



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas

TESE DE DOUTORADO

Análise da expressão das proteínas, malato desidrogenase, proteína de choque térmico HSP70 e subunidade alfa de ATPase na falha terapêutica ao N-metilglucamina.

ADRIANA DE OLIVEIRA SANTOS ALFANI

Orientadora: Prof^ª. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Brasília, dezembro de 2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ADRIANA DE OLIVEIRA SANTOS ALFANI

Análise da expressão das proteínas, malato desidrogenase, proteína de choque térmico HSP70 e subunidade alfa de ATPase na falha terapêutica ao N-metilglucamina.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para a obtenção de grau de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Brasília, novembro 2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a):

AAL385 a

Alfani, Adriana de Oliveira Santos

Análise da expressão das proteínas, malato desidrogenase, proteína de choque térmico HSP70 e subunidade alfa de ATPase na falha terapêutica ao N-metilglucamina./

Adriana de Oliveira Santos Alfani;

orientador Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio;

co-orientador Izabela Marques Dourado Bastos. -- Brasília, 2016. 78 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, 2016.

1. L.(V.) braziliensis. 2. Resistência. 3. Falha Terapêutica. 4. Proteínas, HSP70 e ATPase. I. Nonata Ribeiro Sampaio, Raimunda, orient. II. Marques Dourado Bastos, Izabela, co-orient. III. Título.

Sumário

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	7
<u>RESUMO</u>	10
<u>ABSTRACT</u>	11
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	12
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	14
<u>2.1. O vetor</u>	14
<u>2.2. <i>Leishmania Viannia braziliensis</i> (L. (V.) <i>braziliensis</i>)</u>	14
<u>2.3 Epidemiologia</u>	16
<u>2.4. Transmissão</u>	19
<u>2.5. Tratamento</u>	19
<u>2.6 Resistência</u>	21
<u>2.7. Biologia molecular</u>	25
<u>3. OBJETIVOS</u>	29
<u>3.1. Objetivo geral</u>	29
<u>3.2 Objetivos específicos</u>	29
<u>4. MATERIAL E MÉTODOS</u>	30
<u>4.1. Isolados de <i>Leishmania</i> estudados.</u>	30
<u>4.2 Realização de culturas dos isolados dos pacientes.</u>	30
<u>4.3 Contagem dos parasitas</u>	30
<u>4.4 Extração de DNA dos parasitas</u>	31
<u>4.5 Desenho dos <i>primers</i></u>	31
<u>4.6 PCR</u>	32
<u>4.7 Purificação da PCR</u>	33
<u>4.8 Produção de células competentes</u>	33
<u>4.9 Clonagem</u>	34
<u>4.10 Expressão das proteínas recombinantes</u>	35
<u>4.11 <i>Western blot</i></u>	36
<u>4.12 Produção de anticorpos.</u>	36

<u>4.13 Preparo dos extratos das culturas de <i>L. (V.) braziliensis</i> isoladas de pacientes considerados resistentes e não resistentes aos tratamentos.</u>	37
<u>4.14 Extirpação parcial da membrana do <i>Western blot</i>.</u>	38
<u>4.15 Reincubação da membrana de <i>Western blot</i>.</u>	38
<u>4.16 Quantificação das bandas proteicas.</u>	38
<u>4.17 Comitê de Ética.</u>	39
<u>4.18 Avaliação estatística.</u>	39
<u>5. RESULTADOS</u>	40
<u>5.1 Análise das sequências</u>	40
<u>5.1.1 Busca no genoma do número de sequências</u>	40
<u>5.1.2 Alinhamento entre as sequências</u>	40
<u>5.1.3 Desenho dos <i>primers</i> nas regiões dos genes definidos</u>	43
<u>5.2 Amplificação dos genes</u>	45
<u>5.2.1 Padronização das condições de PCR</u>	45
<u>5.2.2 Produção de anticorpos</u>	45
<u>5.2.3 Clonagem e transformação</u>	47
<u>5.2.4 Avaliação dos extratos das culturas isoladas de pacientes resistentes e não resistentes.</u>	51
<u>6. DISCUSSÃO</u>	59
<u>7. CONCLUSÕES</u>	64
<u>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Padronização das condições de PCR para HSP70LB, Malato Desidrogenase Lb e ATPaseLb.

Tabela 2: Padronização das condições de PCR para HSP70LB, Malato Desidrogenase Lb e ATPaseLb.

Tabela 3: Isolados de pacientes atendidos no HUB, tratados com N - metilglucamina, identificados como *L. braziliensis*, resistentes e não resistentes ao tratamento, correlacionando idade, sexo, forma clínica, local da lesão, teste intradérmico de Reação de Montenegro e normalização das bandas de HSP70 das figuras 21, 24 e 25.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania sp.* Adaptado de OMS/WHO.

Figura 2: Vetor pET – 19b demonstrando o sítio de clonagem entre BamH e Nde.

Figura 3: Resultado de alinhamento das proteínas Malato Desidrogenase Lb mitocondrial LbrM.20.0010 X Malato Desidrogenase Lb LbrM.20.0030 demonstrando o escore de semelhança entre as proteínas analisadas.

Figura 4: Resultado do alinhamento das proteínas ATPaseLb subunidade alfa LbrM.05.0510 X ATPaseLb subunidade alfa LbrM.05.0520, demonstrando o escore de semelhança entre as proteínas analisadas.

Figura 6: Resultado do alinhamento das proteínas HSP70LB LbrM.30.2410 X LbrM.30.2500 X LbrM.30.2450 X LbrM.30.2420 X LbrM.30.2440 X LbrM.30.2430.

Figura 7: Sequência do gene de Malato Desidrogenase Lb (LbrM.20.0030) e região definida para o desenho do primer.

Figura 8: Sequência do gene de ATPaseLb (LbrM.05.0510) e região definida para o desenho do primer.

Figura 9: Sequência do gene de HSP70 (LbrM.30.24.50) e as regiões definidas para o desenho dos primers (em vermelho).

Figura 10: Gel de agarose com amplificação de HSP70Lb, malato e ATPaseLb. A. Malato Desidrogenase Lb; B. ATPaseLb; C. HSP70LB.

Figura 12: Análise do plasmídeo pET19b-hsp70lb após midiprep. M. Marcador 1kb plus DNA ladder (Ivitrogen).

Figura 13: Análise do plasmídeo pET19b-MalatoIb e pET19b-ATPaseIb. M. Marcador 1kb plus DNA ladder (Ivitrogen); B. pET19-b MalatoIb digerido com NDE; C. pET19-b MalatoIb digerido com BaHm; D. pET19-b MalatoIb não digerido; E. pET19-b ATPaseIb digerido com NDE; C ATPaseIb digerido com BaHm; D. ATPaseIb não digerido.

Figura 14: Sequenciamento e confirmação da clonagem das amostras de HSP70Lb e de ATPaseLb.

Figura 15: 15.1 SDS-PAGE de HSP 70Lb com a banda de aproximadamente 26kDa na fração insolúvel. A. Marcador *BeachMark™ Protein Ladder*. B. Fração solúvel da proteína HSP70Lb. C. Fração insolúvel da proteína HSP70Lb. 15.2. Expressão de HSP70Lb na fração insolúvel. A. *Marcador Beach Mark™ Pre- Stained Protein Ladder*. B. Fração insolúvel da proteína HSP70Lb com a banda de aproximadamente 26kDa.

Figura 16: Expressão de HSP70Lb e ATPaseLb em extrato de *L.(V.) braziliensis* (padrão OMS) com soro pré imune e após inoculação de oito camundongos.

Figura 17: Expressão de ATPaseLb em extrato de *L.(V.) braziliensis* (padrão OMS), demonstrando as bandas com alturas aproximadas de 26,2KDa e 62,6KDa. Expressão de HSP70Lb em extrato de *L.(V.) braziliensis* (padrão OMS), demonstrando as bandas com alturas aproximadas de 22,8KDa; 39,3KDa; 70,5KDa e 71,4KDa.

Figura 19: Expressão de ATPaseLb de isolados de pacientes considerados resistentes (3R, 4R, 6R, 7R, 8R, 9R, 10R, 13R e 14R) e não resistentes (5NR, 11NR e 12NR) ao tratamento realizado no Hospital Universitário, utilização de BCIT e NBT. 1. Marcador *Beach Mark™ Pre- Stained Protein Ladder*. 2. Extrato de *L.(V.) braziliensis*, (padrão OMS).

Figura 20: Expressão de ATPaseLb de isolados de pacientes considerados resistentes e não resistentes ao tratamento realizado no Hospital Universitário, utilização de BCIT e

NBT. 1. Marcador *Beach Mark™ Pre- Stained Protein Ladder*. 2. Extrato de *L.(V.) braziliensis*, (padrão OMS).

Figura 21: Expressão de isolados de pacientes considerados resistentes (2R, 3R e 4R) e não resistentes (5NR e 6NR). Bandas (~70kDa) anti HSP70Lb e bandas (50kDa) Anti Tat. Utilização de BCIT e NBT. 1. Extrato de *L.(V.) braziliensis* padrão OMS. $P > 0,05$.

Figura 22: Expressão com comparação das bandas de HSP70 de isolados de pacientes tratados com IC50 de NMG. 1. Extrato de *L.(V.) braziliensis* padrão OMS.

Figura 23: Expressão de HSP70Lb de isolados de pacientes considerados resistentes e não resistentes ao tratamento realizado no Hospital Universitário, utilização para visualização do ImageQuant LAS 4000. 1. Marcador *Beach Mark™ Pre- Stained Protein Ladder*, 2. Extrato de *L.(V.) braziliensis* (padrão OMS).

Figura 24: Expressão de HSP70Lb (70kDa) e anti Tat (50kDa) de isolados de pacientes resistentes e não resistentes ao N - metilglucamina, atendidos no Hospital Universitário, utilização para visualização do ImageQuant LAS 4000. $P > 0,05$.

Figura 25: Expressão de HSP70Lb (A) e anti Tat (B) em isolados de pacientes resistentes e não resistentes ao tratamento, atendidos no Hospital Universitário, visualização por ImageQuant LAS 4000. Nos isolados foi utilizado IC50 de NMG, e subdivididos em grupos (controle, 24 horas e 48 horas) para análise. $P > 0,05$.

Figura 26: Expressão de HSP70 com comparação das bandas de isolados de pacientes tratados com IC50 de NMG.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, endêmica e reemergente da pele e mucosa, causada por várias espécies de *Leishmania*. Nas últimas décadas a primeira linha de escolha de tratamento das leishmanioses tem sido o antimônio pentavalente (SbV) cujo o surgimento de resistência e este medicamento está se tornando um problema de saúde pública. Em alguns estudos foi observado que a HSP70 quando super expressa aumentou a tolerância ao SbIII em isolados resistentes de *Leishmania*. O objetivo geral deste projeto foi identificar proteínas dos isolados de leishmânias dos pacientes tratados com antimonial pentavalente (SbV) que possam estar relacionadas à resistência ao tratamento. No presente estudo, após avaliação do sequenciamento, os genes foram sub clonados individualmente no vetor pET-19b e utilizadas as enzimas de restrição (NdeI e BamHI), produzidos anticorpos para as proteínas recombinantes de HSP70 e ATPase. Avaliou-se 12 isolados de pacientes resistentes e não resistentes ao tratamento. Ocorreu diminuição das formas promastigotas na maioria dos isolados tratados com IC 50 do N - metilglucamina. Verificou-se que não houve diferença significativa representativa na expressão das proteínas HSP70 e ATPase de isolados de pacientes com falha terapêutica e pacientes que não apresentaram falha terapêutica. A observação dos genes super expressos estudados em isolados considerados resistentes e não resistentes *in vitro* mostrou-se em diferentes concentrações em isolados de pacientes que apresentaram falha terapêutica, sugerindo que a falha, em sua maioria, ocorreu por características do hospedeiro.

Palavras chaves: *L.(V.) braziliensis*, Resistência, Falha Terapêutica, Proteínas, HSP70, ATPase.

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an infectious, endemic and reemergent disease of the skin and mucosa caused by several species of *Leishmania*. In the last decades the first line of choice of treatment of leishmaniasis has been pentavalent antimony (SbV) whose emergence of resistance and this drug is becoming a public health problem. In some studies it was observed that HSP70 when super expressed increased tolerance to SbIII in resistant isolates of *Leishmania*. The overall objective of this project was to identify proteins from leishmaniasis isolates from patients treated with pentavalent antimonial (SbV) to be related to resistance to treatment. In the present study, after sequencing evaluation, the genes were subcloned individually into the pET-19b vector and the restriction enzymes (NdeI and BamHI), produced antibodies to the HSP70 and ATPase recombinant proteins, were used to evaluate 12 isolates from patients Resistant and not resistant to outpatient treatment. There was a decrease in promastigote forms in the majority of isolates treated with IC 50 of N - methylglucamine. It was verified that there was no representative difference in the expression of HSP70 and ATPase proteins from isolates of patients with failed therapy and patients who did not present therapeutic failure. The observation of the superexpressed genes studied in isolates considered resistant and not resistant in vitro was demonstrated in different concentrations in isolates of patients that presented therapeutic failure, suggesting that the fault, for the most part, occurred due to host characteristics.

