoni* (cepa M6426) foi a mais suscetível enquanto que a cepa M2903 [*L. (V.) braziliensis*] foi a menos suscetível à MF (Tabela 4 e Figura 4A).

Para os seis isolados clínicos e as cepas de *L. (L.) amazonensis*, os valores de CE<sub>50</sub> dos isolados tiveram uma pequena variação ( $14,17 \pm 2,30 \mu\text{M}$  a  $23,96 \pm 0,15 \mu\text{M}$ ) (Tabela 4 e Figura 4B), enquanto que as cepas M2269, PH8 e LV79 apresentaram valores de CE<sub>50</sub> de  $17,55 \pm 1,14$ ,  $39,39 \pm 3,39$  e  $39,66 \pm 0,34 \mu\text{M}$  respectivamente (Tabela 4 e Figura 4A). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de CE<sub>50</sub>, ou seja, menos ou mais suscetíveis à MF foram os isolados AAB e ER117 respectivamente (Tabela 4 e Figura 4B). Os valores de CE<sub>90</sub> dos isolados clínicos variaram de  $28,93 \mu\text{M}$  a  $78,53 \mu\text{M}$ , sendo o isolado ER117 com o menor valor de CE<sub>90</sub> e o isolado ER118 com o maior valor de CE<sub>90</sub> (Tabela 4). Os valores de CE<sub>90</sub> das cepas M2269, PH8 e LV79 foram de  $95,24$ ,  $91,46$  e  $107,2 \mu\text{M}$  respectivamente (Tabela 4).

Entre os seis isolados clínicos analisados e as cepas de *L. (V.) braziliensis*, os valores de CE<sub>50</sub> variaram de  $14,22 \pm 1,83 \mu\text{M}$  a  $33,25 \pm 4,14 \mu\text{M}$  (Tabela 4 e Figura 4B), enquanto que as cepas apresentaram valores de CE<sub>50</sub> de  $34,13 \pm 1,98$  e  $52,67 \pm 3,29 \mu\text{M}$  para H3227 e M2903 respectivamente (Tabela 4 e Figura 4A). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de CE<sub>50</sub>

foram os isolados ER267 e ER098 respectivamente (Tabela 4). Já os valores de  $CE_{90}$  variaram de 48,54  $\mu\text{M}$  a 98,26  $\mu\text{M}$ . O isolado ER215 apresentou menor valor de  $CE_{90}$ , enquanto que o isolado clínico ER004 teve o maior valor de  $CE_{90}$ . Já os valores de  $CE_{90}$  das cepas H3227 e M2903 foram 108,2 e 96,09  $\mu\text{M}$  respectivamente (Tabela 4).

Ainda foi avaliada a susceptibilidade à MF da cepa M4147 e o isolado clínico ER192, tipado como *L. (V.) guyanensis*. Este isolado apresentou um valor de  $CE_{50}$  de  $25,75 \pm 1,93 \mu\text{M}$  e de  $CE_{90}$  de 86,53  $\mu\text{M}$ . Já a cepa M4147 apresentou um valor de  $CE_{50}$  e de  $CE_{90}$  de  $40,41 \pm 3,84 \mu\text{M}$  e 124,10  $\mu\text{M}$  respectivamente. Na Figura 4, temos uma análise comparativa dos valores de  $CE_{50}$  dos isolados clínicos e cepas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, além das demais espécies de *Leishmania* na forma promastigota.

**Tabela 4.** Suscetibilidade à MF *in vitro* dos isolados e das cepas de *Leishmania* spp.

Código da cepa ou do isolado	Espécie	Promastigota			Amastigota			Taxa de Infecção (%) <sup>3</sup>	(IS) <sup>4</sup>
		CE <sub>50</sub> ± DP (µM)	CE <sub>90</sub> (µM)	(n) <sup>1</sup>	CE <sub>50</sub> ± DP (µM)	CE <sub>90</sub> (µM)	(n) <sup>2</sup>		
M2269	<i>L. (L.) amazonensis</i>	17,55 ± 1,41	95,24	3	1,94 ± 0,15	6,30	3	70	25,52
PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i>	38,38 ± 3,39	91,46	3	6,23 ± 1,57	131,4	3	98	7,94
LV79	<i>L. (L.) amazonensis</i>	38,66 ± 0,34	107,2	3	1,62 ± 0,08	10,23	3	63	30,56
ER054	<i>L. (L.) amazonensis</i>	23,22 ± 3,8	50,29	3	1,08 ± 0,10	11,67	3	18	45,85
ER117	<i>L. (L.) amazonensis</i>	14,17 ± 2,30	28,93	3	1,13 ± 0,08	3,80	3	35	43,82
ER118	<i>L. (L.) amazonensis</i>	17,69 ± 1,29	78,53	3	1,93 ± 0,14	5,60	3	92	25,65
UB017	<i>L. (L.) amazonensis</i>	23,34 ± 3,78	54,59	3	3,58 ± 0,78	19,29	3	60	13,83
ER256	<i>L. (L.) amazonensis</i>	22,96 ± 2,10	56,20	3	2,89 ± 0,12	19,20	3	49	17,13
AAB	<i>L. (L.) amazonensis</i>	23,96 ± 0,15	52,46	3	9,16 ± 0,92	102,8	3	96	5,40
H3227	<i>L. (V.) braziliensis</i>	34,13 ± 1,98	108,2	3	2,79 ± 0,23	25,11	3	50	17,74
M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	52,67 ± 3,29	96,09	3	8,55 ± 1,82	108	3	95	5,79
ER004	<i>L. (V.) braziliensis</i>	20,50 ± 3,85	98,26	3	2,04 ± 0,10	3,12	3	85	24,27
ER010	<i>L. (V.) braziliensis</i>	18,65 ± 1,20	56,01	3	5,56 ± 0,06	12,92	3	95	8,91
ER098	<i>L. (V.) braziliensis</i>	14,22 ± 1,83	56,03	3	5,89 ± 0,52	16,3	3	92	8,41
ER114	<i>L. (V.) braziliensis</i>	30,60 ± 3,97	87,06	3	1,40 ± 0,08	4,20	3	90	35,37
ER267	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33,25 ± 4,14	57,50	3	3,08 ± 0,1	4,90	3	82	16,07
ER269	<i>L. (V.) braziliensis</i>	26,59 ± 5,03	72,58	3	3,15 ± 0,09	10,19	3	73	15,72
ER271	<i>L. (V.) braziliensis</i>	28,26 ± 4,14	54,05	3	9,60 ± 0,37	23,20	3	95	5,15
M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>	40,41 ± 3,84	124,10	3	5,79 ± 0,17	11,60	3	79	8,55
ER192	<i>L. (V.) guyanensis</i>	25,75 ± 1,93	86,53	3	4,46 ± 0,4	26,78	3	89	11,10
M8408	<i>L. (V.) shawi</i>	33,05 ± 4,88	80,32	3	1,91 ± 0,52	6,46	3	52	25,92
M15732	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	22,62 ± 2,28	76,66	3	1,19 ± 0,4	8,63	3	70	41,61
M5533	<i>L. (V.) naiffi</i>	29,61 ± 4,39	59,35	3	1,80 ± 0,07	14,15	3	52	27,51
M6426	<i>L. (V.) lainsoni</i>	11,43 ± 1,32	25,90	3	1,46 ± 0,20	18,38	3	46	33,91
LD	<i>L. (L.) infantum</i>	17,42 ± 1,95	41,26	8	1,37 ± 0,05	2,80	3	65	36,14

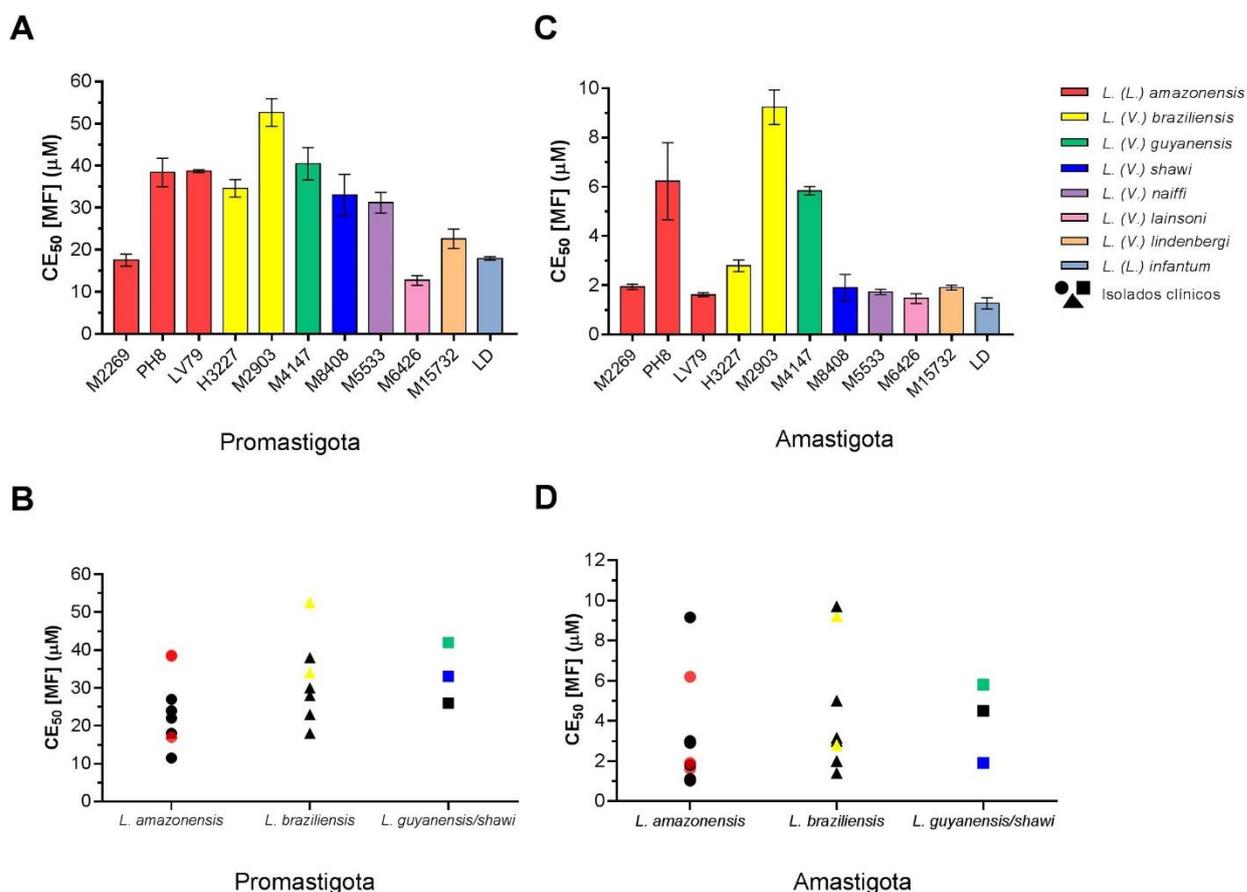
As respectivas cepas de *Leishmania* estão destacadas em cinza na Tabela.

<sup>1</sup> Número de experimentos independentes realizados em triplicata por cepa ou isolado;

<sup>2</sup> Número de experimentos independentes realizados por cepa ou isolado;

<sup>3</sup> Porcentagem de infecção dos macrófagos;

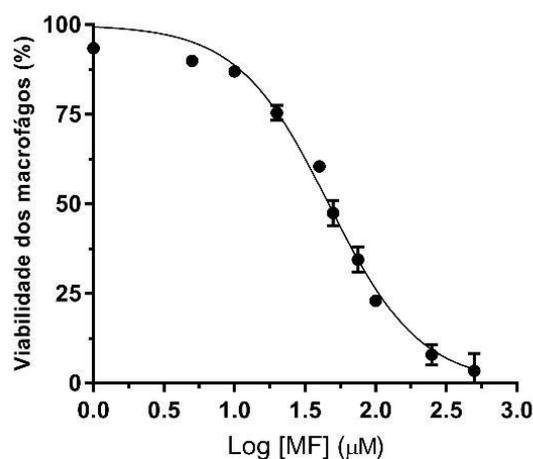
<sup>4</sup> IS, Índice de Seletividade.



**Figura 4.** Suscetibilidade à MF na forma promastigota (A e B) e amastigota intracelular (C e D) das respectivas cepas e isolados clínicos de *Leishmania* spp. Média e desvio padrão dos valores de CE<sub>50</sub> de promastigotas (A) e amastigotas intracelulares (C) de 11 cepas representativas espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil. Valores de CE<sub>50</sub> de promastigotas (B) e amastigotas intracelulares (D) dos 14 isolados clínicos e das cepas de *L. (L.) amazonensis* (M2269, PH8 e LV79) (círculos vermelhos), *L. (V.) braziliensis* (H3227 e M2903) (triângulos amarelos), *L. (V.) guyanensis* M4147 (quadrado verde) e *L. (V.) shawi* (quadrado azul). Os círculos, triângulos e o quadrado em preto correspondem aos isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* respectivamente.

## 5.2 Citotoxicidade *in vitro* da MF

A avaliação da citotoxicidade da MF foi determinada previamente em macrófagos derivados de medula óssea de camundongo BALB/c na presença de concentrações crescentes do fármaco. O método utilizado baseou-se na contagem de células viáveis através do uso do corante *Trypan Blue*. Os macrófagos apresentaram um valor de CC<sub>50</sub> de  $49,52 \pm 2,93 \mu\text{M}$  após 72 horas de incubação com MF (Figura 5).



**Figura 5.** Curva dose-resposta para determinação da citotoxicidade da MF em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos após incubação por 72 horas.

### 5.3 Determinação da atividade da MF contra amastigotas intracelulares dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp.

Para a avaliação da suscetibilidade *in vitro* à MF nas formas amastigotas intracelulares do parasito foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea. Os resultados obtidos foram convertidos em curvas de inibição de crescimento para determinação dos valores de CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub> do fármaco.