Key words: *L. (V.) Braziliensis*, Resistance, Therapeutical Failure, Proteins, HSP70, ATPase.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada e reemergente transmitida pela picada de flebotomídeos infectados pelo protozoário *Leishmania*, um parasita intracelular. De acordo com a espécie infectante e o estado imunitário do hospedeiro, a doença pode resultar numa variedade de manifestações clínicas tais como cutânea, mucosa, ou com envolvimento visceral (Antinori et al; 2012).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis*, é o principal agente causador da leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa na América do Sul, é a espécie mais prevalente que infecta humanos nas Américas (Goto & Lindoso, 2010; Frézard, 2013).

A incidência cada vez mais elevada de casos de leishmaniose cutânea no mundo, com a ocorrência de um caso a cada vinte segundos, tem preocupado os representantes dos órgãos governamentais e as comunidades médicas e científicas, pois este aumento representa um sério problema para a Saúde Pública. Atualmente, 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente pelas diversas apresentações clínicas. Por não ter nenhuma vacina antileishmânia disponível, na ausência de medidas profiláticas eficientes pela dificuldade do combate a vetores e reservatórios, o controle da doença depende fortemente da quimioterapia (WHO, 2015).

Por sete décadas, os antimônios pentavalentes (SbV), constituem tratamentos leishmanicidas sendo estabelecidas como drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose. No entanto, nos últimos anos seu uso clínico tornou-se questionável pelo aparecimento de resistência em uso a longo prazo (Firooz et al, 2006). Devido o caráter endêmico e sua resistência a tratamentos realizados em pacientes no cenário mundial, estudos da biologia das leishmânias, assim como a identificação de diferenças e semelhanças em seus processos biológicos básicos poderão contribuir e serem relevantes para um maior conhecimento sobre o assunto.

O estudo do perfil da expressão desses agentes pode demonstrar o motivo da alta resistência de algumas cepas. A detecção de modificações na expressão de proteínas envolvidas em vias metabólicas importantes, incluindo a glicólise, gliconeogênese, estresse oxidativo entre outros podem ter um papel fundamental na sobrevivência do parasita e torná-los mais resistentes comparando-se com outros que não tenham essa super expressão (Downing et al, 2011; Mannaert et al, 2012)

Observar, portanto, que estudos sobre proteínas e seus respectivos genes são cruciais na determinação de mecanismos de resistência, de sua relação na virulência e

no entendimento da biologia do parasita. Estes estudos facilitariam o uso de drogas alvo, ou seja, substâncias que agiriam em determinada molécula crucial para sobrevivência do agente.

Reforçando isto, alguns resultados demonstram que isolados proteicos de *Leishmania* são a primeira linha de defesa contra drogas utilizadas desempenhando um papel protetor para a sobrevivência do parasita no hospedeiro, portanto, uma compreensão molecular dos mecanismos de resistência clínica, são fundamentais para o desenvolvimento de drogas mais efetivas para o tratamento da doença.

Além disso, pode ser permitido a caracterização de um antígeno proteico que eventualmente poderá ser utilizado no desenvolvimento de diagnóstico e terapias eficazes e por este motivo, compreender o genoma e sua estrutura de variação é essencial para sustentar e melhorar as estratégias de vigilância em saúde pública e de possíveis intervenções.

O objetivo deste trabalho foi identificar a superexpressão das proteínas Malato desidrogenase, ATPase e HSP 70 de *Leishmania braziliensis* dos isolados de pacientes que responderam e não responderam satisfatoriamente ao tratamento preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Este objetivo foi estabelecido a partir de pesquisa realizada por Urdapilleta (2011) a qual em análise de proteoma dos isolados de dois pacientes que não responderam aos tratamentos preconizados apresentaram essas mesmas proteínas super expressas. Para *L.(V.) braziliensis* isolada do paciente com falha terapêutica, as proteínas que obtiveram maior quantificação na análise foram a *ATPase alpha subunit* e a *putative heat shock protein hsp70*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O vetor

Os vetores, flebotomínios fêmeas, pertencentes à ordem Diptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, são popularmente conhecidos como mosquito-palha, entre outros nomes. As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são *Lutzomyia whitmani*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata* e *L. migonei* (Brasil, 2007).

2.2. *Leishmania Viannia braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*)

A *Leishmania* é um protozoário da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, classe Zoomastigophorea, filo Sarcomastogophora. Trata-se de um parasita intracelular que se apresenta em formas flageladas, promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados.

A forma promastigota após ser inoculada no mamífero pelo vetor desenvolve-se dentro do vacúolo fagolisossômico de macrófagos nos tecidos de hospedeiros vertebrados. Uma vez dentro do macrófago, as formas amastigotas inibem diversos mecanismos de defesa celular que deveriam ser responsáveis por sua lise (Desjeux 2004; Alzate et al. 2006)

Adquirida durante a alimentação do vetor com o sangue do reservatório, a forma promastigota procíclica do parasita, não infectiva e multiplicativa, deixa de se reproduzir, assumindo função infectante, em processo de metaciclogênese (promastigotas metacíclicas) na porção anterior do intestino do flebotomínio. Ao perder a capacidade de adesão epitelial, as promastigotas metacíclicas migram para a faringe, de onde se transferem para o hospedeiro em novo repasto (Figura 01).

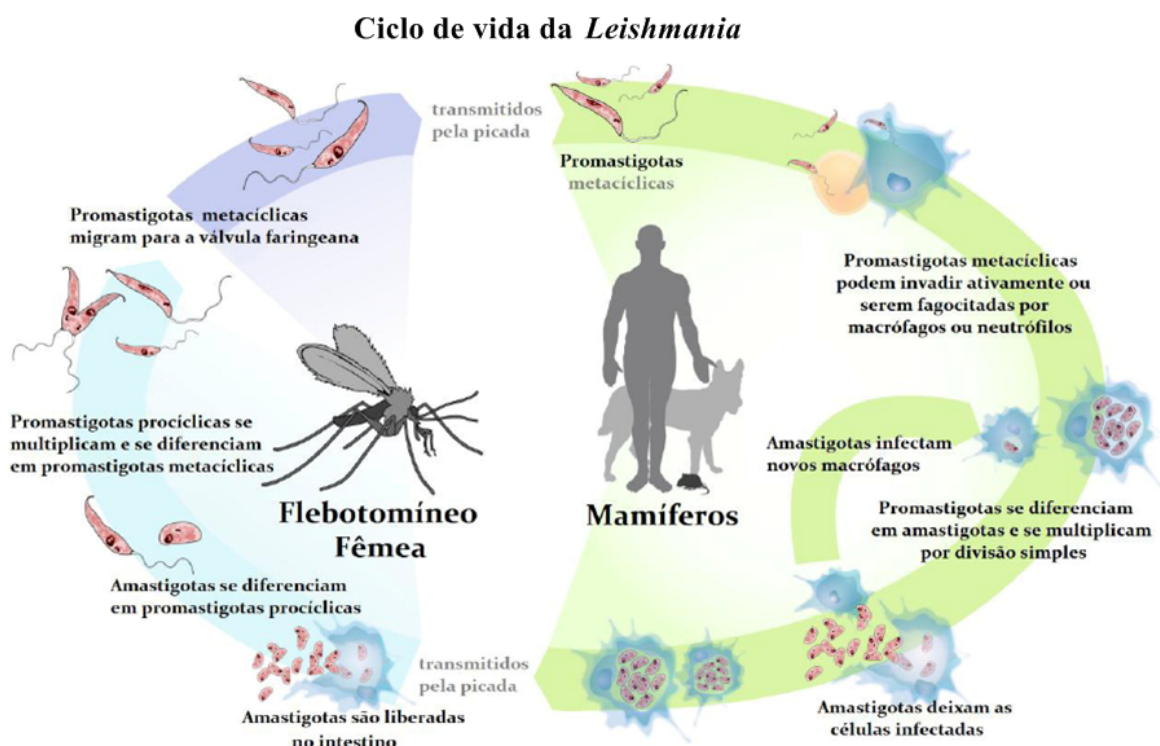


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania* sp. Adaptado de OMS/WHO.

As espécies envolvidas na transmissão da LTA identificadas no Brasil compreendem seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, a saber: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

As leishmanioses são classificadas em três formas clínicas principais, que variam com a espécie do parasita: duas cutâneas e uma visceral (calazar). A apresentação clínica da doença varia com a espécie do parasita e com a resposta do hospedeiro resultando um amplo espectro de manifestações, incluindo úlceras cutâneas únicas, algumas de cura espontânea (Sheiky, 1995; Cuervo et al, 2009), lesões disseminadas, lesões mucosas e outras manifestações que estão relacionadas a uma boa ou má resposta ao tratamento. A leishmaniose cutânea apresenta úlcera cutânea com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura; na forma mucosa (mucocutânea), que pode afetar lábios, palato e nasofaringe, o hospedeiro apresenta ulceração na mucosa nasal, com ou sem perfuração, ou perda de septo nasal. O período de incubação da

doença varia de dois a três meses, ainda que os sintomas possam se apresentar mais precocemente – duas semanas – ou mais tardiamente – dois anos.

A forma clínica mais recorrente da doença é a cutânea, caracterizada pela lesão única e associada aos parasitas *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) laisoni*. Na forma monocutânea, cujas lesões podem evoluir para grandes deformações, foram identificadas as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) mexicana*, enquanto que na forma cutânea difusa, em que as lesões são observadas em diferentes regiões do corpo, estão envolvidas as espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) venezuelensis* e *L. (L.) amazonensis*.

Na transmissão por *L. (V.) braziliensis*, as manifestações clínicas da doença são úlcera cutânea nas formas única ou múltipla, complicada muitas vezes por metástase por via hematogênica, com destruição de tecidos das mucosas da nasofaringe (Brasil, 2010).

2.3 Epidemiologia

Em 1894, o médico baiano Juliano Moreira apresentou à Sociedade de Medicina e Cirurgia da Bahia as primeiras descrições, no Brasil, de uma infecção cutânea então conhecida como "botão de Biskra", "botão endêmico" ou "botão do oriente", doença atualmente reconhecida como leishmaniose. O artigo, intitulado "Existe na Bahia o botão de Biskra?: estudo clínico" e publicado na "Gazeta Medica da Bahia" em fevereiro de 1895, trouxe a descrição das formas clínicas e deu relevância ao vetor descrito pelos pacientes observados: o "muruim" (Vale & Furtado, 2005; Furusava & Borges, 2014).

O agente etiológico do botão de Biskra tornar-se-ia público em 1903, quando o norte-americano James Homer Wright identificou o protozoário *Welcozona tropicum* – posteriormente, *Leishmania tropica* – ao estudar as feridas cutâneas de uma criança armênia. Em 1893, o russo P.F. Borovsky já havia indicado ser um protozoário o agente etiológico da doença, mas o estudo, possivelmente por ter sido publicado apenas na língua do autor, não teve maior impacto (Jacobina & Gelman, 2008). Quanto ao vetor, os flebotomíneos teriam sua atuação descrita somente em 1922, quando também foram encontrados roedores em florestas do Estado de São Paulo infectados pelo parasita (Brasil, 2007).

Endêmica na América Latina, Ásia e África, com aproximadamente um terço dos casos concentrados nas Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia Ocidental, passando pelo Oriente Médio e Ásia Central, as leishmanioses compreendem um espectro de doenças infecciosas causadas por diversas espécies de *Leishmania*. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é inicialmente uma infecção zoonótica – ataca outros animais além do humano – e se apresenta como uma doença infecciosa transmitida apenas vetorialmente por insetos flebotomíneos, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e cujas lesões irrompem na pele, mucosa ou em ambas.

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das seis doenças infecciosas mais preocupantes, dada a gravidade de suas lesões e o potencial de isolamento social e consequente sofrimento psicológico dos afligidos pela doença. Há impacto, ainda, no campo econômico, tendo em vista que, em boa parte dos casos, a leishmaniose pode se configurar como uma doença ocupacional (Brasil, 2007).

Trata-se, portanto, de uma doença de interesse para a saúde pública. Estima-se em 12 milhões os seres humanos infectados por *Leishmania*, com uma incidência de 1,5 a 2 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre em mais de 88 países (Porfírio-Passos, 2013). Noventa por cento dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Brasil, Peru, Arábia Saudita e Síria, enquanto 90% dos casos de LTA ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (Chakravarty & Sundar, 2010). No Brasil, nas últimas décadas, em decorrência do seu comportamento epidemiológico, diante do extenso processo de urbanização, existe a necessidade de adoção de diferentes estratégias para o controle (Porfírio-Passos, 2013). Sua notificação é compulsória no Brasil e de crucial importância para a atualização dos protocolos de vigilância epidemiológica e entomológica. Foram registrados 20.296 casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no território brasileiro em 2014, segundo o Ministério da Saúde (sinan/svs/ms1), e sua transmissão é descrita em todas as unidades da federação desde 2003.

Ainda que os programas de controle da doença pelo órgão de saúde pública brasileiro sejam considerados adequados às especificações da OMS, as leishmanioses encontram-se em expansão no país. Seu padrão epidemiológico alterou-se entre os anos

1980 e 1990: nos anos 1980, a doença concentrava-se nas regiões Norte e Nordeste, enquanto que, na década seguinte, as leishmanioses encontravam-se disseminadas para outras regiões (Brasil, 2010)

A pouca efetividade do controle das leishmanioses está em consonância com seu estatuto de Doença Tropical Negligenciada (DTN) e reemergente. As DTNs são prevalentes em áreas com população de baixa renda e baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), onde também a pobreza é endêmica. Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), as DTN, junto com a tuberculose, são responsáveis por 11,4% da carga global de doenças². São classificadas em três categorias pela OMS, considerando emergência, controle e disponibilidade de medicação. As leishmanioses classificam-se, juntamente com a dengue e a tripanossomíase humana africana (THA), na Categoria 1, das *NTD Major*, cujo controle é ineficiente e a emergência, alta (Lindoso & Lindoso, 2009). Um dos fatores para dificuldade no controle é a grande variedade de espécies distintas de *Leishmania* e seus respectivos perfis epidemiológicos (Arruda, 2005).

Dentre os elementos que contribuem para a expansão da doença, encontram-se o desflorestamento, a urbanização e a migração sem controle, devido às características epidemiológicas da *Leishmania*. Os padrões epidemiológicos da LTA no Brasil podem ser resumidos em:

a) silvestre, em que o ciclo da *Leishmania* é basicamente zoonótico, acometendo o humano quando em contato com o ambiente silvestre em enzootia;

b) ocupacional/lazer, quando a transmissão decorre da exploração da mata, derrubada de florestas e instalação desordenada de moradias, situações comuns na construção de grandes obras de desenvolvimento, como hidrelétricas, estradas, ou mesmo em situações de exploração legal ou ilegal de recursos naturais. Também encaixa-se neste padrão os casos de transmissão por ocasião de ecoturismo ou treinamentos na mata;

c) Periurbano/ rural, que se relaciona com a ocupação de encostas e outras áreas de matas residuais próximas aos centros urbanos (Brasil, 2007).

1 <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>

2 <http://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>

2.4. Transmissão

A transmissão da leishmaniose se dá por hematofagia, com a picada do vetor, que adquire o parasita durante o repasto em animais-reservatórios e o transmite, em outro repasto, ao homem ou a outro mamífero. Envolve, respectivamente, diferentes espécies de parasita, vetores, reservatórios e hospedeiros, em um ciclo complexo, que apresenta diferenças de acordo com a região geográfica e alterações ambientais.

Reservatórios são animais que possibilitam a circulação da *Leishmania* em determinada área. Dentre os parâmetros para determinar uma espécie como reservatório, o Ministério da Saúde lista o status taxonômico do animal, a distribuição geográfica do hospedeiro e do parasita, a distribuição microrregional do parasita e do reservatório em diferentes ecossistema de um dado bioma, a prevalência da leishmaniose entre hospedeiros machos, fêmeas, adultos e jovens e estudos longitudinais que considerem o impacto do parasita na população e no indivíduo, a flutuação sazonal, a transmissibilidade e a estabilidade da infecção (Brasil, 2010).

2.5. Tratamento

Ainda que se registrem esforços para o desenvolvimento de vacinas contra as *Leishmania spp.*, incluindo testes em humanos com promastigotas de *L. major* que revelaram diversas reações adversas e testes clínicos com antígenos do parasita – que, por sua vez, se mostraram ineficientes –, não há ainda imunização contra as doenças ocasionadas pelo protozoário (Soto et al., 2009). Na ausência de medidas profiláticas eficientes dada a dificuldade do combate a vetores e reservatórios, e diante da inexistência de vacinas, a medida mais eficaz de combate aos efeitos nocivos da doença é o tratamento. O tratamento da LTA, todavia, é um desafio porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, e nenhuma delas é bastante eficaz (Sundar et al., 2001). A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal (Lima et al, 2007). Além disso, as drogas que estão disponíveis hoje no mercado têm vários efeitos colaterais e apresentam sinais crescentes de resistência (Oliveira et al 2011; Savoia 2015).

O tártaro emético, um composto antimonial trivalente, foi introduzido em 1912 por Gaspar Vianna. Considerada muito tóxica, a forma trivalente foi posteriormente

substituída pela pentavalente, de menor toxicidade e então considerada mais eficiente. O gluconato de antimônio sódico (estibogluconato de sódio) foi produzido em 1936 por Schmidt, registrado sob nome comercial de Pentostam pelo laboratório Glaxo-Wellcome. Na França, foi introduzido o N-metil glucamina (antimoniato de meglumina), patenteado pelo laboratório Rhône-Poulenc-Rohner como Glucantime.

Durante as últimas sete décadas, os tratamentos das várias formas de leishmanioses têm como droga de primeira escolha os antimoniais pentavalentes (SbV). Estes, entretanto, apresentam problemas como alta toxicidade, resistência, dificuldade de administração e alto custo (Martinez & Marr, 1992; Sampaio et al, 1997). Segundo Almeida e Santos (2011), falhas terapêuticas e alto índice de recidivas ocorrem na forma mucosa tratada com estes medicamentos (Amato, 1997; Name et al, 2005). Vale enfatizar que, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento mucoso é frequente (Marsden, 1996; Sampaio & Marsden, 1997; Brasil, 2000; Brasil, 2002; Brasil, 2007; Brasil, 2010).

Para a maioria das regiões endêmicas, a OMS recomenda o tratamento com antimônio pentavalente a SbV 20mg/kg por dia durante 20-28 dias consecutivos (Reithinger et al, 2007). Inicialmente, era administrado 10mgSbV/kg, contudo, o surgimento de casos que não respondiam ao tratamento, principalmente na Índia, na década de 70 promoveu o aumento da dose (Thakur, 1999).

O antimoniato de N-metil glucamina, indicado como primeira escolha para todas as apresentações de LTA, é contraindicado para pacientes coinfectados com HIV e para gestantes, ainda que seu uso seja considerado seguro para lactantes dada a baixa concentração de SbV no leite materno (3,5 µg Sb/ml). Figuram como segunda escolha a anfotericina B e o isotionato de pentamidina, cujos altos custo e toxicidade contribuem para sua baixa difusão (Oullette et al., 2004). A pentamidina, além do alto grau de toxicidade, teve eficácia comprometida com o aumento da resistência do parasita à substância. Já o antifúngico anfotericina B lipossomal, ainda que menos tóxico que a pentamidina, tem custo proibitivo para a maioria dos doentes, além da dificuldade inerente à administração intravenosa.

Os compostos antimoniais pentavalentes têm ação na bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania*, inibindo a glicose e a oxidação dos ácidos graxos e, conseqüentemente, reduzindo a produção de ATP e AGP. Observa-se decréscimo da

produção de CO² a partir da glicólise diante da exposição a 500 mg de SbV/ml (Brasil, 2007).

O SbV, cujo mecanismo de ação ainda não é totalmente decifrado, precisa se reduzir biologicamente em uma forma trivalente (SbIII), mais tóxica, para ativar sua ação (Kumar et al., 2010). O âmbito dessa conversão, se no parasita ou na célula do hospedeiro, permanece igualmente desconhecido. Alguns estudos indicam que essa ação ocorre nos macrófagos, enquanto outros apontam para a ocorrência no parasita em si, não sendo descartada a possibilidade de que ambos possam ocorrer simultaneamente (Oullette et al., 2004).

A Organização Mundial de Saúde recomendou recentemente a utilização de uma combinação de drogas leishmanicidas, a fim de diminuir a concentração e a toxicidade das dosagens necessárias, bem como para retardar o desenvolvimento de resistência (WHO, 2015). Mesmo com essa recomendação a preocupação quanto resistência aos medicamentos emergentes constitui um dos principais problemas para as quimioterapias atuais contra leishmaniose.

2.6 Resistência

É importante fazer distinção entre a resistência aos fármacos e a falha terapêutica. Enquanto a resistência à droga em si relaciona-se com mecanismos específicos de resistência do parasita às substâncias das drogas utilizadas para sua eliminação, a falha terapêutica resulta da dinâmica parasita-hospedeiro-fármaco é multifatorial, ou seja, pode envolver eventos de diferentes naturezas (Torres 2009)

No Brasil, a terapêutica para a LTA estabelecida pelo Ministério da Saúde prevê o tratamento com antimoniato de meglumina como droga de primeira escolha. Na observância de falha na cicatrização completa das lesões após 90 dias do fim do tratamento, submete-se o paciente a novo ciclo de tratamento com a mesma droga. O prazo para observação da cura, desta vez, pode ser de até seis meses, considerando que lesões nos braços e pernas podem levar mais tempo para cicatrizarem. Caso não seja observada a cicatrização, constata-se a falha terapêutica, situações em que não ocorreu cura clínica após a segunda série regular de tratamento com antimonial pentavalente, procede-se à introdução de uma droga de segunda escolha: antofericina B ou pentamidina (Brasil, 2007).

Alguns fatores relativos ao parasita e ao hospedeiro vertebrado podem influenciar na resposta terapêutica, como a sensibilidade à droga e resposta imunológica da pessoa em tratamento, espécie-dependente, resistência adquirida, irregularidade no tratamento, critérios laboratoriais de cura parasitológica; ou ao hospedeiro estado imune e à droga, bem como as propriedades farmacocinéticas e particularidades da farmacodinâmica do antimônio (Lima et al, 2007; Chakravarty & Sundar, 2010; Carvalho et al, 2013).

As respostas clínicas, portanto, podem ter apresentações diferentes por fatores que vão da variação genética entre parasitas de uma mesma espécie à dificuldade de monitoramento e avaliação das experiências terapêuticas por ausência de sistematização dessas práticas (Romero et al., 2001).

Outros fatores, de mais difícil aferição, também influenciam no sucesso do tratamento e podem se relacionar com a resistência do parasita. Há estudos que indicam relação entre o tempo de manifestação da infecção e o início do tratamento. Lesões recentes tratadas com antimoniato de meglumina apresentam maior índice de falha terapêutica quando contrastadas com lesões ulceradas mais antigas (Unger et al, 2009).

A idade do indivíduo também parece ser um agente da resistência clínica: um estudo indicou menor índice de resposta em pacientes de leishmaniose cutânea menores de quinze anos no continente asiático (Layegh et al, 2011), enquanto outro, conduzido na América Latina, indicou que crianças abaixo dos cinco anos de idade apresentaram menor resposta à terapêutica com antimoniais pentavalentes (Palacios et al, 2001). As crianças parecem apresentar menores concentrações plasmáticas de antimônio em relação aos adultos (Cruz et al, 2007).

Importante salientar que, um paciente que apresenta lesões que não cicatrizam ou recidivam ao tratamento não significa que seja portador de uma cepa de *Leishmania* resistente. Alguns casos demonstram que os pacientes refratários ao tratamento são em geral indivíduos que possuem estado imunitário deficiente. Sabendo-se que o N - metilglucamina age à medida que os macrófagos sejam estimulados e o paciente infectado comece a responder contra o parasita, acredita-se que os imunodeprimidos não respondem bem ao tratamento.

Para além dos elementos exógenos ao tratamento, percebe-se aumento da resistência do parasita às fórmulas com antimônio, com o aparecimento de cepas de parasitas resistentes ao tratamento clássico. Segundo Romero e colaboradores (2001), a

taxa de cura o tratamento com drogas à base de antimônio é de aproximadamente 50% no caso de infecção por *L. (V.) braziliensis*, em contraposição à taxa de aproximadamente 26% para casos de infecção por *L. (V.) guyanensis*.

O antimonial pentavalente (SbV) pode ser considerado uma pró-droga, pois reduz-se à fração trivalente (SbIII), mais tóxica, porém mais eficaz contra o protozoário nos macrófagos. Mecanismos como capacidade insuficiente de conversão do SbV a SbIII, baixa captação das substâncias e alto efluxo da droga podem estar relacionados com a resistência molecular (Kazemi-Rad et al, 2013). A resistência ao antimônio em *L. (L.) donovani* pode promover mudanças tanto na resposta imune do hospedeiro quanto na taxa de absorção e de efluxo dessa substância pelas células hospedeiras infectadas (McConville & Ralph, 2013).