Inicialmente, foi avaliada a porcentagem de infecção dos 14 isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp. em macrófagos diferenciados de medula óssea. Foi possível observar que houve uma variação de cerca de 18% a 96% na taxa de infecção dos isolados clínicos (Figura 6 e Tabela 4), enquanto que as cepas de *Leishmania* spp. apresentaram uma variação na porcentagem de infecção dos macrófagos de 46% a 98%. A seguir, foi então avaliada a suscetibilidade à MF na forma amastigota do parasito. Dentre os isolados avaliados, foi possível observar uma moderada variação nos valores de CE<sub>50</sub>, que variaram de  $1,08 \pm 0,10 \mu\text{M}$  a  $9,60 \pm 0,37 \mu\text{M}$ , enquanto que as cepas de *Leishmania* spp. variaram de  $1,19 \pm 0,4 \mu\text{M}$  a  $8,55 \pm 1,82 \mu\text{M}$  (Tabela 4). O isolado ER054 [*L. (L.) amazonensis*] e o isolado ER271 [*L. (V.) braziliensis*] apresentaram o menor e o maior valor de CE<sub>50</sub> respectivamente. A cepa M15732 [*L. (V.) lindenbergi*] apresentou o menor valor de CE<sub>50</sub>, enquanto que a cepa M2903 [*L. (V.) braziliensis*] apresentou o maior valor de CE<sub>50</sub> (Tabela 4).

Dentre os seis isolados clínicos e as cepas de *L. (L.) amazonensis*, a

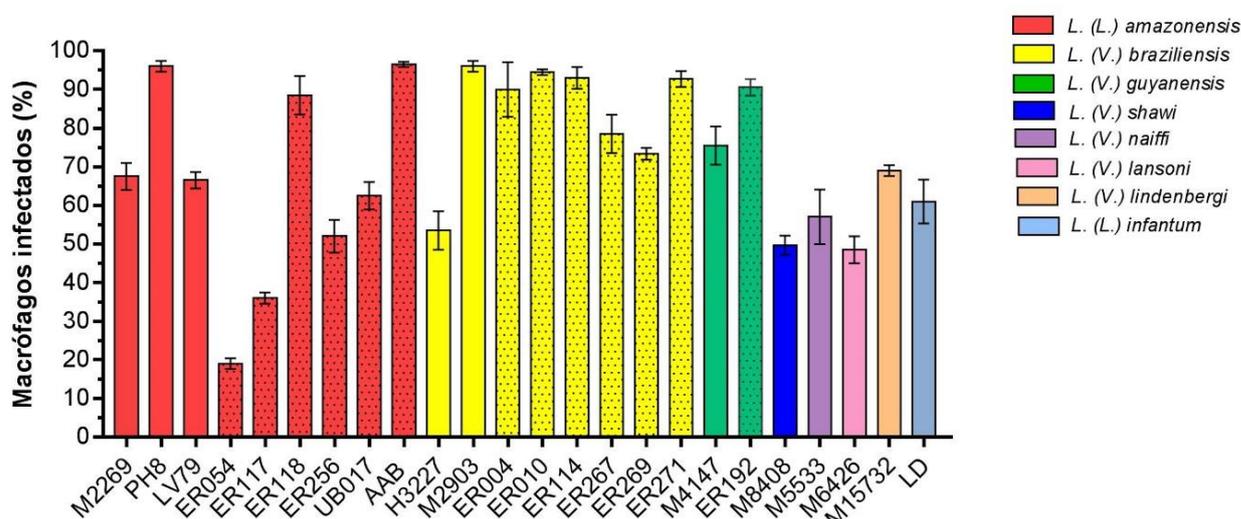
porcentagem de infecção variou de 18% a 96%, enquanto que as cepas M2269, PH8 e LV79 infectaram de 63% a 98% dos macrófagos. Os isolados AAB e ER054 apresentaram a maior e a menor porcentagem de infecção respectivamente (Tabela 4 e Figura 6). Os valores de  $CE_{50}$  variaram de  $1,08 \pm 0,10 \mu\text{M}$  a  $9,16 \pm 0,92 \mu\text{M}$  dentre os isolados (Tabela 4 e Figura 4D), enquanto que as cepas M2269, PH8 e LV79 apresentaram um valor de  $CE_{50}$  de  $1,94 \pm 0,15$ ,  $6,23 \pm 1,57$  e  $1,62 \pm 0,08 \mu\text{M}$  respectivamente (Tabela 4 e Figura 4C). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de  $CE_{50}$  foram os isolados AAB e ER054 respectivamente (Tabela 4 e Figura 4D). Além disso, os valores de  $CE_{90}$  variaram de 3,80 a 102,8  $\mu\text{M}$ , sendo o isolado ER117 com o menor valor de  $CE_{90}$ . O isolado AAB apresentou o maior valor de  $CE_{90}$ . Já as cepas M2269, PH8 e LV79 apresentaram um valor de  $CE_{90}$  de 6,30, 131,4 e 10,23  $\mu\text{M}$  respectivamente (Tabela 4).

Dentre os isolados de *L. (V.) braziliensis*, além das cepas H3227 e M2903, a porcentagem de infecção em macrófagos variou de 73% a 95%, enquanto que as cepas H3227 e M2903 infectaram 50% e 95% dos macrófagos respectivamente (Tabela 4 e Figura 6). Os valores de  $CE_{50}$  dos isolados desta espécie variaram de  $1,30 \pm 0,11$  a  $9,60 \pm 0,37 \mu\text{M}$  (Tabela 4 e Figura 4D), enquanto que os valores de  $CE_{50}$  das cepas H3227 e M2903 foram  $2,79 \pm 0,23 \mu\text{M}$  e  $8,55 \pm 1,82 \mu\text{M}$  respectivamente (Tabela 4 e Figura 4C). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de  $CE_{50}$  foram os isolados ER271 e ER135 respectivamente. Além disso, os valores de  $CE_{90}$  dos isolados variaram de 3,12  $\mu\text{M}$  a 23,20  $\mu\text{M}$ , e os valores de  $CE_{90}$  das cepas H3227 e M2903 foram 25,11 e 108  $\mu\text{M}$  respectivamente (Tabela 4).

Também foi avaliada a susceptibilidade à MF do isolado clínico ER192. Os valores de  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$  deste isolado foram  $4,46 \pm 0,4 \mu\text{M}$  e 26,78  $\mu\text{M}$  respectivamente, com uma taxa de infecção de 89%. A cepa M4147 apresentou um valor de  $CE_{50}$  de  $5,79 \pm 0,17 \mu\text{M}$  e de  $CE_{90}$  de 11,60  $\mu\text{M}$ , com uma taxa de infecção de 79% (Tabela 4 e Figura 6). Na Figura 4D, é apresentada uma análise comparativa dos valores de  $CE_{50}$  dos isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e suas respectivas cepas, além das demais espécies de *Leishmania* na forma amastigota do parasito.

Ainda foi avaliado o índice de seletividade (IS) calculado pela razão da concentração citotóxica de MF em 50% nos macrófagos ( $CC_{50} = 49,52 \pm 2,93$

$\mu\text{M}$ ) após 72 horas de incubação e a concentração que inibe o crescimento do parasito em 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) para cada um dos isolados clínicos ou cepa da respectiva espécie de *Leishmania* (Tabela 4).



**Figura 6.** Porcentagem de infecção dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp. em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos. Na Figura está representada a média e o desvio padrão. Os preenchimentos hachurados em vermelho, amarelo e verde correspondem aos isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* respectivamente.

#### 5.4 Determinação da atividade da AmB contra promastigotas dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp.

A suscetibilidade *in vitro* em promastigotas dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* à AmB também foi determinada pelo teste colorimétrico MTT. Foi possível observar que os valores de  $\text{CE}_{50}$  dos isolados clínicos variaram de  $16,72 \pm 2,69$  nM a  $57,25 \pm 4,38$  nM, enquanto que as cepas de *Leishmania* spp. variaram de  $12,89 \pm 1,21$  nM a  $62,36 \pm 4,20$  nM (Tabela 5 e Figura 7). O isolado ER010 [*L. (V.) braziliensis*] foi o mais suscetível à AmB, enquanto que o isolado AAB [*L. (L.) amazonensis*] foi o menos suscetível (Tabela 5). Dentre as espécies responsáveis pela LT e LV no Brasil, *L. (V.) lindenbergi* (cepa M15732) foi a mais suscetível enquanto que a cepa M6426 [*L. (V.) lainsoni*], foi a menos suscetível ao fármaco (Tabela 5 e Figura 7).

Dentre os seis isolados clínicos e as cepas de *L. (L.) amazonensis*, os valores de  $\text{CE}_{50}$  dos isolados tiveram uma pequena variação ( $18,94 \pm 2,42$  nM a

57,25 ± 4,38 nM) (Tabela 5 e Figura 7B). Enquanto que as cepas M2269, PH8 e LV79 apresentaram valores de CE<sub>50</sub> de 26,60 ± 1,77, 42,59 ± 1,33 e 18,88 ± 0,72 nM respectivamente (Tabela 5 e Figura 7A). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de CE<sub>50</sub>, ou seja, menos ou mais susceptíveis à AmB, foram os isolados AAB e ER117 respectivamente (Tabela 5 e Figura 7B). Os valores de CE<sub>90</sub> dos isolados clínicos variaram de 41,02 nM a 255,6 nM, sendo o isolado ER256 com o menor valor de CE<sub>90</sub> e o isolado ER054 com o maior valor de CE<sub>90</sub> (Tabela 5). Já os valores de CE<sub>90</sub> das cepas M2269, PH8 e LV79 foram de 49,30, 208,1 e 112 nM, respectivamente (Tabela 5).

Os valores de CE<sub>50</sub> dos isolados variaram de 16,72 ± 2,69 a 33,77 ± 3,35 nM em seis isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis* (Tabela 5 e Figura 7B), enquanto que as cepas apresentaram valores de CE<sub>50</sub> de 18,74 ± 2,40 e 25,26 ± 1,46 nM para H3227 e M2903 respectivamente (Tabela 5 e Figura 6A). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de CE<sub>50</sub> foram os isolados ER114 e ER010 respectivamente (Tabela 5). Já os valores de CE<sub>90</sub> variaram de 44,53 a 184,9 nM. O isolado com o menor valor de CE<sub>90</sub> foi o ER267; enquanto que o isolado ER098 teve o maior valor de CE<sub>90</sub>. Já os valores de CE<sub>90</sub> das cepas H3227 e M2903 foram 41,29 e 56,16 nM respectivamente (Tabela 5).

Ainda foi avaliada a susceptibilidade à AmB do isolado clínico de *L. (V.) guyanensis*, o isolado ER192, que apresentou um valor de CE<sub>50</sub> de 33,01 ± 1,75 nM e de CE<sub>90</sub> de 90,82 nM. Já a cepa M4147 apresentou um valor de CE<sub>50</sub> de 16,65 ± 3,11 nM e de CE<sub>90</sub> de 108,20 nM. Na Figura 7B, temos uma análise comparativa dos valores de CE<sub>50</sub> dos isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e suas respectivas cepas, além das demais espécies de *Leishmania* na forma promastigota.

Tabela 5. Suscetibilidade à AmB *in vitro* dos isolados e das cepas de *Leishmania* spp.

Código da cepa ou do isolado	Espécie	Promastigota			Amastigota			Taxa de infecção (%) <sup>3</sup>	(IS) <sup>4</sup>
		CE <sub>50</sub> ± DP (nM)	CE <sub>90</sub> (nM)	(n) <sup>1</sup>	CE <sub>50</sub> ± DP (nM)	CE <sub>90</sub> (nM)	(n) <sup>2</sup>		
M2269	<i>L. (L.) amazonensis</i>	26,60 ± 1,77	49,30	3	5,88 ± 1,45	27,31	3	65	21,65
PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i>	42,59 ± 1,33	208,1	3	21,63 ± 2,40	92,11	3	97	5,88
LV79	<i>L. (L.) amazonensis</i>	18,88 ± 0,72	112	3	4,10 ± 0,25	52,94	3	68	31,06
ER054	<i>L. (L.) amazonensis</i>	41,33 ± 3,73	267,5	3	2,09 ± 0,17	9,45	3	20	60,93
ER117	<i>L. (L.) amazonensis</i>	18,94 ± 2,42	107,80	3	1,94 ± 0,43	11,84	3	37	65,64
ER118	<i>L. (L.) amazonensis</i>	22,09 ± 4,41	104,2	3	4,65 ± 1,13	27,53	3	85	27,38
UB017	<i>L. (L.) amazonensis</i>	29,35 ± 3,71	86,34	3	11,10 ± 2,27	18,98	3	65	11,47
ER256	<i>L. (L.) amazonensis</i>	26,35 ± 1,97	41,02	3	7,45 ± 0,62	69,29	3	55	14,09
AAB	<i>L. (L.) amazonensis</i>	57,25 ± 4,38	91,57	3	20,88 ± 2,34	98,18	3	97	6,09
H3227	<i>L. (V.) braziliensis</i>	18,74 ± 2,40	41,29	3	1,69 ± 0,05	3,04	3	57	75,36
M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	25,26 ± 1,46	56,16	3	13,27 ± 1,97	53,14	3	97	9,59
ER004	<i>L. (V.) braziliensis</i>	20,53 ± 0,09	57,85	3	15,67 ± 0,92	39,89	3	95	8,13
ER010	<i>L. (V.) braziliensis</i>	16,72 ± 2,69	72,71	3	8,26 ± 1,86	33,71	3	94	15,41
ER098	<i>L. (V.) braziliensis</i>	24,8 ± 6,65	184,9	3	14,08 ± 2,73	53,16	3	94	9,04
ER114	<i>L. (V.) braziliensis</i>	33,77 ± 3,35	96,04	3	15,66 ± 1,30	47,32	3	91	8,13
ER267	<i>L. (V.) braziliensis</i>	24,9 ± 3,26	44,53	3	2,34 ± 0,48	13,53	3	75	54,42
ER269	<i>L. (V.) braziliensis</i>	17,08 ± 2,97	71,14	3	5,67 ± 1,28	36,15	3	85	22,46
ER271	<i>L. (V.) braziliensis</i>	19,09 ± 3,66	94,94	3	3,32 ± 0,72	6,68	3	90	38,36
M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>	16,65 ± 3,11	108,20	3	4,81 ± 1,42	9,99	3	72	26,47
ER192	<i>L. (V.) guyanensis</i>	33,01 ± 1,75	90,82	3	22,71 ± 2,64	81,69	3	92	5,60
M8408	<i>L. (V.) shawi</i>	31,95 ± 5,33	229,4	3	18,8 ± 3,56	210,7	3	53	6,77
M15732	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	12,89 ± 1,21	80,01	3	4,04 ± 0,24	10,71	3	68	31,52
M5533	<i>L. (V.) naiffi</i>	54,04 ± 4,37	326,2	3	10,78 ± 2,01	114,7	3	62	11,81
M6426	<i>L. (V.) lainsoni</i>	62,36 ± 4,20	99,48	3	6,95 ± 0,24	58,86	3	51	18,32
LD	<i>L. (L.) infantum</i>	16,95 ± 3,00	49,76	3	5,17 ± 0,95	34,9	3	57	24,63