As drogas mais eficazes no tratamento da leishmaniose, o N-metil glucamina e miltefosine, são drogas de depósito de eliminação lenta, o que facilita e propicia a resistência pelo parasita. O SbV atua no parasita na forma amastigoto no fagolisossomo e pode reduzir-se a Sb III no citosol ou no fagolisossomo, agindo no parasita na forma trivalente. Determinados tióis, como tripanotona e glicilcisteína, podem atuar de modo não enzimático na redução do SbV para SbIII (Oullette et al., 2004), tendo ação essencial na desintoxicação de metais na estrutura do tripanossomatídeo (Biyani et al, 2011). Esse mecanismo de ação dos compostos à base de antimônio pentavalente - a ativação de sua forma trivalente e consequente disfunção do metabolismo de tiol do parasita - é aparentemente desarmado nos parasitas resistentes ao antimônio (Perry et al, 2015).

Ainda que o modo exato do mecanismo de ação e resistência aos antimoniais não seja claro, as seguintes observações são importantes quando relacionadas à droga e sua relação com a *Leishmania*. Em relação à aplicação da droga, ocorre a geração de estresse oxidativo da célula através da depleção de tiol e bloqueio da regeneração deste, induzido por tripanotona redutase (Wyllie et al., 2004). Tanto os antimoniais pentavalentes quanto os trivalentes têm ação na mediação da fragmentação do DNA do parasita, o que indica a eficácia na destruição da *Leishmania* na reminiscência da apoptose (Oullette et al, 2004).

Redução ou perda no processo de ativação do antimônio pode favorecer a resistência do parasita (Oullette et al, 2004), que pode deter outros mecanismos bioquímicos de resistência ao metal além do transporte de conjugados tiol-metal

(Kumar et al, 2010). Estudos focados na resistência ao metal foram desenvolvidos a partir da análise de mutações resistentes ao SbIII e ao arsenito (AsIII), e indicaram que a mutação de um dos diferentes transportadores utilizados pelo SbV e SbIII podem ser uma explicação para a resistência à droga (Brochu et al, 2004). Légaré e colaboradores (2001) relacionam a resistência ao metal à proteína de transporte do cassete de ligação ao ATP (ABC) PGPA em testes *in vitro*. Neste modelo, o conjugado de tripanotona – composto de glutadiona e espermidina específico dos cinetoplastídeos – e Sb é sequestrado em um vacúolo pela proteína PGPA ou expurgado da célula por uma bomba de tiol durante o processo de desintoxicação (Brochu et al, 2004).

É sabido que moléculas secretadas e proteínas da superfície do parasita são importantes na infecção, do contato inicial com a célula do hospedeiro à ação sobre a produção de citocinas e ativação das células imunes (Soto et al, 2009).

O antimônio pentavalente atua no parasita amastigoto no fagolisossomo ou pode ainda reduzir-se a Sb III no citosol ou no fagolisossomo e agir no parasita na forma trivalente (figura 2). Determinados tióis, como tripanotona e glicilcisteína, podem atuar de modo não enzimático na redução do SbV para SbIII (Oullette et al., 2004), tendo ação essencial na desintoxicação de metais na estrutura do tripanossomatídeo (Biyani et al, 2011).

No parasita, observam-se a geração de estresse oxidativo e nitrosativo através da manipulação da célula hospedeira (Mookerjee & Mookerjee, 2006), a promoção de vários efeitos de ativação imune, além de maior proteção contra o estresse oxidativo (Vanaerschot et al., 2012). A *Leishmania*, ainda, apresenta habilidades para ações específicas que favorecem a imunossupressão e exportação da droga para fora das células hospedeiras (Mukherjee et al., 2013).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são altamente aptos a manipular as vias de sinalização dos macrófagos para subverter as funções dessa célula, fazendo com que alguns mediadores pró-inflamatórios sejam induzidos em macrófagos infectados podendo propagar ainda mais a infecção (Gregory & Oliveira, 2005; Saldanha et al, 2012).

Os parasitas de *Leishmania* são peritos na manipulação de dosagem de gene através de aneuploidia maciça (Downing et al, 2011; Mannaert et al, 2012) e a formação de epissomas circulares extracromossômicos. São como "caixas de ferramentas de

emergência" que podem conter vários genes que podem ser regulados rapidamente em um ambiente estressante ou onde contenha droga (Leprohon et al., 2009a).

Diversas substâncias estão sendo testadas como drogas leishmanicidas, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita (Soares-Bezerra et al, 2004). Dentre algumas delas podemos citar as inibidoras do metabolismo de folatos (Becker & Ullman, 1991), as inibidoras da síntese de poliaminas; inibidoras da síntese de tubulinas (Callahan *et al.*, 1996; Werbovetz *et al.*, 1999); inibidoras da biossíntese de esteróides (Gaughan *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997) azólicos (cetoconazol e itraconazol). Entretanto, a resposta clínica frente ao tratamento com essa classe de fármacos depende do tipo de *Leishmania*. Novos fármacos como a lovastatina e as alilaminas (terbinafina) também promovem alterações no metabolismo dos esteróides.

2.7. Biologia molecular

O estudo de genes estágio-específico dos parasitas fornece dados sobre as diferentes formas de vida e da interação do parasita com o hospedeiro. Além disso, esses estudos podem proporcionar importantes ferramentas para desvendar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica. A trajetória da secreção protéica, assim como o papel das proteínas secretadas pela *Leishmania sp* ainda não foram plenamente caracterizados (Cuervo et al., 2009).

Em 2005, o sequenciamento do genoma de *L. major* identificou 8.311 genes codificadores de proteínas e forneceu uma estrutura para futuros estudos genômicos comparativos (Ivens et al, 2005). Estudos do DNA do parasita têm mostrado sua ampla diversidade. Variações genéticas de uma espécie podem dar origem a características como diversidade antigênica, virulência, patogenicidade e resistência às drogas (Paiva-Cavalcanti et al, 2009), como as indicações de que DNA amplificado derivado do cromossomo 9 pode se relacionar com a resistência ao SbV (Brochu, 2004).

Graças à disponibilidade de genomas sequenciados de diferentes espécies de *Leishmania* (www.genedb.org), a partir do conhecimento das sequências de DNA dos genes, pode-se deduzir a sequência de aminoácidos das proteínas por eles codificadas. Essa informação é de grande importância, já que a sequência de aminoácidos de uma proteína é a característica primordial que define sua forma e função (Gygi & Aebersold, 2000; Locke, et al.2002). Uma vantagem dos genomas sequenciados é a de viabilizar a

análise de proteomas que, por definição, representam o perfil de proteínas expressas num determinado organismo numa condição precisa.

Mudanças genóticas e fenotípicas devem ser examinadas no contexto de uma estrutura dinâmica populacional, bem como processos seletivos induzidos pelo tratamento medicamentoso. Este padrão pode mascarar sinais de evolução adaptativa (Elyashiv et al. 2010).

Uma comparação detalhada entre genomas de *Leishmania* revelou um fundo impressionante de conservação ao nível do gene. Além disso, em contraste com as grandes diferenças fenotípicas causadas por cada uma das espécies, menos de 50 genes foram diferencialmente distribuídos, o que indica que podem existir alguns genes específicos aperfeiçoando a percepção de presença ou ausência de genes ortólogos (Dujardin 2009; Leprohon et al, 2009a, b).

A disparidade entre genomas sugere que as adaptações sistêmicas, que substancialmente e globalmente alteram o proteoma, têm um papel na resistência à droga (TKindt et al. 2010). Estudos anteriores visam genes específicos e apontam diferentes padrões de superexpressão em parasitas antimoniais-resistentes (Aduai et al. 2011).

Em estudo de proteoma realizado por Urdapilleta (2011) com cepa de *Leishmania spp* de paciente que não respondeu a diversos tratamentos foi detectada a superexpressão de proteínas que podem estar relacionadas à resistência desses agentes. No isolado de *L. (V.) braziliensis* de um paciente que recidivou lesões de mucosa após uso de todas as drogas específicas de primeira e segunda escolha e também outras drogas de experimentação após acompanhamento de mais de duas décadas, as proteínas que mais apareceram foram *putative heat shock 70 (HSP70LB) related protein 1 mitochondrial precursor L. (V.) braziliensis* e *ATPaseLb subunidade alfa L. (V.) braziliensis*. Já para o isolado de *L. (L.) amazonensis* de um paciente portador de leishmaniose cutânea difusa, a proteína *malato desidrogenase L. (L.) amazonensis* foi identificada em maior quantidade do que a utilizada como padrão.

Leroux e colaboradores (2006) comprovaram que a malato desidrogenase mitocondrial, citoplasmática e glicossomal são expressas ao longo do ciclo de vida da *Leishmania spp.* e que são mais abundantes na forma amastigota que promastigota, o que favorece uma maior atividade do ciclo de Krebs, tendo um aumento na produção de

ATP e conseqüentemente maior capacidade de degradar piruvato em dióxido de carbono.

As proteínas que apresentam atividade ATPase, estão envolvidas em várias funções celulares como na maquinaria de pré-replicação (Neuwald et al, 1999; Calderano et al, 2011). As heat shock protein 70, entre outras funções, estão envolvidas na virulência do parasita.

Durante a transmissão ao mamífero, o parasita deve suportar diferentes situações criadas pelo organismo do hospedeiro como as variações de pH e temperatura, oxidantes produzidos por macrófagos do hospedeiro. As chaperonas moleculares conhecidos como as proteínas de choque térmico (HSP) são fundamentais para a sobrevivência intracelular, diferenciação e virulência (Shonhai et al. 2011).

Proteínas de choque térmico (HSP) são de uma família de proteínas cuja função é proteger a célula de estímulos tóxicos externos (Biyani et al, 2011), oferecendo forte resposta de estímulo imune em mamíferos (Kumar et al, 2010). Possuem este nome por terem sido identificadas pela primeira vez em células expostas em altas temperaturas. As proteínas dessa família nas *Leishmania* fazem parte de um grupo multigênico, e a regulação desta família ocorre no nível pós-transcricional (Shonhai et al. 2011, Requena et al., 2015). A fim de garantir a funcionalidade de eventuais proteínas defeituosas, as HSP reconhecem a estrutura alterada, reparam, montam e translocam peptídeos alterados através da membrana celular.

Vários estudos demonstram a função das HSP como chaperonas moleculares, isto é, interação com outras proteínas e, deste modo, minimizam a probabilidade dessas proteínas se correlacionarem impropriamente umas com as outras. Os papéis de HSP nas interações parasita-hospedeiro têm recebido atenção considerável a partir de perspectivas clínicas e biológicas. A partir da perspectiva do hospedeiro essas proteínas expressas induzem a resposta imunológica (Polla, 1991; Maresca & Kobayashi, 1994), sendo, portanto, potencialmente úteis na geração de vacinas.

Do ponto de vista do parasita, a síntese de HSP é um mecanismo de defesa que permite que o parasita sobreviva em diferentes situações térmicas ao longo de seu ciclo de vida (Tsuji et al, 1997), função da HSP70 na defesa celular, parece estar baseada na sua capacidade de associar-se com outras proteínas, de modo que modifique o destino e a função (Rico et al., 1998). A temperatura é um agente de diferenciação no ciclo da *Leishmania*: durante a infecção, o parasita é exposto ao aumento de temperatura

consequente à transmissão do hospedeiro invertebrado para o vertebrado, sendo um sinal fundamental para o desenvolvimento da forma promastigota para a amastigota (Brochu et al., 2004).

No gênero *Leishmania*, a HSP70 está envolvida no processo de diferenciação celular de promastigotas para amastigotas, porém a base molecular deste processo ainda não está esclarecida (Bente et al., 2003). As proteínas pertencentes a esta família auxiliam na garantia do dobramento adequado das cadeias polipeptídicas como também desempenham uma função essencial na importação de proteínas para as mitocôndrias e para o retículo endoplasmático, ligando-se à proteína precursora, sem sua conformação nativa, durante o transporte. A liberação de polipeptídeos recentemente sintetizados pela HSP70 necessita de hidrólise de ATP. Essa requisição energética é imprescindível durante os estágios subseqüentes de importação para a mitocôndria (Kelley, 1998).

A resposta das células de *Leishmania spp* à exposição ao SbIII, aumentando a proteína HSP70, aponta para o papel dessa proteína nos mecanismos de resistência do parasita ao antimônio (Maharjan et al., 2015). Em alguns estudos foi observado que a HSP70, quando superexpressa, aumentou a tolerância ao SbIII em mutantes resistentes de *Leishmania*, quando também superexpressos, o que indica seu potencial de defesa contra a droga (Brochu et al., 2004).

Sabe-se que as proteínas HSP70 mitocondriais desempenham função essencial na importação proteica para a mitocôndria, onde a atividade ATPase proporciona a força motora para o transporte de polipeptídeos através das duas membranas mitocondriais (Rassow et al., 1999). Elas também participam no dobramento daquelas proteínas que são sintetizadas pela maquinaria de tradução mitocondrial, bem como protegem as proteínas mitocondriais de eventos estressores (Campos, 2007).

O estudo do perfil da expressão genética pode demonstrar a relação da alta resistência de algumas cepas. A detecção de modificações na expressão de proteínas envolvidas em vias metabólicas importantes, incluindo a glicólise, gliconeogênese, estresse oxidativo entre outros podem ter um papel fundamental na sobrevivência do parasita e torná-los mais resistentes comparando-se com outros que não tenham essa super expressão. No decurso do surgimento de resistência à droga, o parasita pode expressar conjunto potencial de genes que são expressos diferentemente. As proteínas do parasita identificadas poderiam servir como marcadores substitutos para resistência ou susceptibilidade (Biyani, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar a super expressão das proteínas malato desidrogenase, proteína de choque térmico HSP70 e subunidade alfa ATPase de culturas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes com diagnóstico de LTA sem resposta adequada ao tratamento comparando-as com as proteínas de isolado padrão de *L. (V.) braziliensis*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Clonar e expressar as proteínas putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor, ATPaseLb subunidade alfa e Malato Desidrogenase Lb de *Leishmania* na sua forma recombinante em sistema heterólogo em *E.coli*.

3.2.2 Purificar as referidas proteínas recombinantes por afinidade em coluna de agarose-níquel.

3.2.3 Produção de anticorpos específicos.

3.2.4 Analisar por *western blot* o padrão de expressão das referidas proteínas em extratos das cepas criopreservadas de pacientes que não responderam adequadamente aos tratamentos com N - metilglucamina (NMG).

3.2.5 Comparar o padrão encontrado das cepas de pacientes com extrato de cepa controle de *L. (V.) braziliensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolados de *Leishmania* estudados.

4.1.1. Isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes: culturas identificadas por técnicas moleculares (Graziani, 2013) de pacientes considerados resistentes e não resistentes ao tratamento com SbV mantidas criopreservadas (-96°C) no laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

4.1.2. Cultura controle de *Leishmania* identificada como *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/M15176), cedido pelo Instituto Evandro Chagas-Belém, Pará.

4.2 Realização de culturas dos isolados dos pacientes.

No laboratório de Dermatologicologia, da Faculdade de Medicina, após descriopreservação da amostra de cultura, foi coletado uma alíquota do mesmo, com auxílio de uma seringa de 1mL contendo 0,2-0,5mL de solução salina. O material aspirado foi adicionado ao meio McNeal, Novy e Nicolle (NNN), pH 7,2 a 22 °C e acompanhado durante cinco dias. Após esse período, a cultura foi transferida para o meio Schenneider suplementado com 0,02% de gentamicina e 20 % de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram então processadas no Laboratório de Interação Parasita Hospedeiro, da Universidade de Brasília, onde foram mantidas em incubadora e tiveram o seu crescimento controlado diariamente até atingir a quantidade satisfatória de 10⁷ células por mL.

4.3 Contagem dos parasitas

Após replicação das formas promastigotas, ou seja, com os parasitas em fase logarítmica, a cultura foi diluída dez vezes colocando-se 90 µL de cultura e 10 µL de formaldeído com o objetivo de imobilizar as formas. Em um outro tubo os parasitas fixados foram suspensos em uma solução contendo 10µL do meio de cultura e 90µL de PBS, Após homogeneização foi utilizado 10µL dessa suspensão para preencher a câmara de Neubauer onde foi realizada a contagem dos parasitas.

Foram contados dois quadrantes na diagonal dos dezesseis quadrados e calculado o número de parasitas. A concentração final na amostra utilizada para as próximas etapas foi de 1×10^7 células por mL.

4.4 Extração de DNA dos parasitas

Para extração de DNA das culturas de *Leishmania* utilizou-se o protocolo de Medina-Acosta e Cross (1993) modificado. Fez-se a preparação prévia da massa de cultura a ser extraída. Primeiramente, 1×10^7 de células foram separadas por centrifugação em tubo de Falcon (50mL), 3400rpm por 10 minutos e descartado o sobrenadante. Repetiu-se o processo de centrifugação a 3400rpm por 5 minutos com posterior descarte do sobrenadante e suspensão do sedimento em 5 mL de PBS estéril por três vezes. O pellet obtido foi ressuspensionado com o tampão TELT (Tris-HCl 10mM, EDTA 100mM, SDS 0,5%) contendo RNase a $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ e incubado a temperatura de 37°C por 2 horas. Posteriormente foi adicionado proteinase K e incubado a 50°C por 18h. O material lisado foi dividido em tubos de 2mL. Adicionou-se fenol/clorofórmio aos tubos e levou-se a fraca agitação por 5 minutos. As fases foram separadas por centrifugação a $13000 \times g$ por 5 minutos e a fase aquosa foi recuperada. Nesta foi adicionada etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e permaneceu em temperatura ambiente por 5 minutos. Novamente centrifugar a $13000 \times g$ por 10 minutos e lavado o pellet com etanol 70%, centrifugado e etanol descartado. O pellet foi seco e ressuspensionado com tampão TE (Tris-HCl e EDTA).

O DNA genômico de promastigotas da cepa de *L. (V.) braziliensis* controle foi extraído e o material foi alíquotado e armazenado a -20°C e, posteriormente, utilizado em reações de polimerização em cadeia (PCR).

4.5 Desenho dos primers

Os primers foram desenhados com a finalidade de amplificar e seqüenciar as regiões das proteínas *putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor*, *ATPaseLb subunidade alfa* e *Malato Desidrogenase Lb*. Foi realizado um alinhamento das regiões supracitadas disponíveis no GenBank. Para o desenho dos primers foi levado em consideração a clonagem futura no kit *In-Fusion®*

HD Cloning considerando-se as extremidades homólogas e sequência específica para o gene alvo, além de serem definidas as enzimas de restrição específicas para o estudo.

4.6 PCR

Cada reação de PCR foi padronizada de acordo com o *primer* utilizado, sendo compostas de tampão da reação (200mM Tris-HCl pH 8.4, 1,5 mM MgCl₂, 500mM KCl), dNTPs, Taq polimerase (GE Healthcare) os *primers* e o DNA da *Leishmania* em um volume total de 50µl. Foi levado em consideração as principais etapas de desnaturação da fita molde de DNA (duração entre 30 s a 1 min a temperatura entre 92 °C a 96 °C; o pareamento dos iniciadores da reação de polimerização e a ligação à região complementar da fita de DNA (duração de 30 s a 1 min a temperatura entre 58 °C e 65 °C; e a amplificação das novas fitas (duração entre 45 s e 1 min a 72 °C). Os produtos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose de 1 a 1,5%, corados com brometo de etídio a 0,5µg/ml, visualizados em transiluminador e fotografados.

Foram realizadas diversas amplificações utilizando a *Taq polimerase* com o intuito de padronizar as condições ideais para cada um dos *primers* (Tabelas 1 e 2). Foram avaliados os quantitativos dos reagentes utilizados, realizados gradientes de temperatura no anelamento das amplificações, alterando o quantitativo de ciclos entre outras alterações para formação e finalização de melhores produtos. Esta padronização foi realizada e utilizada para continuidade da pesquisa a amplificação com Pfx 50™ DNA polimerase (Ivitrogen) uma vez que esta corrige os erros durante a síntese do DNA.

Tabela 1: Padronização das condições de PCR para HSP70LB, Malato Desidrogenase Lb e ATPaseLb.

	Enzima µl	Tampão µl	DNTP µL	Mg µL	Primer 1 µL	Primer 2 µL	DNA	Água Milliq
HSP70LB	0,4	5,0	0,8	----	1,5	1,5	1,5	39,3
Malato	0,8	5,0	0,8	-----	2,0	2,0	2,0	37
ATPaseLb	0,4	5,0	0,8	----	1,5	1,5	1,5	39,3

Tabela 2: Padronização das condições de PCR para HSP70LB, Malato Desidrogenase Lb e ATPaseLb.

HSP70Lb	Malato Desidrogenase Lb	ATPaseLb
---------	-------------------------	----------

	94°C/4min		94°C/4min		94°C/4min
30 x	94°C/1min	5 x	94°C/1min	5 x	94°C/1min
	58°C/45seg		50°C/45seg		57°C/45seg
	68°C/1min		72°C/1min 30seg		68°C/1min 30seg
		25 x	94°C/1min	30 x	94°C/1min
			55°C/45seg		60°C/45seg
			72°C/1min 30seg		68°C/1min 30seg
	72°C/5min		72°C/5min		68°C/5min
	4°C/∞		4°C/∞		4°C/∞

4.7 Purificação da PCR

A banda correspondendo aos fragmentos desejados foi cortada e purificada utilizando-se kit de purificação de gel *GFX™ PCR DNA and gel band purification kit da GE Healthcare Illustra™* eluída com água MilliQ e armazenada a -20°C.

4.8 Produção de células competentes

As células *E. coli* DH5α™ armazenadas em glicerol a -80 °C foram semeadas por esgotamento em meio Agar Luria Bertani (LB) sem antibióticos e incubadas a 37 °C por aproximadamente 18 horas (durante a noite). Foram transferidas 4 a 5 colônias isoladas de *E. coli* de 1-2 mm para um tubo contendo 1 mL de meio LB líquido sem antibióticos, que foi homogeneizado com o “vortex” em moderada velocidade para dispersar bem as bactérias. O conteúdo do tubo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio LB sem antibiótico e incubado a 37 °C por 3 horas sob agitação constante de 200 x rpm até que atingisse uma densidade óptica (DO), medida em espectrofotômetro sob o comprimento de onda de 600 nanômetros (DO600), de 0,4 – 0,6. Foi acrescentado 50 mL de meio LB pré-aquecido a 37 °C sem antibióticos e novamente a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação constante de 200 x rpm até que o crescimento bacteriano atingisse uma DO600 de 0,6 (cerca de 30 minutos de incubação).

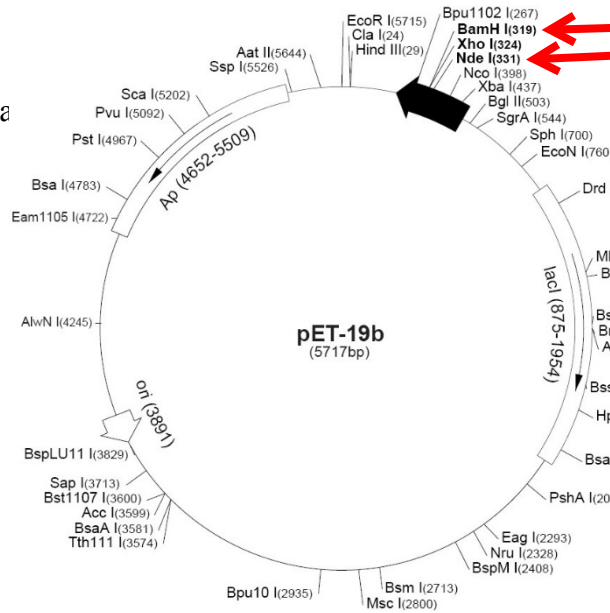
Os cultivos de 100 mL do crescimento bacteriano foram divididos em dois tubos de centrifuga e mantidos em banho de gelo por 10 minutos para baixar a temperatura da cultura para 0 °C. Após isso, as células foram recuperadas por centrifugação a 2500 x g por 10 minutos a 4 °C. Cuidadosamente, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e o “pellet” celular de cada tubo foi ressuscitado em 50 mL de cloreto de cálcio (CaCl₂) 100 mM gelado. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas (2500 x g por 10 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi descartado, o “pellet” celular de cada tubo foi ressuscitado em 25 mL de CaCl₂ 100 mM gelado e as células ressuscitadas foram reunidas em um único tubo o qual foi novamente centrifugado, conforme já descrito acima. Descartou-se, então, o sobrenadante e o “pellet” foi suavemente ressuscitado em 5 mL de Ca Cl₂ 100 mM gelado e incubado em banho de gelo durante 15 minutos. Adicionou-se, lentamente gota-a-gota, 1,0 mL de glicerol 70% estéril gelado, sob agitação constante do frasco em banho de gelo. As células foram envasadas em criotubos (200 µl/criotubo) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o rápido congelamento, as ampolas com as células foram estocadas no ultra congelador -80 °C.

4.9 Clonagem

Após avaliação do sequenciamento, os genes foram sub clonados individualmente no vetor pET-19b que permite a fusão de uma cauda de 10 His na porção N-terminal da proteína recombinante. Após o vetor de clonagem ter sido linearizado pelas enzimas de restrição (NdeI e BamHI) foi purificado usando o kit de purificação gel *GFX™ PCR DNA and gel band purification kit da GE Healthcare Illustr™*. Os genes foram clonados no pET19b nos sítios NdeI e BamHI, que estão presentes nas sequencias dos iniciadores utilizados na amplificação, com a finalidade de obtermos as proteínas recombinantes para estudos funcionais.