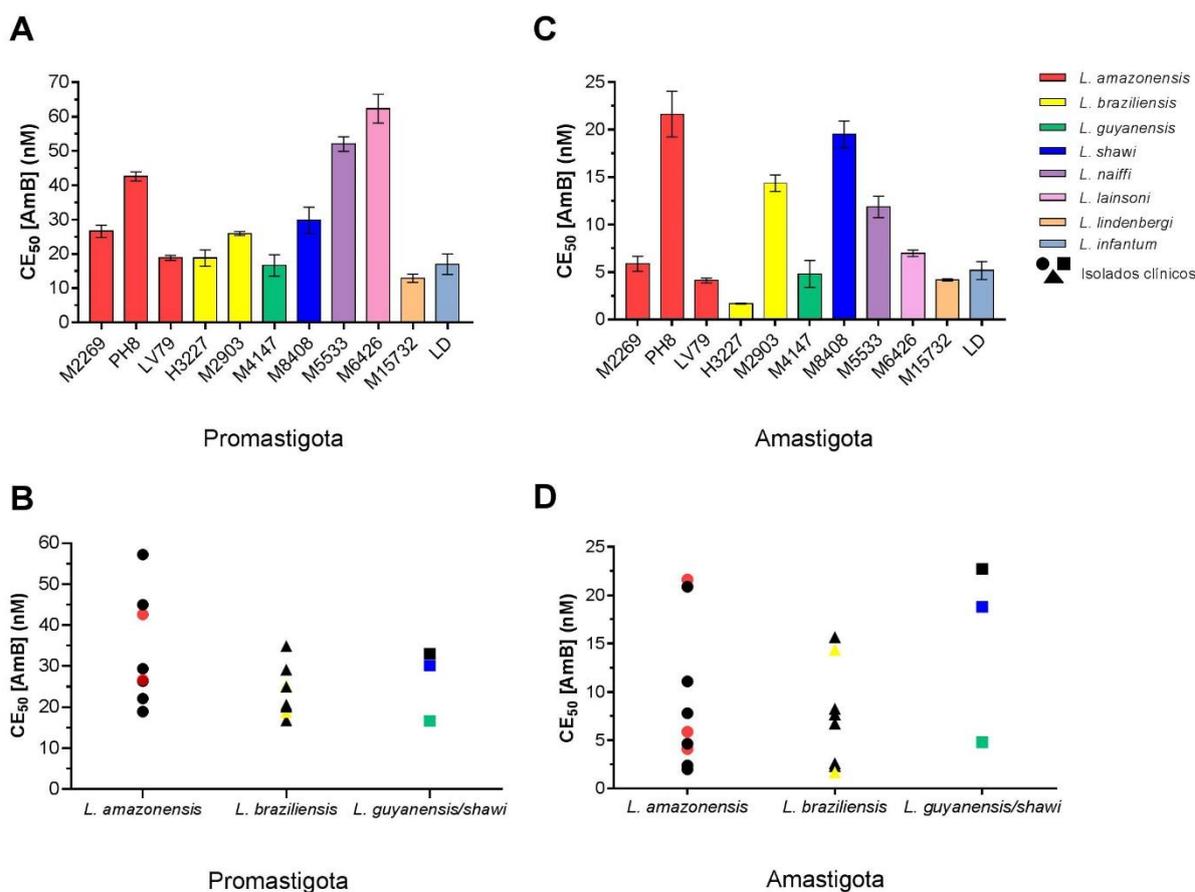
As respectivas cepas de *Leishmania* estão destacadas em cinza na Tabela.

<sup>1</sup> Número de experimentos independentes realizados em triplicata por cepa ou isolado;

<sup>2</sup> Número de experimentos independentes realizados por cepa ou isolado;

<sup>3</sup> Porcentagem de infecção dos macrófagos derivados de medula óssea;

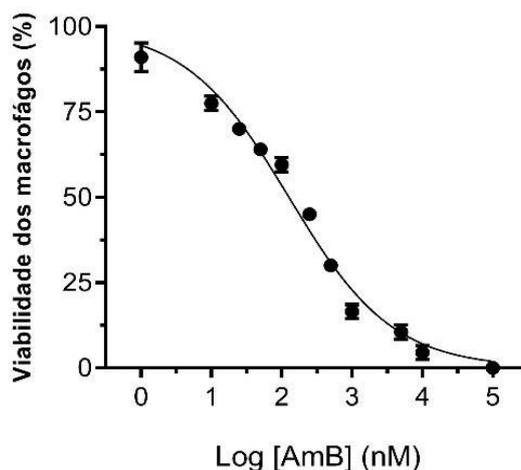
<sup>4</sup> IS, Índice de seletividade.



**Figura 7.** Suscetibilidade à AmB na forma promastigota (A e B) e amastigota intracelular (C e D) das respectivas cepas e isolados clínicos de *Leishmania* spp. Média e desvio padrão dos valores de CE<sub>50</sub> de promastigotas (A) e amastigotas intracelulares (C) de 11 cepas representantes das principais espécies de *Leishmania* no Brasil. Valores de CE<sub>50</sub> de promastigotas (B) e amastigotas intracelulares (D) dos 14 isolados clínicos e das cepas de *L. (L.) amazonensis* (M2269, PH8 e LV79) (círculos vermelhos), *L. (V.) braziliensis* (H3227 e M2903) (triângulos amarelos), *L. (V.) guyanensis* M4147 (quadrado verde) e *L. (V.) shawi* (quadrado azul). Os círculos, triângulos e o quadrado em preto correspondem aos isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* respectivamente.

### 5.5 Citotoxicidade *in vitro* da AmB

A avaliação da citotoxicidade da AmB também foi determinada utilizando macrófagos derivados de medula óssea de camundongo BALB/c conforme previamente descrito. Os macrófagos apresentaram um valor de CC<sub>50</sub> de 127,36 ± 0,94 nM após 72 horas de incubação com AmB (Figura 8).



**Figura 8.** Curva dose-resposta para determinação da citotoxicidade da AmB em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos após incubação por 72 horas.

### 5.6 Determinação da atividade da AmB contra amastigotas intracelulares dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp.

Dentre os isolados avaliados, foi possível observar uma moderada variação nos valores de  $CE_{50}$ , cujos valores variaram de  $1,94 \pm 0,43$  nM a  $22,71 \pm 2,64$  nM (Tabela 5), enquanto que as cepas variaram de  $1,69 \pm 0,05$  nM a  $13,27 \pm 1,97$  nM. O isolado ER117 [*L. (L.) amazonensis*] e o isolado ER192 [*L. (V.) guyanensis*] apresentaram o menor e o maior valor de  $CE_{50}$  respectivamente. A cepa H3227 [*L. (V.) braziliensis*] apresentou o menor valor de  $CE_{50}$ , enquanto que a cepa M2903 [*L. (V.) braziliensis*] apresentou o maior valor de  $CE_{50}$ .

Dentre os seis isolados clínicos e as cepas de *L. (L.) amazonensis*, os valores de  $CE_{50}$  nesta espécie variaram de  $1,94 \pm 0,43$  a  $20,88 \pm 2,34$  nM (Tabela 5 e Figura 7D), enquanto que as cepas M2269, PH8 e LV79 apresentaram valores de  $CE_{50}$  de  $5,88 \pm 1,45$ ,  $21,63 \pm 2,40$  e  $4,10 \pm 0,25$  nM respectivamente (Tabela 5 e Figura 7C). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de  $CE_{50}$  foram os isolados AAB e ER117 respectivamente (Tabela 5 e Figura 7D). Além disso, os valores de  $CE_{90}$  variaram de 9,45 a 98,18 nM, sendo o isolado ER054 com o menor valor de  $CE_{90}$ . O isolado AAB apresentou o maior valor de  $CE_{90}$ . Já as cepas M2269, PH8 e LV79 apresentaram um valor de  $CE_{90}$  de 27,31, 92,11 e 52,94 nM respectivamente (Tabela 5).

O isolado clínico AAB é proveniente de um paciente diagnosticado com LCD, coinfectado com o vírus HIV e que foi previamente tratado com AmB

(Corrêa Soares, Silva et al. 2020), o que difere dos demais isolados utilizados neste estudo que foram obtidos antes do tratamento clínico. Considerando a baixa susceptibilidade à AmB *in vitro* deste isolado, em comparação com os demais isolados e a cepa M2269 (Tabela 5), decidimos avaliar a eficácia deste fármaco *in vivo* em camundongos infectados com este isolado. Para comparar a eficácia da AmB *in vivo*, decidimos gerar uma linhagem resistente à AmB, a partir da cepa M2269 (item 5.7).

Em seis isolados de *L. (V.) braziliensis*, além das cepas H3227 e M2903, os valores de CE<sub>50</sub> desta espécie variaram de  $2,34 \pm 0,48$  a  $15,67 \pm 0,92$  nM (Tabela 5 e Figura 7D), enquanto que as cepas apresentaram valores de CE<sub>50</sub> de  $1,69 \pm 0,05$  e  $13,27 \pm 1,97$  nM para H3227 e M2903 respectivamente (Tabela 5 e Figura 7C). Os isolados que apresentaram o maior e o menor valor de CE<sub>50</sub> foram os isolados ER004 e ER267 respectivamente. Além disso, os valores de CE<sub>90</sub> dos isolados variaram de 6,68 a 53,16 nM. O isolado com o menor valor de CE<sub>90</sub> foi o isolado ER267; enquanto que o isolado ER098 teve o maior valor de CE<sub>90</sub>. Já os valores de CE<sub>90</sub> das cepas H3227 e M2903 foram 3,04 e 53,14 nM respectivamente (Tabela 5).

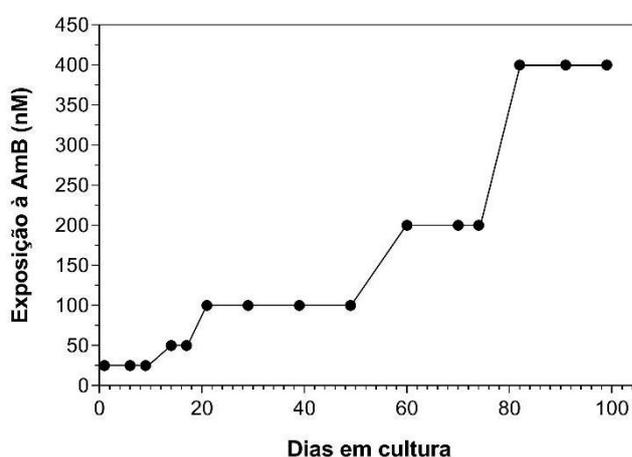
Foi também avaliada a suscetibilidade à AmB do isolado clínico de *L. (V.) guyanensis*, o isolado ER192, cujos valores de CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub> foram  $22,71 \pm 2,64$  nM e 81,69 nM respectivamente. Já a cepa M4147 apresentou um valor de CE<sub>50</sub> de  $4,81 \pm 1,42$  nM e de CE<sub>90</sub> de 9,99 nM. Na Figura 7D, é apresentada uma análise comparativa dos valores de CE<sub>50</sub> dos isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e as respectivas cepas destas espécies na forma amastigota do parasito. Ainda foi avaliado o IS, calculado pela razão da CC<sub>50</sub> =  $127,36 \pm 0,94$  nM e CE<sub>50</sub> de cada um dos isolados clínicos ou cepa da respectiva espécie de *Leishmania* (Tabela 5).

### **5.7 Seleção de uma linhagem resistente à AmB**

A geração de uma linhagem resistente *in vitro* à AmB foi realizada na forma promastigota da cepa selvagem M2269 de *L. (L.) amazonensis*. A seleção iniciou-se na concentração correspondente ao valor de CE<sub>50</sub> desta cepa, cujo valor é de aproximadamente 25 nM (Tabela 5). Foram mantidas pelo menos 3 passagens em cultura nesta concentração e quando a taxa de crescimento desta

linhagem selecionada se assemelhava à cepa selvagem (M2269), dobrava-se a concentração do fármaco, até atingir a concentração de 400 nM. O processo de seleção da linhagem resistente à AmB levou cerca de 100 dias (Figura 9). Uma vez concluído o processo de seleção da linhagem resistente de *L. (L.) amazonensis*, foi determinado o valor de  $CE_{50}$  desta linhagem resistente, denominada de La AmB400. O valor de  $CE_{50}$  desta linhagem foi  $183 \pm 4,37$  nM, enquanto que o valor de  $CE_{90}$  foi de 492,80 nM. Esta linhagem resistente apresentou, portanto, um valor de  $CE_{50}$  sete vezes maior que o valor de  $CE_{50}$  da cepa M2269 (Tabela 6).

Com isso estabelecido, foram selecionados 4 clones da linhagem resistente La AmB400 e os mesmos apresentaram, assim como a sua população, um  $CE_{50}$  superior ao da cepa M2269 na forma promastigota do parasito. Os clones apresentaram valores de  $CE_{50}$  que variaram de  $81,15 \pm 2,58$  a  $136,9 \pm 13,71$  nM (Tabela 6), sendo o clone 4, o que apresentou o maior valor de  $CE_{50}$ , cerca de cinco vezes maior que o  $CE_{50}$  da cepa M2269. O clone 4 (La AmB400 cl. 4) foi então selecionado para os ensaios de suscetibilidade na forma amastigota, apresentando um valor de  $CE_{50}$  de  $24,09 \pm 5,35$  nM e posteriormente utilizado para ensaios *in vivo*.



**Figura 9.** Esquema de seleção gradual da linhagem resistente La AmB400 à AmB. Cada passagem da população de parasitos em cultura é indicada pelos círculos pretos.

**Tabela 6.** Suscetibilidade à AmB *in vitro* da cepa M2269 (La M2269), da linhagem resistente La Amb400 (população) e dos respectivos clones.

Cepa / Linhagem	Promastigota		(n) <sup>1</sup>	Amastigota		(n) <sup>2</sup>	Taxa de infecção (%) <sup>3</sup>
	CE <sub>50</sub> ± DP (nM)	CE <sub>90</sub> (nM)		CE <sub>50</sub> ± DP (nM)	CE <sub>90</sub> (nM)		
La M2269	26,60 ± 1,77	49,30	3	5,88 ± 1,45	27,31	3	65
La Amb400	183 ± 4,37	492,80	3	-	-	-	-
La Amb400 cl. 1	122,7 ± 7,56	269,50	3	-	-	-	-
La Amb400 cl. 2	135,7 ± 13,70	265,00	3	-	-	-	-
La Amb400 cl. 3	81,15 ± 2,58	207,30	3	-	-	-	-
La Amb400 cl. 4	136,9 ± 13,71	307,20	3	24,09 ± 5,35	200,3	3	70

<sup>1</sup> Número de experimentos independentes realizados em triplicata por cepa ou linhagem resistente;

<sup>2</sup> Número de experimentos independentes realizados por cepa ou isolado;

<sup>3</sup> Porcentagem de infecção dos macrófagos derivados de medula óssea;

(-) Dado não determinado.

### 5.8 Avaliação da eficácia *in vivo* da AmB contra *L. (L.) amazonensis* em modelo experimental de LT

Grupos contendo cinco camundongos fêmeas BALB/c cada foram infectados no coxim plantar com a cepa selvagem M2269 de *L. (L.) amazonensis*, a linhagem resistente La Amb400 cl. 4 ou o isolado clínico AAB. O tratamento com AmB foi iniciado após quatro semanas de infecção, no qual os animais infectados com a cepa M2269, a linhagem resistente ou o isolado foram tratados com 1, 5 ou 10 mg/kg/dia de AmB, além de um grupo infectado controle, não tratado com AmB (Figura 10).

Foi observado que os grupos de animais tratados com as dosagens de 5 e 10 mg/kg/dia de AmB apresentaram diminuição no tamanho da lesão a partir da 1ª semana de tratamento dos animais infectados com a cepa M2269, além da diminuição da lesão do grupo tratado com 1 mg/kg/dia a partir da 2ª semana de tratamento (Figura 10A). Ao final do tratamento, houve uma redução no tamanho da lesão dos grupos dos animais tratados com 1, 5 e 10 mg/kg/dia de AmB de 55, 80 e 85% respectivamente (Figura 10B).

Por outro lado, a linhagem resistente La Amb400 e o isolado clínico AAB, não apresentaram redução no tamanho da lesão em nenhum dos grupos tratados, após quatro semanas de tratamento (Figura 10D, E, G e H). Esses dados demonstraram que tanto a linhagem resistente à AmB, quanto o isolado AAB já exposto ao fármaco na clínica, não responderam ao tratamento *in vivo* à AmB. O que nos chamou atenção, foi que o isolado clínico AAB apresentou um crescimento de lesão exacerbado, totalmente refratário à AmB, atingindo um crescimento de lesão próximo a 20 mm no grupo não tratado e nos grupos

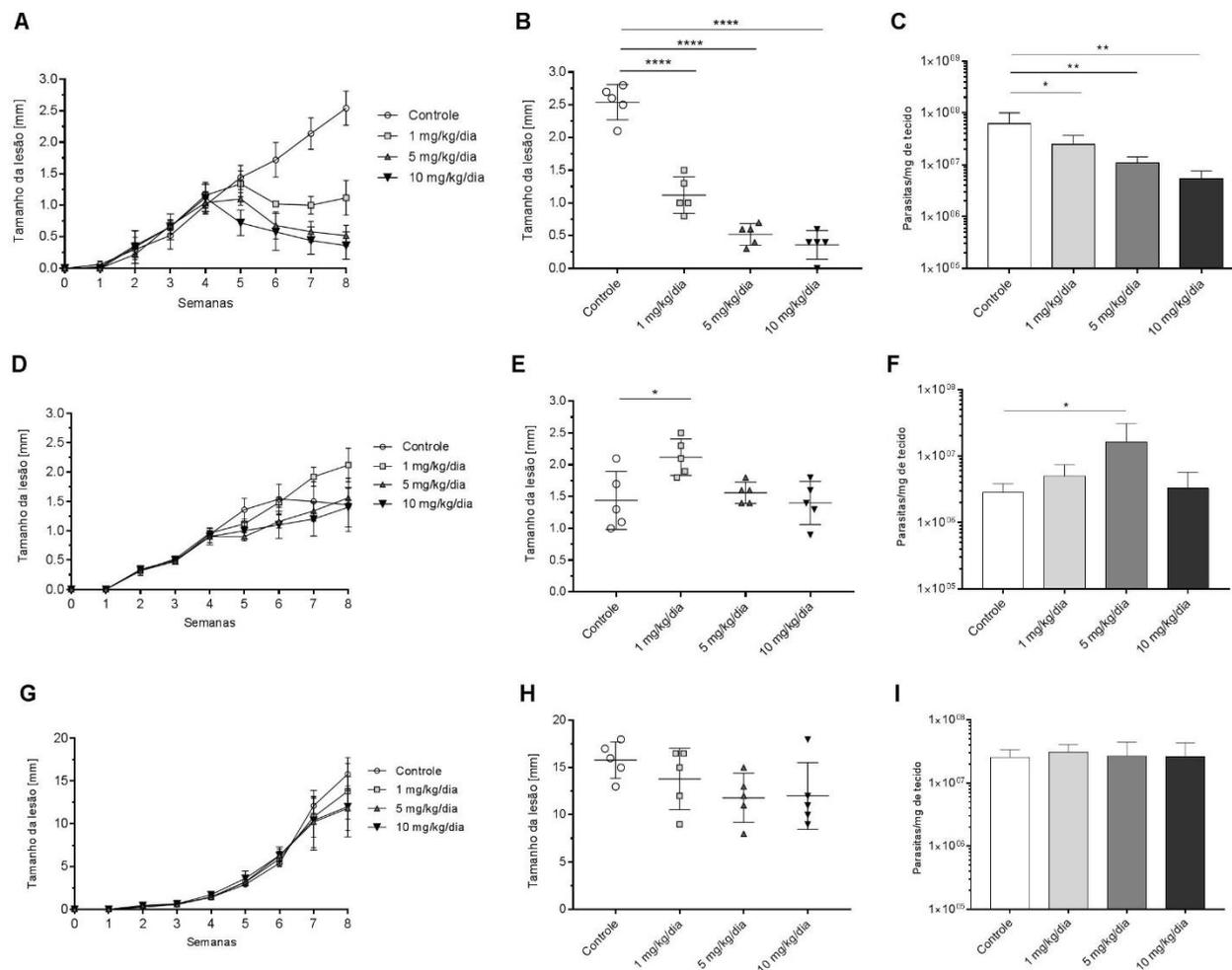
tratados ao final das 8 semanas de experimento (Figura 10G e H). Já os animais infectados com a cepa M2269 ou a linhagem resistente La Amb400 apresentaram tamanho médio de lesão nos grupos não tratados de cerca de 1,5 a 2,5 mm (Figura 10A, B, D e E).

A quantificação da carga parasitária por qPCR indicou que os animais infectados com a cepa M2269 apresentaram redução significativa no número de parasitos nas lesões dos animais tratados com as dosagens de 1, 5 e 10 mg/kg/dia ao final do tratamento, quando comparados com o grupo de animais não tratados (Figura 10C). Foi possível verificar ainda que a redução da carga parasitária nas lesões dos animais infectados e tratados foi dependente da dosagem, ou seja, quanto maior a dosagem de AmB, maior a redução da carga parasitária. Nos animais tratados com 1, 5 e 10 mg/kg/dia de AmB, houve uma redução de 60, 83 e 91% respectivamente na quantidade de parasitos por mg de lesão (Figura 10C). Já a dose efetiva que elimina 50% dos parasitos nas lesões ( $DE_{50}$ ), obtidos no ensaio de qPCR, foi calculada e corresponde a 0,6 mg/kg/dia de AmB. Por outro lado, não houve diminuição na carga parasitária em nenhum dos grupos dos animais infectados com a linhagem resistente ou o isolado clínico tratados com AmB (1, 5 ou 10 mg/kg/dia) (Figura 10F e I), corroborando com os dados do tamanho das lesões ao final do tratamento (Figura 10D, E, G e H).

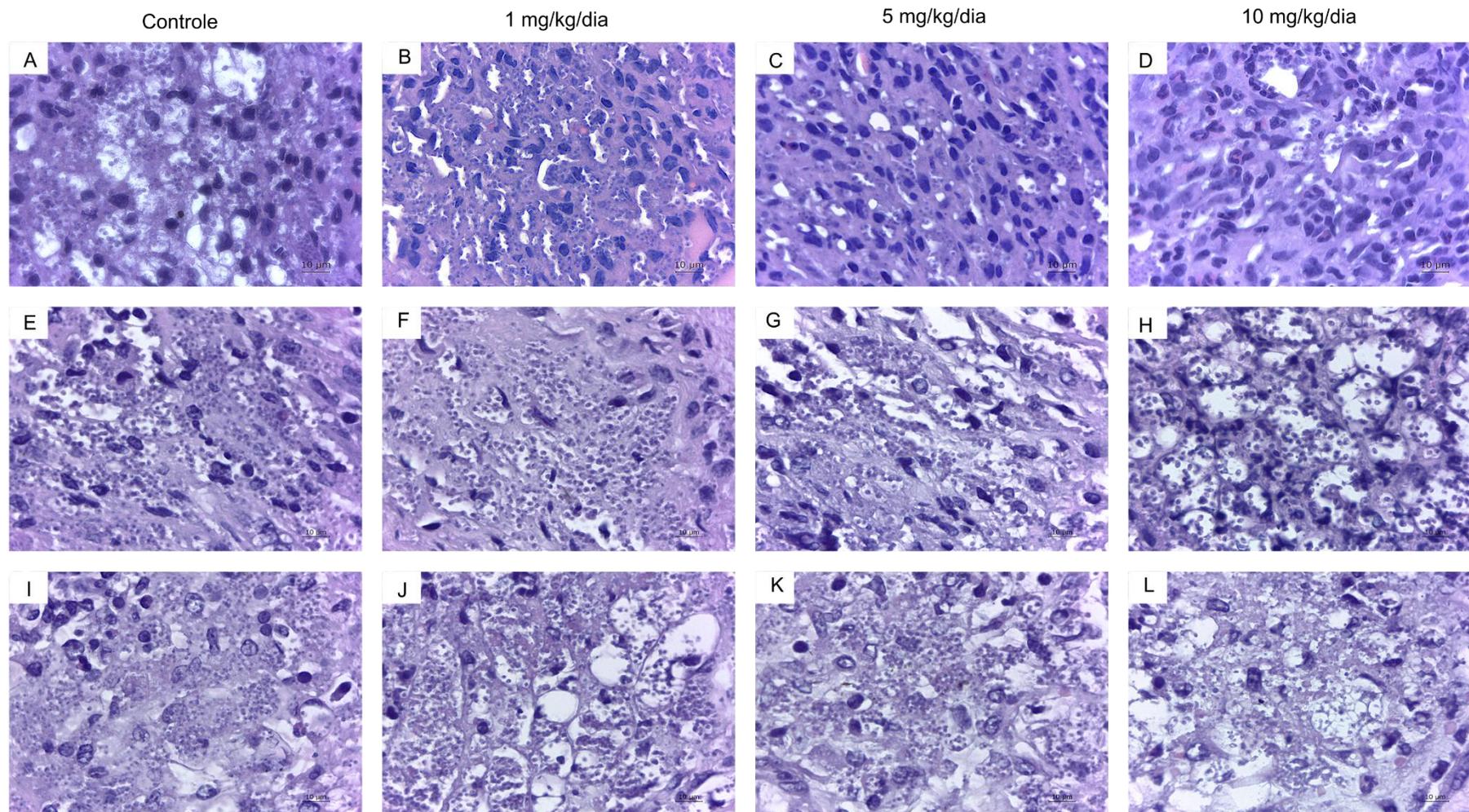
Posteriormente, foi realizada ainda uma análise histopatológica das lesões dos animais infectados com cada uma das três linhagens, tratados ou não com AmB. Para os animais infectados com a cepa M2269, houve redução do número de macrófagos infectados e de amastigotas por macrófago das lesões dos animais tratados, correlacionando com a dosagem do fármaco e quando comparado com os animais não tratados com o fármaco (Figura 11A-D). Como esperado, para a linhagem resistente e o isolado clínico, não houve diminuição de parasitos nos tecidos dos animais tratados, em comparação com as lesões dos animais não tratados (Figura 11). Estes resultados corroboram com os dados do tamanho da lesão e carga parasitária ao final do tratamento (Figura 10).