Posteriormente os fragmentos purificados de PCR (Malato, HSP e ATPaseLb) foram misturados e acrescidos ao kit *In-Fusion® HD Cloning* o qual teve todo o protocolo realizado e, após a utilização deste o conteúdo resultante foi transformado por choque térmico na cepa DH5α de *Escherichia coli*. As células submetidas ao processo de transformação, foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50µg/ml), e incubadas por toda a noite a 37 °C. As colônias resultantes do processo foram escolhidas e posteriormente realizado o PCR para verificação da clonagem. As colônias foram repicadas em placas com meio LB-ágar contendo ampicilina (50µg/mL). O DNA

plasmidial das colônia
enzimática com NdeI
crescidas nas placas
líquido e ampicilina.



e de restrição
) . As colônias
do meio LB

Figura 2: Vetor pET – 19b demonstrando o sítio de clonagem entre BamH e Nde.

4.10 Expressão das proteínas recombinantes

Os genes de *L. (V.) braziliensis* que foram amplificados por PCR utilizando primers desenhados a partir das sequências pré estabelecidas e clonados em *In-Fusion® HD Cloning* foram transformados e expressos em *E. coli* BL21 (DE3). As células transformadas foram crescidas em meio LB suplementado com 50µg/mL de ampicilina a 37 °C. As células foram induzidas a Abs₆₀₀ de 0,6 com isopropil-1-β-D-galactopiranosídeo (IPTG) e arabinose nas condições de concentração, temperatura e tempo padronizadas para cada gene (Bastos et al., 2005).

A cultura de bactérias foi centrifugada a 3.000g por 5 minutos e após este período o sobrenadante foi descartado. As bactérias foram ressuspensas com tampão de lise (50mM NaH₂PO₄, 0,3M de NaCl, 10 mM de imidazol e 0,2% de lisozima) para purificação em resina Agarose-Níquel (Sigma). A produção e solubilidade das proteínas recombinantes foram avaliadas em SDS-PAGE 15% corados com azul de Coomassie.

4.11 Western blot

Os extratos solúveis e insolúveis de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram submetidos a SDS/PAGE 12%. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham) utilizando tampão de transferência 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol e 0,1% SDS). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com PBS/leite 5% para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 5 min cada com PBS. A membrana então foi incubada com anticorpo primário, sendo este o anti-His tag na concentração de 1:1.000 em solução de PBS/leite 1% por 16 h (para confirmar a expressão) e incubadas com soro pré imune ou imune na concentração de 1:1.000 (para confirmar a produção de anticorpos contra a proteína recombinante – ATPase e HSP 70). A seguir, a membrana foi lavada novamente 3x com PBS e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina - *Goat Anti-mouse IgG alkaline Phosphatase Conjugate* (Novagen) na concentração de 1:3.000. A membrana para confirmação da expressão foi então incubada no tampão da fosfatase alcalina por 10 min e os imunocomplexos formados foram revelados com o substrato da fosfatase-alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato/Nitro Blue Tetrazolina – NBT/BCIP (Promega). As membranas para confirmação de produção de anticorpo foram incubadas com Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) e visualizadas no sistema de detecção enzimática por quimioluminescência, com anticorpos conjugados com peroxidase de rábano (HRP) que catalisam a oxidação do luminol em presença de peróxido, o que resulta em emissão de luz no equipamento ImageQuant™ LAS 4000.

4.12 Produção de anticorpos.

A proteína solúvel purificada foi administrada na derme de 4 camundongos machos C57BL/6 para cada proteína recombinante para a produção de anticorpos. Antes do primeiro desafio, amostras de sangue foram coletadas, os soros foram separados das mesmas, diluídos em glicerol (1:1) e estocados a -20°C. Os animais receberam quatro doses do antígeno em intervalos de 15 dias. A primeira imunização constitui-se de 5µg de cada uma das proteínas homogeneizadas com adjuvante completo de Freund. As

duas imunizações seguintes consistiram de 5µg de cada uma das proteínas homogeneizadas com adjuvante incompleto de Freund. A última imunização ocorreu com 5µg de cada uma das proteínas purificadas sem adjuvante. Os soros imunes foram coletados após 5 dias do último desafio, diluídos em glicerol (1:1) e avaliados em *immunoblot* para avaliar a produção de anticorpos específicos. Além dos soros imunes foram avaliados os soros pré imunes dos animais utilizando-se o extrato solúvel e insolúvel de *L. (V.) braziliensis* assim como a proteína recombinante em diferentes concentrações.

4.13 Preparo dos extratos das culturas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes considerados resistentes e não resistentes aos tratamentos.

Foi definido neste trabalho como paciente resistente ou com falha terapêutica aqueles que foram tratados com a dose de 20mg/Sbv/kg/dia durante 20 dias para a forma cutânea e 30 dias para a forma mucosa e apresentaram não reepitelização das lesões, presença de infiltração, eritema ou exsudato aos 90 dias após a conclusão do tratamento, ou cicatrização inicial com reaparecimento de lesão em qualquer momento após a conclusão do tratamento. Foram classificados como não resistentes ou curados, os pacientes que apresentaram reepitelização das lesões, ausência de infiltração, eritema ou exsudato aos 90 dias após a conclusão do tratamento.

No laboratório de Dermatologicologia, da Faculdade de Medicina, um total de 26 amostras de cultura de pacientes foram descriopreservadas do nitrogênio líquido. Dentre as culturas 8 eram de pacientes que não responderam ao tratamento com antimonial pentavalente (denominados resistentes) e 18 eram de pacientes que responderam adequadamente (denominados não resistentes). As amostras foram coletadas com auxílio de uma seringa de 1mL contendo 0,2-0,5mL de solução salina. O material aspirado foi adicionado ao meio McNeal, Novy e Nicolle (NNN), pH 7,2 e deixado a 22 °C por cinco dias, variando este período entre as culturas. Após esse período, as culturas foram transferidas para o meio Schenneider suplementado com 0,02% de gentamicina e 20 % de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram levadas para o Laboratório de Interação Parasita Hospedeiro, da Universidade de Brasília, onde foram mantidas em estufa e tiveram o seu crescimento controlado diariamente até atingir a quantidade satisfatória de 10⁷ células por mL. No momento em que a cultura atingiu a quantidade satisfatória, foi separada em três garrafas distintas contendo 5mL em cada e

posteriormente realizada o tratamento de duas com o IC50 do N- metil glucamina (NMG) ficando identificadas como controle, 24 horas e 48 horas. As culturas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos, e após, foram lavadas 3 vezes com PBS o pellet foi ressuspenso em tampão de lise - 50 mM Tris-Hcl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 10 mM EDTA e coquetel inibidor de protease.

4.14 Extirpação parcial da membrana do *Western blot*.

Foi realizado a extirpação parcial das membranas utilizando-se solução de pH elevado. As membranas após terem sido visualizadas e fotografadas no equipamento ImageQuant™ LAS 4000 foram submersas e incubadas por 5 minutos em NaOH 0,2M seguido de lavagem com água por 5 minutos, esse processo foi realizado duas vezes. Antes de incubação no primeiro anticorpo, a membrana foi rebloqueada com TBS/leite 5% por 30 minutos.

4.15 Reincubação da membrana de *Western blot*.

As membranas foram incubadas com anticorpo primário, como descrito acima.

4.16 Quantificação das bandas proteicas.

As membranas foram avaliadas e as bandas foram comparadas no aparelho ImageJ. Posteriormente utilizamos as bandas de 50 kDa anti – tubulina (anti tat) para análise das densidades realizando a normalização do *Western blot*. Essa análise foi realizada para todos os blots os quais utilizamos anti tat, visto que, as tubulinas são proteínas que compõem os microtúbulos é são altamente conservadas entre as espécies sendo, portanto essencial para controle, verificação e normalização dos *Western blot* realizados.

4.17 Comitê de Ética.

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília pelo número UnBDoC nº 152483/2014.

4.18 Avaliação estatística.

Para a análise dos dados foi utilizado o Teste t de Student.

5. RESULTADOS

5.1 Análise das sequências

5.1.1 Busca no genoma do número de sequências

Inicialmente foi realizada uma busca no site Gene DB (www.genedb.org) das sequências existentes de cada um dos genes observados como super expressas de *L. braziliensis* como relatado por Urdapilletta (2011). Houve a análise das sequências *in silico* do genoma usando BLAST e alinhamento com CLUSTALW.

Para a Malato Desidrogenase Lb observou-se cinco sequências distintas: LbrM.20.0010 - malato desidrogenase mitocondrial; LbrM 20.0020 – malato desidrogenase, putativa; LbrM.20.0030 - malato desidrogenase; LbrM.20.0040 - malato desidrogenase, putativa; LbrM.28.3070 - cytosolic malato desidrogenase citosolica; LbrM.19.1020 - malato desidrogenase glicossomal. Para ATPaseLb subunidade alfa foram observadas duas sequências distintas: LbrM.05.0510 e LbrM.05.0520. Para a HSP70LB foram observadas seis sequências distintas: LbrM.30.2500; LbrM.30.2430; LbrM.30.2410; LbrM.30.2420; LbrM.30.2440; LbrM.30.2450.

5.1.2 Alinhamento entre as sequências

Posteriormente foi realizado o alinhamento e análise entre as sequências encontradas para a definição das regiões a serem desenhadas. O alinhamento teve como papel principal a observação comparativa entre os alelos com o objetivo de identificar quantos desses diferiam para cada gene, além da busca de regiões exclusivas das proteínas estudadas.