Para avaliar os possíveis efeitos tóxicos da AmB, os animais de cada grupo tiveram sua massa corpórea determinada antes e após o tratamento de 20 dias com o fármaco (Figura 12). Conforme demonstrado na Figura 12, não houve diferença significativa na massa corpórea média dos grupos de animais não tratados e tratados com AmB. Foram realizados ainda testes bioquímicos

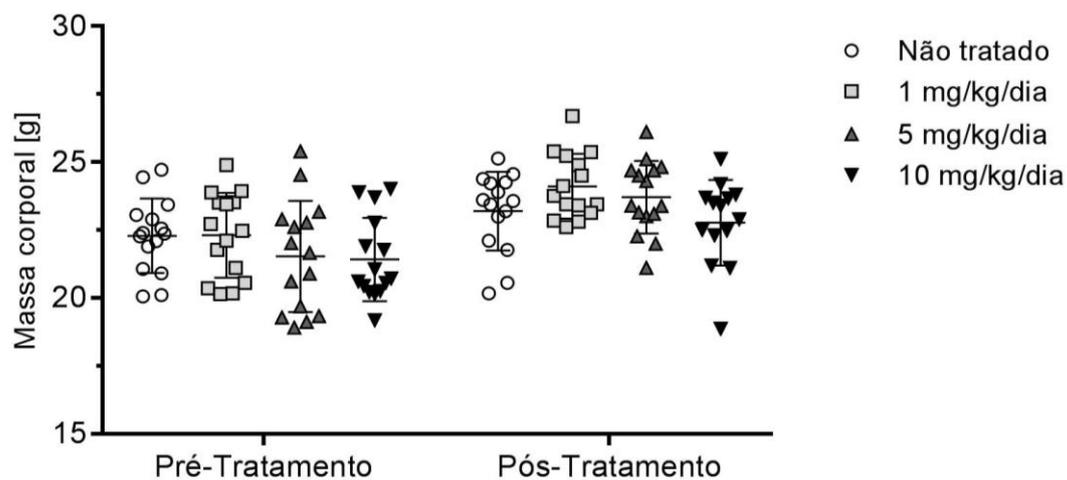
para avaliar a função renal (Creatinina) e a função hepática (ALT e AST) dos grupos tratados com o fármaco (Figura 13). De acordo com a Figura 13, foi possível observar que houve aumento significativo dos níveis séricos apenas da ALT, nas dosagens de 5 e 10 mg/kg/dia de AmB, quando comparado como o grupo de animais não infectados com o parasito. Os dados dos animais não infectados correspondem aos valores de referência previamente descritos (Suckow et al., 2001, Fernandes et al. 2018). Além do aumento dos níveis de ALT, foi observado também que a partir do terceiro dia de tratamento, nos grupos tratados com as concentrações de 5 e 10 mg/kg/dia, que os animais começaram apresentar o pêlo eriçado, sinal associado a dor e desconforto e que pode estar relacionado à toxicidade do fármaco (Neves, 2013).



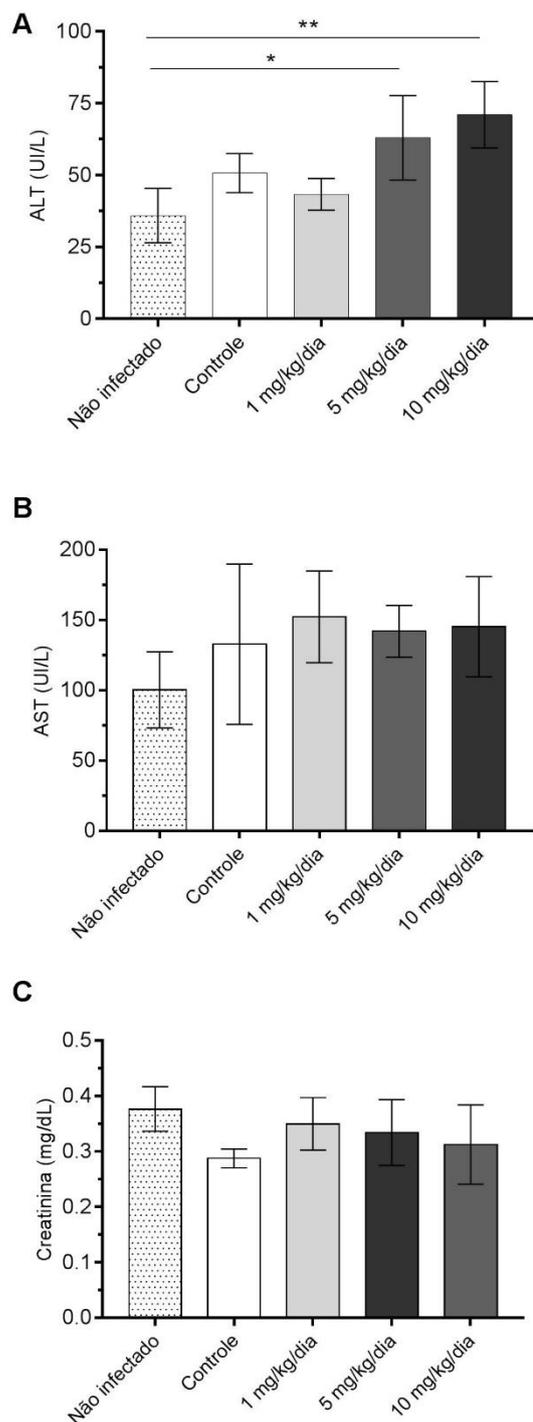
**Figura 10.** Tratamento com AmB em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos foram infectados com promastigotas em fase estacionária de crescimento da cepa selvagem M2269 (A, B e C), da linhagem resistente La Amb400 (D, E e F) e do isolado clínico AAB (G, H e I). Evolução da lesão dos animais ao longo das semanas (A, D e G). O tratamento iniciou na 4ª semana pós-infecção, com dosagens de 1, 5 e 10 mg/kg/dia de AmB via intraperitoneal, durante 20 dias. Média e desvio padrão do tamanho da lesão dos grupos ao final do tratamento (B, E e H). Quantificação da carga parasitária por qPCR ao final do tratamento (C, F e I). A análise estatística foi realizada usando “One-Way ANOVA” com o pós-teste de Tukey e os resultados estatísticos são apresentados para os grupos tratados com AmB em comparação com o grupo controle (Infectados não tratados) (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).



**Figura 11.** Análise histopatológica das lesões de camundongos infectados com a cepa selvagem M2269, a linhagem resistente La Amb400 ou o isolado clínico AAB de *L. (L.) amazonensis*. Imagens representativas do tecido das lesões dos animais não tratados ou tratados com 1, 5 ou 10 mg/kg/dia de AmB, infectados com a cepa M2269 (A, B, C e D respectivamente), a linhagem resistente (E, F, G e H respectivamente) ou o isolado clínico (I, J, K e L respectivamente). Barra: 10 µm.



**Figura 12.** Massa corporal média em gramas (g) dos grupos de animais não tratados (controle) e tratados, pré e pós-tratamento com AmB. Na Figura estão representados a média e o desvio padrão de 15 animais infectados com *L. (L.) amazonensis*. A análise estatística foi realizada usando “*One-Way ANOVA*” com o pós-teste de Tukey e os resultados não foram considerados estatisticamente significante entre os grupos.



**Figura 13.** Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c não infectados, infectados com a cepa M2269 e tratados com AmB (1, 5 ou 10 mg/kg/dia) durante 20 dias. Níveis séricos de ALT (A), AST (B) e creatinina (C) para cada um dos grupos de camundongos (não infectados, infectados [controle] e infectados e tratados com AmB). Na figura estão representados os valores médios e o desvio padrão de 3 animais por grupo. A análise estatística foi realizada usando “One-Way ANOVA” com o pós-teste de Tukey e os resultados estatísticos são apresentados para os grupos tratados com AmB em comparação com o grupo não infectado (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ).

### **5.9 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* da cepa M2269, da linhagem resistente à AmB e do isolado clínico AAB aos demais fármacos utilizados na quimioterapia das leishmanioses**

Após os experimentos *in vivo*, utilizando animais infectados com a cepa M2269, a linhagem resistente La AmB400 ou isolado clínico AAB e tratados com AmB, foi avaliada a suscetibilidade *in vitro* destas linhagens, com o intuito de identificar a possível resistência cruzada aos demais fármacos utilizados na quimioterapia das leishmanioses.

Para o fármaco utilizado como primeira linha no tratamento da leishmaniose no Brasil, foi possível observar que na forma promastigota, os valores de  $CE_{50}$  foram de  $34,23 \pm 3,03 \mu\text{M}$ ,  $36,17 \pm 4,70 \mu\text{M}$  e  $7,56 \pm 2,25 \mu\text{M}$  de SbIII para a cepa M2269, o isolado clínico AAB e a linhagem resistente La AmB400 respectivamente. Como visto, a cepa e o isolado clínico tiveram uma resposta similar ao fármaco, já a linhagem resistente foi cinco vezes mais suscetível ao SbIII quando comparada com a cepa M2269 (Tabela 7). Na forma amastigota, foi possível observar que o isolado AAB apresentou um  $CE_{50}$  de pelo menos duas vezes maior ao valor de  $CE_{50}$  da cepa M2269, enquanto que a linhagem resistente foi aproximadamente 2,6 vezes mais sensível ao SbV, quando comparada com a cepa M2269 (Tabela 7).

Para PEN, foi possível observar que tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota intracelular, não houve diferença significativa nos valores de  $CE_{50}$  entre a cepa M2269, o isolado clínico AAB e a linhagem resistente (Tabela 7).

Para MF, foi possível observar que na forma promastigota, os valores de  $CE_{50}$  foram de  $17,55 \pm 1,41 \mu\text{M}$ ,  $23,96 \pm 0,15 \mu\text{M}$  e  $44,32 \pm 2,12 \mu\text{M}$  de MF para a cepa M2269, o isolado clínico AAB e a linhagem resistente La AmB400 respectivamente. Foi verificado que a cepa e o isolado clínico tiveram valores similares de  $CE_{50}$ , enquanto que a linhagem resistente à AmB apresentou um valor de  $CE_{50}$  de 2,6 vezes maior que o valor de  $CE_{50}$  da cepa M2269 (Tabela 7). Na forma amastigota, foi possível observar que tanto o isolado clínico, como a linhagem resistente foram menos suscetíveis à MF, cujos valores de  $CE_{50}$  foram cerca de cinco e quatro vezes o valor de  $CE_{50}$  da cepa M2269 respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7.** Suscetibilidade *in vitro* nas formas promastigota e amastigota intracelulares da cepa M2269, da linhagem resistente La AmB400 e do isolado clínico AAB aos fármacos utilizados na quimioterapia das leishmanioses.

Fármacos	Promastigota			Amastigota		
	M2269	AAB	La AmB400	M2269	AAB	La AmB400
AmB <sup>1</sup>	29,2 ± 4,46	57,25 ± 4,38	124,73 ± 3,78	5,88 ± 0,78	20,88 ± 2,34	24,09 ± 5,35
SbIII <sup>2</sup>	34,23 ± 3,03	36,17 ± 4,70	7,56 ± 2,25	-	-	-
SbV <sup>2</sup>	-	-	-	511,23 ± 11,35	>1,000	194,3 ± 14,31
PEN <sup>2</sup>	2,68 ± 0,44	1,42 ± 0,39	2,83 ± 0,83	0,19 ± 0,05	0,27 ± 0,07	0,13 ± 0,05
MF <sup>2</sup>	17,55 ± 1,41	23,96 ± 0,15	44,32 ± 2,12	2,04 ± 0,23	9,16 ± 0,92	7,5 ± 0,92

Média do valor de CE<sub>50</sub> ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados por cepa, linhagem resistente ou isolado clínico;

<sup>1</sup> Concentração em nM;

<sup>2</sup> Concentração em µM;

(-) Dado não determinado.

## 6. DISCUSSÃO

Em consequência dos problemas relatados no tratamento da leishmaniose no Brasil, foi investigado neste estudo a suscetibilidade *in vitro* da MF e da AmB em 11 cepas de *Leishmania* spp., representantes das 8 espécies endêmicas responsáveis pela leishmaniose no Brasil, além de um painel de 14 isolados de pacientes com LT, obtidos de um centro de referência para tratamento de leishmaniose. Estes isolados já haviam sido previamente tipados pelo nosso grupo, através do PCR-RFLP do gene *hsp70* conforme previamente descrito (Montalvo et al. 2012, Espada et al. 2018) e do sequenciamento do ITS, sendo 6 isolados tipados como *L. (L.) amazonensis*, 7 isolados tipados como *L. (V.) braziliensis* e um isolado tipado como *L. (V.) guyanensis* (Coser et al. 2020). Os dados prévios de tipagem dos isolados corroboram a predominância destas espécies nos casos de LT no Brasil, uma vez que a maioria dos casos notificados no Brasil são causados principalmente por *L. (V.) braziliensis*, seguido por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (Ministério da Saúde, 2017). Além destas espécies, avaliamos neste estudo, a suscetibilidade *in vitro* desses fármacos contra outras 4 espécies de importância epidemiológica e causadoras da LT no Brasil. Dentre estas espécies incluem *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) lainsoni*, espécies já associadas a casos de LT no Brasil (Silveira et al. 2002, Tojal da Silva et al. 2006, Fagundes-Silva et al. 2015, Cantanhêde et al. 2019, de Almeida et al. 2021).

Inicialmente, foi avaliada a suscetibilidade *in vitro* da MF e AmB nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares do parasito. Para ensaios de suscetibilidade na forma amastigota, foi determinada a taxa de infecção dos isolados e cepas em macrófagos derivados de medula óssea, bem como a citotoxicidade dos respectivos fármacos. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que a MF teve um valor de  $CC_{50}$  de  $49,52 \pm 2,93 \mu\text{M}$ , corroborando dado já descrito na literatura por Espada et al. (2017) ( $CC_{50}$  de  $46,5 \pm 3,9 \mu\text{M}$ ). Já para AmB, foi obtido um valor de  $CC_{50}$  de  $127,36 \pm 0,94 \text{ nM}$ . Em seguida, foi determinada a taxa de infecção em macrófagos derivados de medula óssea dos 14 isolados clínicos e das 11 cepas de *Leishmania* spp. na ausência dos fármacos. A taxa de infecção variou de 18% a 98% para isolados clínicos de *L.*

(*L.*) *amazonensis* e as cepas M2269, PH8 e LV79 e de 50% a 97% para os isolados de *L. (V.) braziliensis* e as cepas M2903 e H3227. Para *L. (V.) guyanensis*, a taxa de infecção do isolado clínico ER192 e da cepa M4147 foi de 75,5% e 90,5% respectivamente. Para as demais cepas de *Leishmania* spp., a taxa de infecção variou de 46% a 70%. Para *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, já foi reportado na literatura uma variação de infectividade de macrófagos derivados de medula óssea de 20% a 99% (Zauli-Nascimento et al. 2010, Espada et al. 2017). Dados semelhantes foram observados por Coser et al. (2020), que utilizou os mesmos isolados e a grande maioria das cepas utilizadas neste estudo, para avaliar a suscetibilidade *in vitro* à paromomicina.

Após obter os dados de citotoxicidade e porcentagem de infecção dos isolados clínicos e das cepas de *Leishmania* spp., foi determinada a atividade *in vitro* da MF nas formas promastigota e amastigotas dos isolados e cepas do parasito. Para este fármaco, os valores de CE<sub>50</sub> apresentaram uma moderada variação. Para *L. (L.) amazonensis*, os valores de CE<sub>50</sub> variaram de 14,17 a 38,66 µM nas formas promastigotas, enquanto que nas formas amastigotas variam de 1,08 a 9,16 µM. Para *L. (V.) braziliensis*, os valores de CE<sub>50</sub> variaram 14,22 a 52,67 µM e 1,40 a 9,60 µM, nas formas promastigotas e amastigotas respectivamente. Ainda para *L. (V.) guyanensis*, os valores de CE<sub>50</sub> foram de 25,75 a 40,41 µM para promastigotas e 4,46 a 5,79 µM em amastigotas. Dados similares de suscetibilidade *in vitro* à MF foram observados em isolados e cepas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, em ambas as formas do parasito (Coelho et al. 2014, Espada et al. 2017, Yardley et al. 2005, Espada et al. 2019). Nas demais cepas utilizadas de *Leishmania* spp. [*L. (V.) shawi*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) lindenbergi*; *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) infantum*], os valores de CE<sub>50</sub> variaram de 11,43 a 33,05 µM de MF nas formas promastigotas e nas formas amastigotas variaram de 1,19 a 1,91 µM. Dentre as espécies avaliadas, a mais suscetível na forma promastigota à MF foi *L. (V.) lainsoni* (M6426) e a menos suscetível foi *L. (V.) braziliensis* (M2903), enquanto que nas formas amastigotas do parasito, a mais suscetível foi *L. (V.) lindenbergi* (M15732) e a menos suscetível foi a cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis*. No caso de isolados clínicos do Peru, uma maior variação de suscetibilidade à MF foi observada em amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, cujos valores variaram de 4,65 a > 73,5 µM (Yardley et al. 2005). Em um estudo

realizado na Bolívia, foi avaliada a atividade da MF em isolados das seguintes espécies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) lainsoni*. Os dados obtidos demonstraram uma variação de 6,88 a 44,1  $\mu\text{M}$  nas formas promastigotas e 20,2 a 57,03  $\mu\text{M}$  nas formas amastigotas, sendo *L. (L.) mexicana* a mais suscetível, seguida por *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) braziliensis* ao fármaco MF (Bilbao-Ramos et al. 2017).

Além disso, foi também determinado a atividade *in vitro* da AmB nas formas promastigota e amastigota dos isolados clínicos e cepas de *Leishmania* spp. Para a forma promastigota, os valores de  $\text{CE}_{50}$  da AmB dos isolados e cepas de *L. (L.) amazonensis* variaram de 18,88 a 57,25 nM e na forma amastigota, os valores variaram de 1,94 a 21,63 nM. Para *L. (V.) braziliensis*, os valores de  $\text{CE}_{50}$  variaram de 16,72 a 25,26 nM e 1,69 a 15,67 nM em promastigotas e amastigotas respectivamente. Em um estudo realizado por Zauli-Nascimento et al. 2010, foi avaliada a atividade da AmB na forma promastigota de 13 isolados de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Os dados demonstraram que estes isolados foram uniformemente suscetíveis *in vitro* à AmB, variando de 59,4 a 89,64 nM e 49,68 a 99,36 nM, para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* respectivamente, embora os valores de  $\text{CE}_{50}$  tenham sido maiores do que aqueles encontrados para os isolados destas espécies avaliados neste estudo. Dados similares foram reportados na literatura na forma promastigota de um pequeno número de isolados de *L. (V.) braziliensis* (27,5 a 50,9 nM) (Espada et al. 2019). Ainda para *L. (V.) guyanensis*, os valores de  $\text{CE}_{50}$  foram de 16,65 a 33,01 nM para promastigotas e 4,81 a 22,71 nM em amastigotas. O isolado ER192 tipado como *L. (V.) guyanensis* apresentou um valor de  $\text{CE}_{50}$  maior que a cepa M4147 e isso correlaciona a baixa suscetibilidade do isolado à AmB, cujo valor de  $\text{CE}_{50}$  foi cinco vezes maior que o  $\text{CE}_{50}$  da cepa M4147. Nas demais cepas utilizadas de *Leishmania* spp. [*L. (V.) shawi*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) lindenbergi*; *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) infantum*], os valores de  $\text{CE}_{50}$  variaram de 12,89 a 62,36 nM de AmB na forma promastigota, enquanto que na forma amastigota, os valores variaram de 4,04 a 18,8 nM. Dentre as espécies avaliadas, a mais suscetível à AmB foi *L. (V.) lindenbergi* (M15732) em ambas as formas do parasito, já a menos suscetível na forma promastigota foi *L. (V.) lainsoni* (M6426) e na forma amastigota *L. (L.) amazonensis* (cepa PH8). A atividade da AmB foi avaliada também em um estudo com isolados de pacientes

da Bolívia das seguintes espécies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) lainsoni*. Os dados obtidos demonstraram uma variação de 5 a 7,02 nM na forma promastigota e de 3,46 a 12,74 nM na forma amastigota, sendo *L. (V.) braziliensis* a mais sensível, seguida por *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) mexicana* (Bilbao-Ramos et al. 2017).

Os ensaios de suscetibilidade *in vitro* da MF e da AmB demonstraram ainda que ambos os fármacos apresentaram maior atividade na forma amastigota quando comparados com a forma promastigota do parasito, corroborando uma série de estudos já descrito na literatura (Zauli-Nascimento et al. 2010, Mesquita et al. 2014, Espada et al. 2013, Ribeiro-Dias et al. 2017). Além disso, os dados descritos na literatura, juntamente àqueles descritos neste estudo, indicam a existência variações intra e interespecies do parasito e que podem eventualmente afetar a resposta ao tratamento para ambos os fármacos. É importante ressaltar que esses isolados nunca foram expostos à MF ou à AmB, indicando que a suscetibilidade a esses fármacos é intrínseca a esses isolados, com exceção do isolado clínico AAB que já havia sido exposto à AmB durante o tratamento do paciente (Corrêa Soares et al. 2020). A correlação entre a falha ou a resposta ao tratamento com esses fármacos e a suscetibilidade *in vitro* ainda é incerta, com algumas evidências sugerindo a seleção de parasitos resistentes após a exposição à MF (Bhandari et al. 2012, Cojean et al. 2012, Obonaga et al. 2014). Neste cenário, a recente aprovação da MF para o tratamento da LT no Brasil, pode favorecer a seleção de parasitos resistentes em pacientes tratados com este fármaco. O monitoramento da suscetibilidade *in vitro* à MF de isolados provenientes de pacientes que não responderam ao tratamento será essencial para validar esta hipótese.

Em relação à AmB, ainda não havia estudos descritos na literatura correlacionando a falha terapêutica e a baixa suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos, que pode ser explicado em parte pela alta eficácia da AmB no tratamento da LT, cujas taxas variam de 88 a 97% (Solomon et al. 2007, Rocio et al. 2014). O isolado clínico AAB, tipado como *L. (L.) amazonensis*, apresentou baixa suscetibilidade *in vitro* à AmB e à MF em ambas as formas do parasito, quando comparado com a cepa de *L. (L.) amazonensis* M2269. Conforme mencionado previamente, este isolado, diferentemente dos demais isolados utilizados neste estudo, foi obtido após o tratamento do paciente, além de se

tratar de um quadro de LCD e coinfeção pelo vírus HIV (Corrêa Soares et al. 2020). O paciente infectado com este isolado passou por um curso de tratamento inicial de 4 mg/kg de AmB-L durante 10 dias e uso profilático de 10 mg/kg de SbV por 2 meses (Corrêa Soares et al. 2020). Não houve resposta ao tratamento inicial, e o paciente passou para o segundo curso de tratamento com uma combinação de 4 mg/kg de AmB-L e 4 mg/kg de PEN por 10 dias. Devido a ausência de resposta, o paciente passou para um terceiro curso de tratamento, apenas com PEN na dosagem de 4 mg/kg, respondendo neste curso ao tratamento (Corrêa Soares et al. 2020). Nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* na forma amastigota, o isolado clínico AAB foi menos suscetível à AmB, cujo valor de  $CE_{50}$  foi de cerca de quatro vezes maior quando comparado com a cepa M2269. Estes dados sugerem que a baixa suscetibilidade à AmB pode ser explicada pela exposição prévia ao fármaco, durante o tratamento do paciente que não respondeu ao mesmo, sugerindo uma possível resistência adquirida durante o tratamento do paciente ou ainda uma resistência intrínseca deste isolado, não diretamente associada ao tratamento clínico. Para a confirmação destes achados, seria necessário, neste caso, avaliar a suscetibilidade *in vitro* deste isolado à AmB antes do tratamento do paciente, no entanto, esta análise não seria possível de ser feita, pois como dito anteriormente, o parasito foi isolado apenas após a exposição ao tratamento.

Considerando a baixa suscetibilidade *in vitro* à AmB do isolado AAB, foi investigada a eficácia *in vivo* deste fármaco em modelo de camundongo BALB/c. Considerando uma possível falha no tratamento com AmB dos animais infectados com o isolado AAB, foi gerada uma linhagem resistente à AmB (La AmB400), a partir da cepa M2269, para comparar a eficácia da AmB *in vivo*. Para os animais infectados com a cepa M2269, ao final do tratamento com AmB, houve uma redução significativa no tamanho da lesão e na da carga parasitária dos animais tratados com 1, 5 e 10 mg/kg/dia de AmB em comparação com o grupo controle não tratado. Os dados demonstraram que a AmB atuou de forma dose dependente, ou seja, a atividade antiparasitária do fármaco aumenta conforme o aumento da dosagem. O tratamento com 10 mg/kg/dia de AmB diminuiu em cerca de 10 vezes a carga parasitária por mg de lesão quando comparado com o grupo controle, embora ainda tenha parasitos nas lesões dos animais tratados com esta dosagem. Em estudo realizado por Reimão et al.

(2013), a eficácia da AmB foi avaliada *in vivo* em camundongos infectados com a cepa M2269 nas dosagens de 1,2, 2 e 4 mg/kg/dia por 20 dias. De maneira similar, os camundongos tratados apresentaram reduções nos tamanhos das lesões e na carga parasitária de maneira dose dependente (Reimao et al. 2013). Neste estudo, a quantificação da carga parasitária foi realizada através de bioluminescência, gerada a partir linhagens recombinantes de *L. (L.) amazonensis* expressando o gene da luciferase, o que permitiu avaliar a eficácia 4 semanas após o final do tratamento com AmB. Neste caso, os sinais clínicos de todos os grupos pioraram (tamanho da lesão e carga parasitária), indicando que nenhum esquema de tratamento utilizado foi completamente eficaz (Reimao et al. 2013). Os resultados apresentados nesta dissertação demonstraram a presença de parasitos ao final do tratamento nos animais infectados e tratados, mesmo na dosagem mais alta de AmB (10 mg/kg/dia), indicando que uma piora dos sinais clínicos também deveria ser observada nesses animais. Reimão et al. (2013) ainda determinaram os valores de DE<sub>50</sub> utilizando diferentes metodologias. Para o tamanho da lesão, quantificação de luciferase (*in vivo* e *ex vivo*) e diluição limitante, os valores de DE<sub>50</sub> obtidos variaram de 1,19 a 2,86 mg/kg/dia, enquanto que neste trabalho, o valor de DE<sub>50</sub> foi de 0,6 mg/kg/dia através da quantificação de parasitos por mg de tecido feita por qPCR. Apesar das técnicas serem distintas, os valores de DE<sub>50</sub> obtidos por Reimão et al. (2013) e aquele apresentado neste estudo foram similares.

Os grupos de animais infectados com a linhagem resistente La AmB400 ou isolado clínico AAB, tratados com AmB, não apresentaram redução no tamanho da lesão e na carga parasitária, em nenhum dos grupos tratados durante os 20 dias tratamento. Esses dados demonstraram que tanto a linhagem resistente à AmB, quanto o isolado clínico AAB já exposto ao fármaco na clínica, não responderam ao tratamento *in vivo* à AmB. Ainda é incerto os possíveis fatores que possam explicar a não resposta ao tratamento dos animais infectados com ambas as linhagens. Diversos estudos já demonstraram que a resistência à AmB em *Leishmania* se dá por mutações e/ou alterações estruturais em genes associados a biossíntese de ergosterol (Mbongo et al. 1998, Mwenechanya et al. 2017, Bansal et al. 2019, Ning et al. 2020, Morelle et al. 2021), o principal esterol de membrana de tripanossomatídeos (Goad et al. 1984, Urbina 1997). Em um estudo realizado por Mbongo et al. (1998) por

exemplo, foi selecionada uma linhagem resistente *in vitro* à AmB na forma promastigota de *L. (L.) donovani*. Foi observado que a resistência ao fármaco está associada a alterações na composição lipídica de membrana. No caso da linhagem resistente, os ácidos graxos saturados foram prevalentes, e o principal esterol foi um precursor do ergosterol, o colest-5, 7, 24-trien-3 $\beta$ -ol e não o ergosterol como na cepa selvagem suscetível à AmB. Neste estudo, também foi demonstrado que a resistência à AmB ocasiona mudanças na fluidez da membrana, conseqüentemente afetando a afinidade da AmB com a membrana plasmática do parasito (Mbongo et al. 1998). Em *L. (L.) mexicana*, foi demonstrado que mutações no gene que codifica a enzima esterol 14-demetilase estão associadas ao fenótipo de resistência à AmB (Mwenechanya et al. 2017).

Nos experimentos *in vivo*, investigamos ainda a possibilidade de encontrar sinais de toxicidade ao tratamento com AmB. Foi avaliado, primeiramente, se houve diferença significativa na massa corpórea dos animais, antes e após o tratamento com AmB e os dados demonstraram que as dosagens utilizadas não afetaram a massa corpórea destes grupos. Avaliamos também os níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT, além de creatinina em animais não infectados, infectados e tratados ou não com as dosagens de 1, 5 e 10 mg/kg/dia de AmB. Foi encontrada alteração significativa nos níveis de ALT nos animais tratados com as dosagens de 5 e 10 mg/kg/dia, indicando que o fármaco pode estar causando dano hepático nesses animais. Além da alteração nos níveis de ALT, foi também observado nos grupos tratados com 5 e 10 mg/kg/dia de AmB que a partir do terceiro dia de tratamento, os animais apresentaram pêlo eriçado. Em um estudo realizado por Morelle et al. (2021), foi comparada a atividade *in vivo* da AmB convencional e três de seus derivados (AmBisome, AmB amino-ureia e AmB metil-ureia) em animais infectados com *L. (L.) donovani*. O estudo demonstrou que tanto a AmB, como seus derivados não apresentaram toxicidade renal. No entanto, a AmB amino-ureia nas concentrações de 4 e 8 mg/kg exibiu toxicidade hepática, com aumento dos níveis séricos da enzima ALT (Morelle et al. 2021).