Observou-se que nos alinhamentos das sequências da Malato Desidrogenase Lb, ATPaseLb subunidade alfa e HSP70LB ocorreu uma similaridade de 74% (Figura 3) e 100% (Figura 4), respectivamente. No entanto, é possível notar pelo alinhamento que a sequência LbrM.05.0510 de HSP70LB apresenta uma extensão N-terminal que não está presente na LbrM.05.0520. Na análise do alinhamento realizado com HSP70LB (Figura 6) foi possível perceber que houve grande intervalo de variação entre as análises de 6,34 a 100% de similaridade o que demonstrou uma diferença significativa entre alguns alinhamentos e em outras obtendo-se alelos idênticos.


```

LbrM.30.2500 -----MFARRVCGGA-----AVSAARLVRCEsqKVTG----DVIG 31
LbrM.30.2450 -----MFARRVCGGA-----AVSAARLVRCEsqKVTG----DVIG 31
LbrM.30.2420 -----MFARRVCGGA-----AVSAARLVRCEsqKVTG----DVIG 31
LbrM.30.2440 -----MFARRVCGGA-----AVSAARLVRCEsqKVTG----DVIG 31
LbrM.30.2430 VVLVGGMTRMPKVVVEVKRFFQKEPFRGVNPDEAVALGAATLGGVLRGNVGGGLILVDVTP 120
LbrM.30.2410 VVLVGGMTRMPKVVVEVKRFFQKEPFRGVNPDEAVALGAATLGGVLRGNVGGGLILVDVTP 99
                :* :. * . * : ** * : * * **
LbrM.30.2500 VDLGT-----TYS CVATMDGDKARVLENS EGFRTTPSVVAFKGS 70
LbrM.30.2450 VDLGT-----TYS CVATMDGDKARVLENS EGFRTTPSVVAFKGS 70
LbrM.30.2420 VDLGT-----TYS CVATMDGDKARVLENS EGFRTTPSVVAFKGS 70
LbrM.30.2440 VDLGT-----TYS CVATMDGDKARVLENS EGFRTTPSVVAFKGS 70
LbrM.30.2430 LSLGTSVIGDIFVPIIPKNTVIPCKRSHTFTTVEDGQTAIKFEVFQGEREMASDNQMMGQ 180
LbrM.30.2410 LSLGTSVIGDIFVPIIPKNTVIPCKRSHTFTTVEDGQTAIKFEVFQGEREMASDNQMMGQ 159
:.***          ::. . . ** : * : * * . * : * .
LbrM.30.2500 EKLVLGAAKRQAITNPQSTFYAVKRLIGRRFEDEHIQRDIKNVPYKIVRAGNGDAWVQDG 130
LbrM.30.2450 EKLVLGAAKRQAITNPQSTFYAVKRLIGRRFEDEHIQRDIKNVPYKIVRAGNGDAWVQDG 130
LbrM.30.2420 EKLVLGAAKRQAITNPQSTFYAVKRLIGRRFEDEHIQRDIKNVPYKIVRAGNGDAWVQDG 130
LbrM.30.2440 EKLVLGAAKRQAITNPQSTFYAVKRLIGRRFEDEHIQRDIKNVPYKIVRAGNGDAWVQDG 130
LbrM.30.2430 FDLVGIPPA PRGVPQVEVTFDIDANGICHVTAKDKATCRKQGIVVAASGGLSKEQIEQML 240
LbrM.30.2410 FDLVGIPPA PRGVPQVEVTFDIDANGICHVTAKDKATCRKQGIVVAASGGLSKEQIEQML 219
.***:. . . : : * * . * : . : : . : : . : *
LbrM.30.2500 -NGKQYSPSQVGA FVLEKMKETAQNFLG-----HTVSNNAVVTCPAYFNDAQRQATK 180
LbrM.30.2450 -NGKQYSPSQVGA FVLEKMKETAQNFLG-----HTVSNNAVVTCPAYFNDAQRQATK 180
LbrM.30.2420 -NGKQYSPSQVGA FVLEKMKETAQNFLG-----HTVSNNAVVTCPAYFNDAQRQATK 180
LbrM.30.2440 -NGKQYSPSQVGA FVLEKMKETAQNFLG-----HTVSNNAVVTCPAYFNDAQRQATK 180
LbrM.30.2430 RDAAQHAKADRVKRELVEARNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENVKTHVAELRKAME 300
LbrM.30.2410 RDAAQHAKADRVKRELVEARNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENVKTHVAELRKAME 279
. . * : : : * : : : * . * : . : : . : : . : * : * :
LbrM.30.2500 DAGTIAGLNVIRVVNEPTAAR--CGRD----- 205
LbrM.30.2450 DAGTIAGLNVIRVVNEPTAALAYGMDKTKDS----- 212
LbrM.30.2420 DAGTIAGLNVIRVVNEPTAALAYGMDKTKDSLIAVYDLGGGTFDISVLEIAGGVFEVKA 240
LbrM.30.2440 DAGTIAGLNVIRVVNEPTAALAYGMDKTKDSLIAVYDLGGGTFDISVLEIAGGVFEVKA 240
LbrM.30.2430 NP--NVAKDDLVAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANS GSSSNSGEGQQQQQSSSEKN--- 356
LbrM.30.2410 NP--NVAKDDLVAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANS GCK----- 318
. . . : * : : : . : : * *
LbrM.30.2500 ----- 300
LbrM.30.2450 ----- 300
LbrM.30.2420 TNGDTHLGGEDFDLALSDYILEEFRKTS GIDL SKERMALQRVREAAEKAKCELSSAMETE 300
LbrM.30.2440 TNGDTHLGGEDFDLALSDYILEEFRKTS GIDL SKERMALQRVREAAEKAKCELSSAMETE 300
LbrM.30.2430 -----
LbrM.30.2410 -----
LbrM.30.2500 ----- 360
LbrM.30.2450 ----- 360
LbrM.30.2420 VNLPFITANADGAQH I QMH I SRSKFEGITRLIERSIAPCKQCIKDAGVELKEINDVVLV 360
LbrM.30.2440 VNLPFITANADGAQH I QMH I SRSKFEGITRLIERSIAPCKQCIKDAGVELKEINDVVLV 360
LbrM.30.2430 -----
LbrM.30.2410 -----
LbrM.30.2500 ----- 420
LbrM.30.2450 ----- 420
LbrM.30.2420 GGMTRMPKVVVEVKRFFQKEPFRGVNPDEAVALGAATLGGVLRGDVKGLVLLDVTPLSLG 420
LbrM.30.2440 GGMTRMPKVVVEVKRFFQKEPFRGVNPDEAVALGAATLGGVLRGDVKGLVLLDVTPLSLG 420
LbrM.30.2430 -----
LbrM.30.2410 -----
LbrM.30.2500 ----- 480
LbrM.30.2450 ----- 480
LbrM.30.2420 IETLGGVFTRMIPKNTTIPTKKSQTFSTAADNQTQVG I KVFQGEREMAADN QMMGQFDLV 480
LbrM.30.2440 IETLGGVFTRMIPKNTTIPTKKSQTFSTAADNQTQVG I KVFQGEREMAADN QMMGQFDLV 480
LbrM.30.2430 -----
LbrM.30.2410 -----
LbrM.30.2500 ----- 540
LbrM.30.2450 ----- 540
LbrM.30.2420 GIPPA PRGVPQVEVTFDIDANGICHVTAKDKATGKTQNI TITAHGGLSKEQIEQMVRDSE 540
LbrM.30.2440 GIPPA PRGVPQVEVTFDIDANGICHVTAKDKATGKTQNI TITAHGGLSKEQIEQMVRDSE 540
LbrM.30.2430 -----
LbrM.30.2410 -----
LbrM.30.2500 ----- 600
LbrM.30.2450 ----- 600
LbrM.30.2420 QHAEADRVKRELVEARNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENVKTHVAELRKAMENPNV 600
LbrM.30.2440 QHAEADRVKRELVEARNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENVKTHVAELRKAMENPNV 600
LbrM.30.2430 -----

```

```

LbrM.30.2410 -----
LbrM.30.2500 -----
LbrM.30.2450 -----
LbrM.30.2420 AKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANS GSSSSNSGEGQQQQQSSEKN----- 651
LbrM.30.2440 AKDDLVAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANS GSSSSNSGEGQQQQQGDQQQQQNSEKK 658
LbrM.30.2430 -----
LbrM.30.2410 -----

```

Sequencia: LbrM	302500	302430	302410	302420	302440	302450
302500		9,76	6,34	97,56	97,56	97,56
302430			98,74	87,36	87,36	9,43
302410				86,79	87,11	6,13
302420					99,08	100
302440						100

Figura 6: Resultado do alinhamento das proteínas HSP70LB LbrM.30.2410 X LbrM.30.2500 X LbrM.30.2450 X LbrM.30.2420 X LbrM.30.2440 X LbrM.30.2430

5.1.3 Desenho dos primers nas regiões dos genes definidos

Após observação dos alinhamentos e levando em consideração as regras para desenho dos primers foram definidas as regiões dos genes a serem utilizadas (Figuras 7, 8 e 9).

```

ATGCGCTGCT CTCGGGCGTA CTTCTCCCGT GTCGCCGTGC TCGGTGCTGC AGGTGGCATT
GGCCAGCCGC TGGCCCTCCT CCTCAAGAAT AACCGCGCAG TGAAGGAGCT GAAGCTGTAC
GACATCAAAG GGGCCCCGGG TGTGGCTGCC GACCTCTCCC ATATTTGCTC GTCAGCGAAA
GTGACTGGGT ACTCGCAGGA GGAGCTCAAT AAGGCTGTCC AGAACACTGA CCTCGTGTG
ATCCCTGCCG GTGTGCCACG CAAACCTGGG ATGACACGCG ACGACCTCTT CAACACGAAC
GCTGGCATCG TGGCGGATCT CGTGACGGCG GTTGCCAGGG CCGCACCGAA GGCCATCATC
GGTGTATCA GCAACCCCGT CAACAGCACT GTGCCGGTGG CTGCGGAGAC GCTGAAGAAG
CTCGGCGCGT ACGATCCTGG GCGCCTATTT GCGGTCACCA CACTCGACGT TGTCCGTGCT
CGTACCTTCG TTGCGGAGGC GTCGGGTAGA AGTCCGTACG ACATCGACGT CCCTGTCTGT
GGCCGCCACA CCGGTGAGAC GATGTGCGCG CTGCTCTCAG GCTTCCCGT ACTGTGGAAG
GAGCAGGTGG AGCAGCTGAC GTACCGCATC CAGTTTGGTG GGGATGAGGT GGTGAAGGCG
AAAAGTGGAG CTGGCTCGGC GACGCTGTCC ATGGCGCAGC CGGAAAACGA ATGGGCTACG
CGGTGTGCTG CCGCCCTCAG CCGTGAGAAG GGTGTACAG TGTGCACGTA TGTGGAGAGC
AGTGTGGAGC CGTCATGTAC CTTCTTTAGC TCCCCGGTGG AGCTGGGCAA GAATGGTGTG
GAGAAAATTC ATTGTGTGCC GAAGCTGAAC GCATACGAGG AAAAAGTGTG GGCCAAGTGC
TTGAGGGGTC TGCAGGGCAA CATCAAAAAG GGAGTCGCTT TTGGCTGCAA GTAA

```

Figura 7: Sequencia do gene de Malato Desidrogenase Lb (LbrM.20.0030) e região definida para o desenho do primer.

```

ATGCTGTGCG CCGGCAAGGG CCGCGGCTCT GTGACGGCGC TGCCGATCGT GGAGACGCTG
TCGAACGATG TGACGGCCTA CATCGTCACG AACGTATCTT CCATCACGGA CGGCCAGATC
TACCTGGACA CGAAGCTGTT CACCGGCGGC CAGCGCCCGG CCGTGAACAT CGGCCGTGCC
GTGTGCGGTG TCGGATCGTC CGCGCAGAAC GTGGCGATGA AGGCCGTGCG CGGCAAGCTG
AAGGCATCC TCGCGGAGTA CCGCAAGCTG GCAGCGGACT CCGTGGGCGG GAGCCAGGTG
CAGACGGTGC CGATGATCCG CCGCGCGCGC TTTGTGCGCG TGTTCACCA GAAGAACCAG
TCGTCTTCA TGAACGCGCT TGTGTCGCTG TACCGTGCCT TGAACGGGTA CCTGGACGAC
GTGAAGGTGA ACTACGCGAA GTTATACGAG TACCTGTGCG TGAACAAGGA CCTGAGCGTG
ATGTACGGGA CCGCGACGAA CAAGTTCTTC TACATGTACG TGACGACGCT GAACTATGTG
ATCCGCTTCT TCACGCTGAG CCACCCGGTC CTAACCGCGG AGGTGGAGGA GATGCTGAAG
CAGCACACGC ATTTGTTTCT GCAGCACTAC CAGTCAAGA TGAACCGGAT CAAGACGGAG
AAGGAGATCA AGGCACTCAA GAACCTGCTG TACTCGTGCA AGCGCGCCGT CTAG

```

Figura 8: Sequencia do gene de ATPaseLb (LbrM.05.0510) e região definida para o desenho do primer.

ATGTTGCTC GTCGTGTGTG CGGAGGCGCT GCGGTGTCCG CTGCGCGGCT GGTGCGCTGC
GAGTCGCAGA AGGTCACGGG CGACGTGATT GCGTGGACC TGGGCACGAC GTACAGCTGC
GTTGCGACGA TGGACGGCGA CAAGGCGCGC GTGCTGGAGA ACTCGGAGGG CTCCGGACG
ACGCCGTCCG TTGTGGCGTT CAAGGGCAGC GAGAAGCTTG TGGGGCTTGC GGCGAAGCGC
CAGGCAATCA CGAACCCGCA GTCGACGTTT TACGCGGTGA AGCGGCTGAT TGGGCGCCGG
TTCGAGGACG AGCACATCCA GAGGGACATC AAGAACGTGC CGTACAAGAT CGTGCGCGCC
GGGAACGGGG ACGCGTGGGT GCAGGACGGG AACGGGAAGC AGTACTCGCC GTCGCAGGTG
GGCGCGTTCG TGCTGGAGAA GATGAAGGAG ACGGCGCAGA ACTTCTGGG GCACACGGTG
AGCAACGCTG TCGTGACGTG CCCC GCGTAC TTCAACGACG CGCAGCGCCA GGCGACGAAG
GACGCCGGGA CGATTGCGGG CCTGAACGTG ATCCGGGTGG TGAACGAGCC GACGGCTGCG
GCGCTGCGT ACGGTATGGA CAAAACGAAG GACAGCTGA

Figura 9: Sequencia do gene de HSP70 (LbrM.30.24.50) e as região definidas para o desenho dos primers (em vermelho).

5.2 Amplificação dos genes

5.2.1 Padronização das condições de PCR

A verificação da amplificação das PCR pode ser visualizada no gel de agarose 1% com as bandas de Malato Desidrogenase Lb, ATPase e HSP70LB, com altura de banda de 954pb, 714pb e 639pb respectivamente (Figura 10).

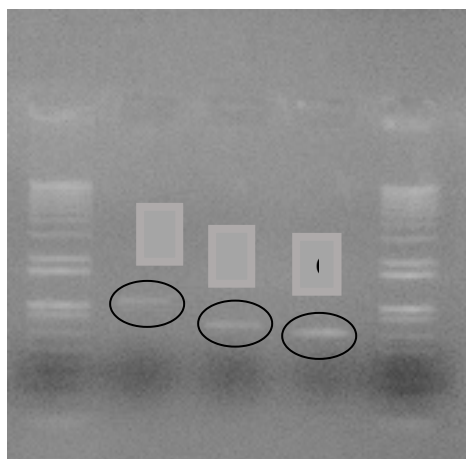
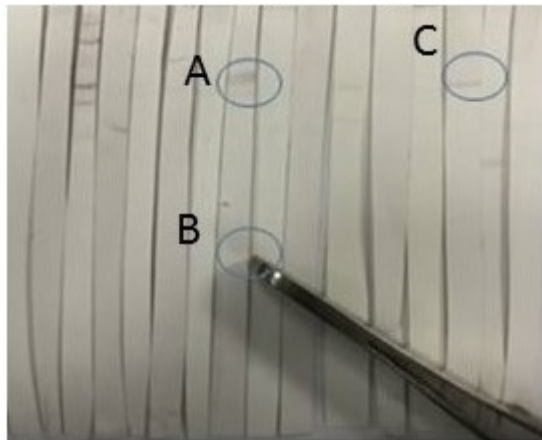


Figura 10: Gel de agarose com amplificação de HSP70Lb, malato e ATPaseLb. A. Malato Desidrogenase Lb; B. ATPaseLb; C. HSP70LB.