Recentemente, foi avaliada a eficácia de duas formulações lipossomais de AmB (Fungisome e AmBisome) em animais infectados com *L. (L.) major* e tratados com dosagens intravenosas de 5, 10 ou 15 mg/kg/dia durante 10 dias. A dosagem de 15 mg/kg/dia de Fungisome mostrou-se tóxica,

levando ao óbito dos animais tratados com esta dosagem. Foi observada a redução da carga parasitária dos animais tratados com 5 e 10 mg/kg/dia de Fungisome, não havendo diferenças significativa da carga parasitária quando comparadas com as mesmas dosagens de AmBisome. Contudo, os animais tratados com 15 mg/kg/dia de AmBisome, permaneceram vivos, demonstrando que a AmBisome é menos tóxica que a Fungisome (Wijnant et al. 2018). Sabe-se que ambas as formulações lipossomais são menos tóxicas e melhor toleradas do que a AmB convencional (desoxicolato de AmB) (Tonin et al. 2017).

Após avaliar a atividade *in vivo* da AmB contra a cepa M2269 de *L. (L.) amazonensis*, a linhagem resistente La AmB400 e o isolado clínico AAB, foi averiguada a possibilidade de resistência cruzada aos demais fármacos utilizados no tratamento da LT no Brasil. Na forma amastigota, o isolado clínico AAB, naturalmente resistente à AmB, mostrou-se menos suscetível à MF e ao SbV quando comparado com a cepa M2269. No caso da MF, o valor de  $CE_{50}$  foi 5 vezes maior que o valor de  $CE_{50}$  da cepa M2269. Portanto, apesar de nunca ter sido exposto ao fármaco, o isolado AAB apresentou resistência à MF. Resultados similares foram descritos por Coelho et al. (2014) que determinaram a suscetibilidade *in vitro* à MF de um isolado de paciente com LCD. Uma baixa suscetibilidade à MF em ambas as formas do parasito foi observada, quando comparada com a cepa M2269. No entanto, os resultados de suscetibilidade *in vitro* não foram diretamente correlacionados com os achados *in vivo* (Coelho et al. 2014). Neste caso, a MF foi eficaz no tratamento de camundongos infectados tanto com a cepa de *L. (L.) amazonensis* M2269, quanto com o isolado clínico (Coelho et al. 2014). Os animais apenas foram refratários ao tratamento com MF quando infectados com uma linhagem resistente selecionada *in vitro*, derivada da cepa M2269 e que continha uma mutação no gene que codifica o MT (Coelho et al. 2014). Com base nesses dados, seria interessante avaliar a eficácia *in vivo* da MF em camundongos infectados com o isolado AAB.

Interessantemente, a linhagem resistente selecionada *in vitro* à AmB (La AmB400), de maneira similar ao isolado AAB, mostrou-se resistente à MF, cujo valor de  $CE_{50}$  foi 4 vezes maior que o valor de  $CE_{50}$  da cepa M2269. Resultados similares foram descritos na literatura por Fernandez-Prada et al. (2016) que demonstraram que uma linhagem resistente à AmB de *L. (L.) infantum* selecionada *in vitro*, apresentava resistência cruzada à MF. Foi

observada a presença de mutações no gene do MT nesta linhagem resistente, que contribuíram com mudanças importantes em vários tipos de lipídios de membrana (Fernandez-Prada et al. 2016). Os principais lipídios alterados foram fosfolipídios, alguns dos quais enriquecidos, como ácidos graxos ciclopropanados e inositol fosfatoceramidas (Fernandez-Prada et al. 2016).

Finalmente, os resultados obtidos fornecem dados sobre as limitações do uso da AmB e da MF na clínica para o tratamento da LT no Brasil. Além disso, o monitoramento da suscetibilidade de isolados clínicos a esses fármacos, pode ser útil para a detecção de parasitos resistentes em áreas endêmicas, fornecendo subsídios para estudos de associação de fármacos ou ainda para a investigação de alternativas para a quimioterapia das leishmanioses.

## 7. CONCLUSÃO

Por meio do estudo da avaliação da atividade da MF (*in vitro*) e da AmB (*in vitro* e *in vivo*) em isolados clínicos e cepas das espécies causadoras da LT no Brasil, concluiu-se que:

- Os ensaios *in vitro* de suscetibilidade à AmB e à MF nas formas promastigotas e amastigotas dos isolados clínicos e cepas de *Leishmania* spp. indicaram uma moderada variação de suscetibilidade a esses fármacos.
- Para ambos os fármacos (MF e AmB), os ensaios *in vitro* contra a forma amastigota intracelular demonstraram ser mais ativos do que na forma promastigota.
- A linhagem resistente à AmB gerada *in vitro* a partir da cepa M2269 de *L. (L.) amazonensis* apresentou um valor de CE<sub>50</sub> de pelo menos quatro vezes maior que o valor de CE<sub>50</sub> da cepa M2269 em ambas as formas do parasito.
- A AmB apresentou atividade *in vivo* contra *L. (L.) amazonensis* de forma dose dependente para a cepa M2269. A dosagem mais alta (10 mg/kg/dia) foi a que apresentou maior atividade antiparasitária, mas a mesma não foi capaz de eliminar completamente os parasitos da lesão.
- Os animais infectados com o isolado clínico AAB ou a linhagem resistente La AmB400 não apresentaram redução significativa no tamanho da lesão e nem na carga parasitária em nenhum dos grupos tratados com AmB (1, 5 ou 10 mg/kg/dia).
- O isolado clínico AAB e a linhagem resistente La AmB400 apresentaram resistência cruzada à MF *in vitro*.

## 8. REFERÊNCIAS

- Adaui, V., L. F. Lye, N. S. Akopyants, M. Zimic, A. Llanos-Cuentas, L. Garcia, I. Maes, S. De Doncker, D. E. Dobson, J. Arevalo, J. C. Dujardin and S. M. Beverley (2016). "Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia." J Infect Dis **213**(1): 112-121.
- 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., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez and J. Moreno (2008). "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years." Clin Microbiol Rev **21**(2): 334-359, table of contents.
- 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.
- Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses." Int J Parasitol **30**(12-13): 1269-1281.
- Ashutosh, S. Sundar and N. Goyal (2007). "Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*." J Med Microbiol **56**(Pt 2): 143-153.
- Balaña-Fouce, R., R. M. Reguera, J. C. Cubría and D. Ordóñez (1998). "The pharmacology of leishmaniasis." Gen Pharmacol **30**(4): 435-443.
- Bansal, R., S. S. Sen, R. Muthuswami and R. Madhubala (2019). "A Plant like Cytochrome P450 Subfamily CYP710C1 Gene in *Leishmania donovani* Encodes Sterol C-22 Desaturase and its Over-expression Leads to Resistance to Amphotericin B." PLoS Negl Trop Dis **13**(4): e0007260.
- Barratt, G., M. Saint-Pierre-Chazalet and P. M. Loiseau (2009). "Cellular transport and lipid interactions of miltefosine." Curr Drug Metab **10**(3): 247-255.
- Barral, A.; Costa, J. (Ed.). *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. Salvador: CNPq: Fiocruz-BA, 2011.
- 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.

Bhattacharya, S. K., T. K. Jha, S. Sundar, C. P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, K. Junge, J. Karbwang, A. D. Bryceson and J. D. Berman (2004). "Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India." Clin Infect Dis **38**(2): 217-221.

Bhandari, V., A. Kulshrestha, D. K. Deep, O. Stark, V. K. Prajapati, V. Ramesh, S. Sundar, G. Schonian, J. C. Dujardin and P. Salotra (2012). "Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **6**(5): e1657.

Bilbao-Ramos, P., M. A. Dea-Ayuela, O. Cardenas-Alegría, E. Salamanca, J. A. Santalla-Vargas, C. Benito, N. Flores and F. Bolás-Fernández (2017). "Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: Species identification, phylogeography and drug susceptibility implications." Acta Trop **176**: 150-161.

Brajtburg, J. and J. Bolard (1996). "Carrier effects on biological activity of amphotericin B." Clin Microbiol Rev **9**(4): 512-531.

Brochu, C., J. Wang, G. Roy, N. Messier, X. Y. Wang, N. G. Saravia and M. Ouellette (2003). "Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3073-3079.

Cantanhêde, L. M., C. B. Mattos, C. de Souza Ronconi, C. P. B. Filgueira, C. F. da Silva Júnior, C. Limeira, H. P. de Jesus Silva, G. E. M. Ferreira, R. Porrozz, 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.

Carnielli, J. B. T., R. Monti-Rocha, D. L. Costa, A. Molina Sesana, L. N. N. Pansini, M. Segatto, J. C. Mottram, C. H. N. Costa, S. F. G. Carvalho and R. Dietze (2019). "Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil." Am J Trop Med Hyg **101**(4): 789-794.

Castilho, T. M., L. M. Camargo, D. McMahon-Pratt, J. J. Shaw and L. M. Floeter-Winter (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**(1): 122-132.

CDC (2017). Leishmaniose. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 25 out 2020.

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

Coelho, A. C., S. M. Beverley and P. C. Cotrim (2003). "Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 83-90.

Coelho, A. C., S. Boisvert, A. Mukherjee, P. Leprohon, J. Corbeil and M. Ouellette (2012). "Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1512.

Coelho, A. C., N. Messier, M. Ouellette and P. C. Cotrim (2007). "Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*." Antimicrob Agents Chemother **51**(8): 3030-3032.

Coelho, A. C., C. T. Trinconi, C. H. Costa and S. R. Uliana (2014). "*In vitro* and *in vivo* miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **8**(7): e2999.

Cojean, S., S. Houzé, D. Haouchine, F. Huteau, S. Lariven, V. Hubert, F. Michard, C. Bories, F. Pratlong, J. Le Bras, P. M. Loiseau and S. Matheron (2012). "*Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker." Emerg Infect Dis **18**(4): 704-706.

Corrêa Soares, G. H., A. Silva, L. S. S. Ferreira, J. S. Ithamar, G. A. Medeiros, S. R. F. Pereira, M. I. S. Lima and E. S. d. A. CMP (2020). "Case Report: Coinfection by *Leishmania amazonensis* and HIV in a Brazilian Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Patient." Am J Trop Med Hyg **103**(3): 1076-1080.

Coser, E. M., B. A. Ferreira, N. Branco, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2020). "Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility *in vitro* and the treatment outcome *in vivo*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **14**: 91-98.

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.

Das, M., P. Saudagar, S. Sundar and V. K. Dubey (2013). "Miltefosine-unresponsive *Leishmania donovani* has a greater ability than miltefosine-responsive *L. donovani* to resist reactive oxygen species." Febs j **280**(19): 4807-4815.

de Almeida, J. V., C. F. de Souza, A. A. Fuzari, C. A. Joya, H. O. Valdivia, D. C. Bartholomeu and R. P. Brazil (2021). "Diagnosis and identification of *Leishmania* species in patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region." Parasit Vectors **14**(1): 32.

de Paula, C. D., J. H. Sampaio, D. R. Cardoso and R. N. Sampaio (2003). "A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mgSb<sup>V</sup>/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis." Rev Soc Bras Med Trop **36**(3): 365-371.

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

Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff and S. N. Moreno (2005). "Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man." Nat Rev Microbiol **3**(3): 251-261.

Donovick, R., W. Gold, J. F. Pagano and H. A. Stout (1955). "Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vitro* studies." Antibiot Annu **3**: 579-586.

Dorlo, T. P., M. Balasegaram, J. H. Beijnen and P. J. de Vries (2012). "Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis." J Antimicrob Chemother **67**(11): 2576-2597.

Dorlo, T. P., S. Rijal, B. Ostyn, P. J. de Vries, R. Singh, N. Bhattarai, S. Uranw, J. C. Dujardin, M. Boelaert, J. H. Beijnen and A. D. Huitema (2014). "Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure." J Infect Dis **210**(1): 146-153.

Eichenberger, A., A. E. Buechi, A. Neumayr, C. Hatz, A. Rauch, M. Huguenot, E. Diamantis-Karamitopoulou and C. Staehelin (2017). "A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure." BMC Infect Dis **17**(1): 81.

El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., Roy, G., Guimond, C., Trudel, N., ... Ouellette, M. (2005). Role of the ABC Transporter MRPA (PGPA) in Antimony Resistance in *Leishmania infantum* Axenic and Intracellular Amastigotes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **49**(5), 1988–1993.

Escobar, P., S. Matu, C. Marques and S. L. Croft (2002). "Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B." Acta Trop **81**(2): 151-157.

Espada, C. R., E. V. C. Levatti, M. C. Boité, D. Lamounier, J. Alvar, E. Cupolillo, C. H. N. Costa, J. Rode and S. R. B. Uliana (2021). "*In Vitro* Susceptibility to Miltefosine of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) Isolates from Different Geographical Areas in Brazil." Microorganisms **9**(6).

Espada, C. R., R. M. Magalhães, M. C. Cruz, P. R. Machado, A. Schriefer, E. M. Carvalho, V. Hornillos, J. M. Alves, A. K. Cruz, A. C. Coelho and S. R. B. Uliana (2019). "Investigation of the pathways related to intrinsic miltefosine tolerance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates reveals differences in drug uptake." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **11**: 139-147.

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.

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., Ferreira, B. A., Ortiz, P. A., Uliana, S. R. B., & Coelho, A. C. (2021). Full nucleotide sequencing of ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Brazil and its potential for species typing. Acta Tropica, 223, 106093.

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., M. M. L. Pimentel, F. A. D. Santos, A. Praxedes É, P. D. Brito, M. A. Lima, I. Lelis, M. F. Macedo and M. B. Bezerra (2018). "Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft." An Acad Bras Cienc **90**(4): 3941-3948.

Fernandez-Prada, C., I. M. Vincent, M. C. Brotherton, M. Roberts, G. Roy, L. Rivas, P. Leprohon, T. K. Smith and M. Ouellette (2016). "Different Mutations in a P-type ATPase Transporter in *Leishmania* Parasites are Associated with Cross-resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms." PLoS Negl Trop Dis **10**(12): e0005171.

Filippin F. B., Souza. L. C. (2006). Therapeutic efficiency of lipid formulations of amphotericin B. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences **42**(2).

Goad, L. J., G. G. Holz, Jr. and D. H. Beach (1984). "Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis." Mol Biochem Parasitol **10**(2): 161-170.

Harhay, M. O., P. L. Olliaro, D. L. Costa and C. H. Costa (2011). "Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil." Trends Parasitol **27**(9): 403-409.

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.

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.

Janknegt, R., S. de Marie, I. A. Bakker-Woudenberg and D. J. Crommelin (1992). "Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. Clinical pharmacokinetics." Clin Pharmacokinet **23**(4): 279-291.

Jeronimo, S. M., P. Duggal, R. F. Braz, C. Cheng, G. R. Monteiro, E. T. Nascimento, D. R. Martins, T. M. Karplus, M. F. Ximenes, C. C. Oliveira, V. G. Pinheiro, W. Pereira, J. M. Peralta, J. Sousa, I. M. Medeiros, R. D. Pearsoni, T. L. Burns, E. W. Pugh and M. E. Wilson (2004). "An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil." Scand J Infect Dis **36**(6-7): 443-449.

Jeronimo, S. M., R. M. Oliveira, S. Mackay, R. M. Costa, J. Sweet, E. T. Nascimento, K. G. Luz, M. Z. Fernandes, J. Jernigan and R. D. Pearson (1994). "An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg **88**(4): 386-388.

Kaur, G. and B. Rajput (2014). "Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *leishmania*." J Parasitol Res **2014**: 726328.

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

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.

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.

Léonard, A. and G. B. Gerber (1996). "Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds." Mutat Res **366**(1): 1-8.

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.

Maltezou, H. C. (2010). "Drug resistance in visceral leishmaniasis." J Biomed Biotechnol **2010**: 617521.

Mandal, S., M. Maharjan, S. Singh, M. Chatterjee and R. Madhubala (2010). "Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India." J Antimicrob Chemother **65**(3): 496-507.

Manzano, J. I., R. Garcia-Hernandez, S. Castanys and F. Gamarro (2013). "A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to

antimony." Antimicrob Agents Chemother **57**(8): 3719-3730.

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.

Marquis, N., B. Gourbal, B. P. Rosen, R. Mukhopadhyay and M. Ouellette (2005). "Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*." Mol Microbiol **57**(6): 1690-1699.

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

Mbongo, N., P. M. Loiseau, M. A. Billion and M. Robert-Gero (1998). "Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **42**(2): 352-357.

Mesquita, J. T., A. G. Tempone and J. Q. Reimão (2014). "Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, 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?ption=comcontent&view=article&id=11324&catid=723&Itemid=250>. Acesso em: 25 out 2020.

Ministério da Saúde (2009). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica 7ª edição. Brasília- DF.

Ministério da Saúde (2017). Manual da Leishmaniose Tegumentar. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manualvigilancialeshmaniosetegumentar.pdf>. Acesso em: 25 out 2020.

Molina, R., L. Gradoni and J. Alvar (2003). "HIV and the transmission of *Leishmania*." Ann Trop Med Parasitol **97 Suppl 1**: 29-45.

Mondelaers, A., S. Hendrickx, L. Van Bockstal, L. Maes and G. Caljon (2018). "Miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strains with an impaired MT/ROS3 transporter complex retain amphotericin B susceptibility." J Antimicrob Chemother **73**(2): 392-394.

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.

Morelle, C., A. Mukherjee, J. Zhang, F. Fani, A. Khandelwal, H. Gingras, J. Trottier, O. Barbier, P. Leprohon, M. D. Burke and M. Ouellette (2021). "Well-Tolerated Amphotericin B Derivatives That Effectively Treat Visceral Leishmaniasis." *ACS Infect Dis* 7(8): 2472-2482.

Morizot, G., R. Jouffroy, A. Faye, P. Chabert, K. Belhouari, R. Calin, C. Charlier, P. Miailhes, J. Y. Siriez, O. Mouri, H. Yera, J. Gilquin, R. Tubiana, F. Lanternier, M. F. Mamzer, C. Legendre, D. Peyramond, E. Caumes, O. Lortholary and P. Buffet (2016). "Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B." *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004304.

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

Mwenechanya, R., J. Kovářová, N. J. Dickens, M. Mudaliar, P. Herzyk, I. M. Vincent, S. K. Weidt, K. E. Burgess, R. J. S. Burchmore, A. W. Pountain, T. K. Smith, D. J. Creek, D. H. Kim, G. I. Lepesheva and M. P. Barrett (2017). "Sterol 14 $\alpha$ -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*." *PLoS Negl Trop Dis* 11(6): e0005649.

Neves, D. P. et al. (2011). "Parasitologia humana." [S. l.]: Atheneu.

Neves (2013). "Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação" da FCF-IQ/USP.

Ning, Y., C. Frankfater, F. F. Hsu, R. P. Soares, C. A. Cardoso, P. M. Nogueira, N. M. Lander, R. Docampo and K. Zhang (2020). "Lathosterol Oxidase (Sterol C-5 Desaturase) Deletion Confers Resistance to Amphotericin B and Sensitivity to Acidic Stress in *Leishmania major*." *mSphere* 5(4).

Obonaga, R., O. L. Fernández, L. Valderrama, L. C. Rubiano, M. Castro Mdel, M. C. Barrera, M. A. Gomez and N. Gore Saravia (2014). "Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species." *Antimicrob Agents Chemother* 58(1): 144-152.

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

Paris, C., P. M. Loiseau, C. Bories and J. Breard (2004). "Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes." *Antimicrob Agents Chemother* 48(3): 852-859.

Perea, A., J. I. Manzano, S. Castanys and F. Gamarro (2016). "The LABCG2 Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* Is Involved in Antimony Resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 60(6): 3489-3496.

Pérez-Victoria, F. J., S. Castanys and F. Gamarro (2003). "*Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug." *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2397-2403.

Perez-Victoria, F. J., M. P. Sanchez-Canete, S. Castanys and F. Gamarro (2006). "Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites." J Biol Chem **281**(33): 23766-23775.

Pérez-Victoria, F. J., S. Castanys and F. Gamarro (2003). "*Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2397-2403.

Pérez-Victoria, J. M., F. Cortés-Selva, A. Parodi-Talice, B. I. Bavchvarov, F. J. Pérez-Victoria, F. Muñoz-Martínez, M. Maitrejean, M. P. Costi, D. Barron, A. Di Pietro, S. Castanys and F. Gamarro (2006). "Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux." Antimicrob Agents Chemother **50**(9): 3102-3110.

Perez-Victoria, J. M., A. Di Pietro, D. Barron, A. G. Ravelo, S. Castanys and F. Gamarro (2002). "Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents." Curr Drug Targets **3**(4): 311-333.

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

Ponte-Sucre A, Diaz E, Padrón-Nieves M (2013). "The concept of fitness and drug resistance in *Leishmania* In: Ponte-Sucre A, Diaz E, Padrón-Nieves M (eds) Drug Resist. *Leishmania* parasites." Consequences, Mol. Mech. possible Treat. Springer Verlag Wien, pp 431–449.

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.

Purkait, B., A. Kumar, N. Nandi, A. H. Sardar, S. Das, S. Kumar, K. Pandey, V. Ravidas, M. Kumar, T. De, D. Singh and P. Das (2012). "Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 1031-1041.

Rabello, A., M. Orsini and J. Disch (2003). "*Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal." Ann Trop Med Parasitol **97 Suppl 1**: 17-28.

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., 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.

Reimao, J. Q., C. T. Trinconi, J. K. Yokoyama-Yasunaka, D. C. Miguel, S. P. Kalil and S. R. Uliana (2013). "Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool." J Microbiol Methods **93**(2): 95-101.

Rey, L. (2008). Parasitologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Rijal, S., B. Ostyn, S. Uranw, K. Rai, N. R. Bhattarai, T. P. Dorlo, J. H. Beijnen, M. Vanaerschot, S. Decuypere, 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.

Roberts, W. L., W. J. McMurray and P. M. Rainey (1998). "Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime)." Antimicrob Agents Chemother **42**(5): 1076-1082.

Rocio, C., V. S. Amato, R. A. Camargo, F. F. Tuon and A. C. Nicodemo (2014). "Liposomal formulation of amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis in HIV-negative patients." Trans R Soc Trop Med Hyg **108**(3): 176-178.

Romero, G. A., M. V. Guerra, M. G. Paes and V. O. Macêdo (2001). "Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate." Am J Trop Med Hyg **65**(5): 456-465.

Sánchez-Cañete, M. P., L. Carvalho, F. J. Pérez-Victoria, F. Gamarro and S. Castanys (2009). "Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug." Antimicrob Agents Chemother **53**(4): 1305-1313.

Schneider, A. (2001). "Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids." Int J Parasitol **31**(13): 1403-1415.

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

Singh, A. K., B. Papadopoulou and M. Ouellette (2001). "Gene amplification in amphotericin B-resistant *Leishmania tarentolae*." Exp Parasitol **99**(3): 141-147.

Solomon, M., S. Baum, A. Barzilai, A. Scope, H. Trau and E. Schwartz (2007). "Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*." J Am Acad Dermatol **56**(4): 612-616.

Steverding, D. (2017). "The history of leishmaniasis." Parasit Vectors **10**(1): 82.

Stiller, E. T., J. Vandeputte and J. L. Wachtel (1955). "Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins." Antibiot Annu **3**: 587-591.

Stone, N. R., T. Bicanic, R. Salim and W. Hope (2016). "Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): 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., 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., A. Singh, M. Rai, V. K. Prajapati, A. K. Singh, B. Ostyn, M. Boelaert, J. C. Dujardin and J. Chakravarty (2012). "Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use." Clin Infect Dis **55**(4): 543-550.

SUS – Sistema Único de Saúde (2018). Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Brasília, CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. 365: 34.

Tojal da Silva, A. C., E. Cupolillo, A. C. Volpini, R. Almeida and G. A. Romero (2006). "Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil." Trop Med Int Health **11**(9): 1388-1398.

Tonin, F. S., L. M. Steimbach, H. H. Borba, A. C. Sanches, A. Wiens, R. Pontarolo and F. Fernandez-Llimos (2017). "Efficacy and safety of amphotericin B formulations: a network meta-analysis and a multicriteria decision analysis." J Pharm Pharmacol **69**(12): 1672-1683.

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

Uliana, S. R., C. T. Trinconi and A. C. Coelho (2017). "Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges." Parasitology: 1-17.

Uliana, S. R. (2021). *Leishmania* e Leishmanioses. Parasitologia Contemporânea 2ª Edição. G. Koogan. Rio de Janeiro: 93-103.

Urbina, J. A. (1997). "Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets

in kinetoplastid parasites." *Parasitology* 114 Suppl: S91-99.

Van Bocxlaer, K. and S. L. Croft (2021). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the treatment of cutaneous leishmaniasis - challenges and opportunities." *RSC Med Chem* **12**(4): 472-482.

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.

Vanaerschot, M., S. Huijben, F. Van den Broeck and J. C. Dujardin (2014). "Drug resistance in vectorborne parasites: multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race." *FEMS Microbiol Rev* **38**(1): 41-55.

Verma, N. K. and C. S. Dey (2004). "Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(8): 3010-3015.

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® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **8**(2): 223-228.

Wong-Beringer, A., R. A. Jacobs and B. J. Guglielmo (1998). "Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities." *Clin Infect Dis* **27**(3): 603-618.

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.

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.

Yardley, V., S. L. Croft, S. De Doncker, J. C. Dujardin, S. Koirala, S. Rijal, C. Miranda, A. Llanos-Cuentas and F. Chappuis (2005). "The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine." *Am J Trop Med Hyg* **73**(2): 272-275.

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.

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. ANEXOS

## 9.1 Certificado CEUA/UNICAMP



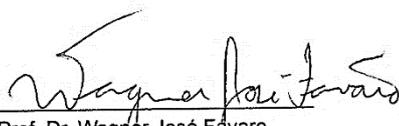
## CERTIFICADO

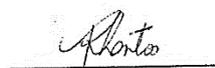
Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da suscetibilidade in vitro a fármacos alternativos em isolados clínicos e de cães de Leishmania spp.**, registrada com o nº **5571-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Bianca Alves Ferreira**, que envolve a produção, 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 reunião de **16/07/2020**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	03/08/2020 a 31/03/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/07/2020 a 31/03/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	150
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	150 Fêmeas
Origem:	CEMIB UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

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

Campinas, **27 de julho de 2020**.

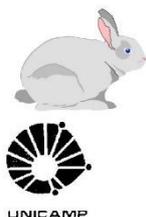
  
Prof. Dr. Wagner José Favaro  
Presidente

  
Rosângela dos Santos  
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 em certificado CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO CEUA nº 252/2021



CEUA/Unicamp

### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da suscetibilidade in vitro a fármacos alternativos em isolados clínicos e de cães de Leishmania spp.**”, (protocolo CEUA/UNICAMP nº **5571-1/2020**), de responsabilidade do **Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho** e da aluna **Bianca Alves**, teve o título alterado para “**Investigação da suscetibilidade à anfotericina B e à miltefosina em isolados clínicos de Leishmania spp.: Estudos in vitro e in vivo**”.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 27/07/2020.

Campinas, 24 de novembro de 2021.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Presidente da CEUA/UNICAMP

Rosângela dos Santos  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

---

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 25/11/2021, às 18:53 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

---

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 24/11/2021, às 16:33 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:  
[sigad.unicamp.br/verifica](http://sigad.unicamp.br/verifica), informando o código verificador:  
**DDC9AF94 4F034E8D 9635205C AF69BFFF**



### 9.3 Declaração de direitos autorais

#### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicadas ou submetidas para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Investigação da suscetibilidade à anfotericina B e à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania* spp.: estudos *in vitro* e *in vivo***, não infringem os dispositivos da lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 4 de março de 2022.

Assinatura:



Nome do(a) autor(a): Bianca Alves Ferreira  
RG n.º 39.117.041-7

Assinatura:



Nome do(a) autor(a): Adriano Cappellazzo Coelho  
RG n.º 26.111.655-1