5.2.2 Produção de anticorpos

Antes da primeira administração da proteína purificada foi coletado sangue dos animais para análise do soro pré imune para a comparação com a produção de anticorpos específicos. Optou-se pela escolha e utilização do soro de um animal dos quatro inoculados para cada uma das proteínas, animal 12 para ATPase que apresentou banda nas alturas de 62,6kDa (A) e 26,2kDa (B) e o animal 15 para HSP70 que apresentou a banda na altura de 70kDa (C), além de não apresentarem no pré-imune nenhuma banda compatível com os anticorpos produzidos (Figura 16).



- 1 – pré imune ATP/ camundongo 1
- 2 – pré imune ATP/ camundongo 2
- 3 – pré imune ATP/ camundongo 3
- 4 – pré imune ATP/ camundongo 4
- 5 – pré imune HSP/ camundongo 1
- 6 – pré imune HSP / camundongo 2
- 7 – pré imune HSP / camundongo 3
- 8 – pré imune HSP / camundongo 4
- 9 – soro ATP/ camundongo 1
- 10 – soro ATP/ camundongo 2
- 11 – soro ATP/ camundongo 3
- 12 – soro ATP/ camundongo 4 - escolhido
- 13 – soro HSP/ camundongo 1
- 14 – soro HSP / camundongo 2
- 15 – soro HSP / camundongo 3 - escolhido
- 16 – soro HSP/ camundongo 4

Figura 16: Expressão das proteínas recombinantes HSP70Lb e ATPaseLb em extrato de *L. (V.) braziliensis* (padrão OMS) com soro pré imune e após inoculação de oito camundongos. A e B. Expressão do soro anti ATPase; C. Expressão do soro anti HSP70.

Visto que, havia ao menos doze sequencias para o gene de HSP70 e duas para o gene de ATPase subunidade alfa e que dentre essas algumas apresentavam alta identidade entre elas, foi analisado se os anticorpos produzidos apresentavam reações cruzadas entre as isoformas. Para esta observação realizamos *Western blot* com o extrato de isolado de *L. (V.) braziliensis* padrão da OMS e testamos os anticorpos. Notamos que para a ATPase foi utilizada a sequencia da proteína recombinante que possuía massa de 26,2kDa e observou-se que além da produção de anticorpos para a massa esperada houve produção para outra sequencia com massa de 62,6kDa (Figura 17), o que já era previsto, visto que a identidade entre as duas sequencias era de 100%. Para a produção de recombinante de HSP70 utilizamos a sequencia que produziria anticorpos com massa de 22,8kDa e notou-se que foram produzidos além da massa esperada anticorpos com outras massas de 39,3kDa, 70,5kDa e 71,4kDa, situação também prevista já que a similaridade dessas sequencias com a que foi trabalhada era de 87,4% a 100% (Figura 18).

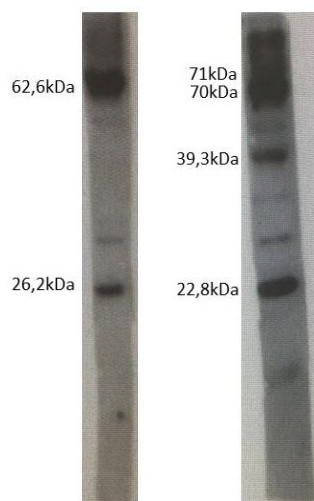


Figura 17: *Western blot* de extrato de *L.(V.) braziliensis* (padrão OMS) usando soro anti-ATPaseLb demonstrando as bandas com alturas aproximadas de 26,2KDa e 62,6KDa. *Western blot* de extrato de *L. (V.) braziliensis* (padrão OMS) usando soro anti-HSP70Lb, demonstrando as bandas com alturas aproximadas de 22,8KDa; 39,3KDa; 70,5KDa e 71,4KDa.

5.2.3 Clonagem e transformação

Após padronização do PCR e realização da amplificação das sequências essas foram eluídas e quantificadas. Concomitantemente a este processo, era realizado o preparo do plasmídeo (pET 19B) o qual foi transformado e realizado a midiprep. Posteriormente utilizou-se as enzimas de restrição para linearização do vetor e para finalizar, este foi purificado e quantificado. No momento em que obtivemos o fragmento de PCR e o vetor linearizado, purificados e quantificados realizou-se a clonagem por recombinação homóloga usando o kit *In-Fusion® HD Cloning*. Em seguida foi realizada a transformação da *E.coli* DH5α com os plasmídeos.

Observa-se um fragmento único após a digestão com BamHI1 com altura de banda de aproximadamente 6356 pb demonstrando o pET19b (5717 pb) e o gene de HSP (639pb) clonado no gel de agarose a 1% (Figura 12).

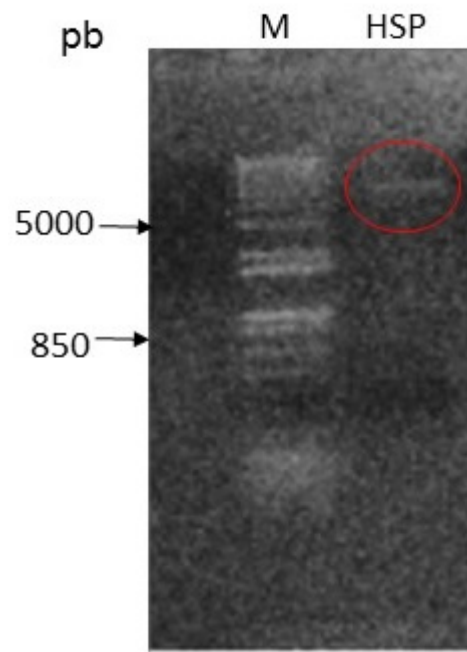


Figura 12: Análise do plasmídeo pET19b-*hsp70lb* após midiprep. M. Marcador *1kb plus DNA ladder* (Ivitrogen).

No gel de agarose 1% foi possível observar um fragmento único após a digestão demonstrando o pET19b (5717 pb) e os genes clonados de Malato desidrogenase (954 pb) e digerido com NdeI (B) ou com BamHI (C) mostrando a linearização do vetor (6431 pb). A construção da ATPase apresentou uma banda de 6671pb quando digerida com NdeI (E) ou BamHI (F) que representa o vetor mais o gene de (714pb) (Figura 13).

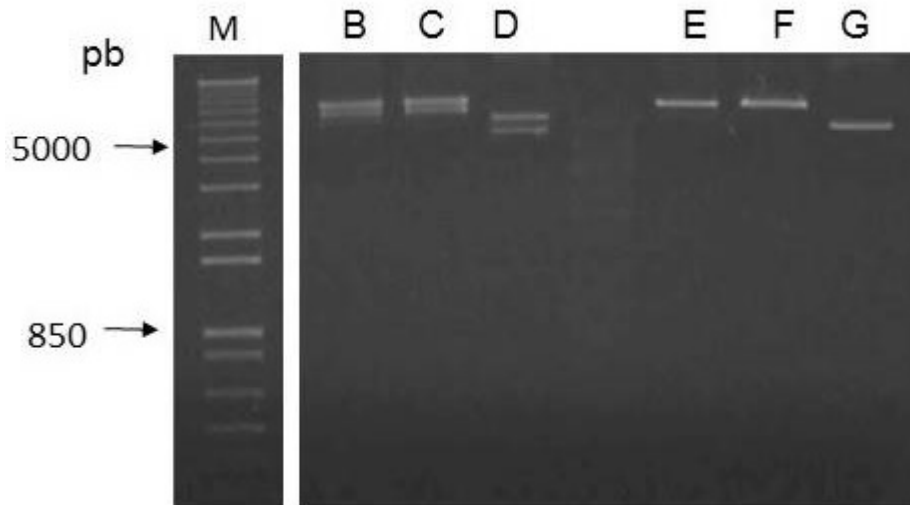


Figura 13: Análise do plasmídeo pET19b-Malato**lb** e pET19b-ATPase**lb**. M. Marcador *1kb plus DNA ladder* (Ivirogen); B. pET19-b Malato**lb** digerido com NDE; C. pET19-b Malato**lb** digerido com BaHmI; D. pET19-b Malato**lb** não digerido; E. pET19-b ATPase**lb** digerido com NDE; F. ATPase**lb** digerido com BaHmI; G. ATPase**lb** não digerido

Os plasmídeos foram encaminhados para realização de sequenciamento e confirmação da clonagem (figura 14). As amostras de HSP 70Lb e de ATPaseLb foram sequenciadas e confirmadas, porém o plasmídeo com a Malato DesidrogenaseLb, mesmo com a digestão sendo visualmente correta, os sequenciamentos realizados não confirmaram a clonagem. Encaminhou-se por mais duas vezes as amostras e não se obteve êxito. Optou-se por não prosseguir com a Malato desidrogenase.

```
>ATPdesenhado
ATGCTGTCGCCCGCAAGGGCGGGCTCTGTGACGGCGCTGCCGATCGTGAGACGCTGTGCGAACGATGTGACGGCTACATCGTCACGAAC
GTCATCTCCATCACGGACGGCCAGATCTACCTGGACACGAAGCTGTTACCCGGCGCCAGCGCCCGGGCCGTGAACATCGGCCTGTCCGTG
TCGCGTGTGGATCGTCCGCGCAGAACCTGGCGATGAAGGCCGTCGCCGGAAGCTGAAGGGCATCCTCGCGGAGTACCGCAAGCTGGC
AGCGGACTCGGTGGCGGGAGCCAGGTGACAGACGGTGCCGATGATCCGCGGCGCGCTTTGTCGCGCTGTTCAACCAGAAGAACCCTG
CGTCTTCATGAACGCGCTTGTGTGCTGTACGCGTGCTGAACGGGTACCTGGACGACGTGAAGGTGAACACTACGCGAAGTTATACGAGT
ACCTGCTGGTGAACAAGGACCTGAGCGTGTGTACGGGACGGCGACGAACAAGTTCTTCTACATGTACGTGCAGCAGCTGAACATATGTA
TCCGCTTCTTACGCTGAGCCACCCGGTCTAAACGCGGAGGTGGAGGAGATGCTGAAGCAGCACACGCATTTGTTCTCGCAGCACTACC
AGTCGAAGATGAACGCGATCAAGACGGAGAAGGAGATCAAGGCACTCAAGAACCTGCTGTACTCGTGAAGCGCGCGTCTAG
```

```
>ATPpromotor
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
GCCCCGCAAGGGCGGGCTCCGTGACGGCGCTGCCGATCGTGAGACGCTGTGCGAACGATGTGACGGCTACATCGTCACGAACGTC
TCTCCATCACGGACGGCCAGATCTACCTGGACACGAAGCTGTTACCCGGCGCCAGCGCCCGGGCCGTGAACATCGGCCTGTCCGTGTCGC
GCGTGGGCTCGTCCGCGCAGAACGTTGGCGATGAAGGCGGTGGCCGGCAAGCTGAAGGGCATCCTCGCGGAGTACCGCAAGCTGGCGGC
GGACTCGGTGGCGGGAGCCAGGTGACAGACGGTGCCGATGATCCGCGGCGCGCTTTCGTCGCGCTGTTCAACCAGAAGAACCCTGCTG
TCTTCATGAACGCGCTTGTGTGCTGTACGCGTGCTGAACGGGTACCTGGACGACGTGAAGGTGAGCTACGCGAAGTTTACGAGTACC
TGCTGGTGAACAAGGACCTGAGCGTGTGTACGGGACGGCGACGAACAAGTTCTTCTACATGTACGTGCAGCAGCTGAACATCGTGTATCC
GCTTCTTACGCTGAACACCCGATCCTGAACGCGGAGGTGGAGGAGATGCTGAAGCAGCACACGCACCTGTTCTCGCAGCACTACCACT
CGAAGATGAATGCGATCNAGACGGANAANNAGATCNAGGCCCTCANGAANCTGCTGTACTCANNGCANGCGCNCCGTCNNNGNNNNNCG
GCTGCNNACANNCCGAANNNTGANNNNNNCGNNCNCNNCANNANCTANCAANNNNNNNNGGGGNCNNNNNAACN
GGN
```

```
>ATPterminador
NNNNNNNNNNNNCGTCTGNACGAGTACAGCAGGTTNNNNNNNGGCTTGTATCTCCTTCCGTCTTGATCGCATTATCTTCTGACTGGTAGTGCT
CGAGGAACAGGTGCGTGTGCTGCTTCCAGCATCTCCTCCACTCCGCTTCCAGGATCGGGTGGTTCAGCGTGAAGAAGCGGATCACGTAGT
```

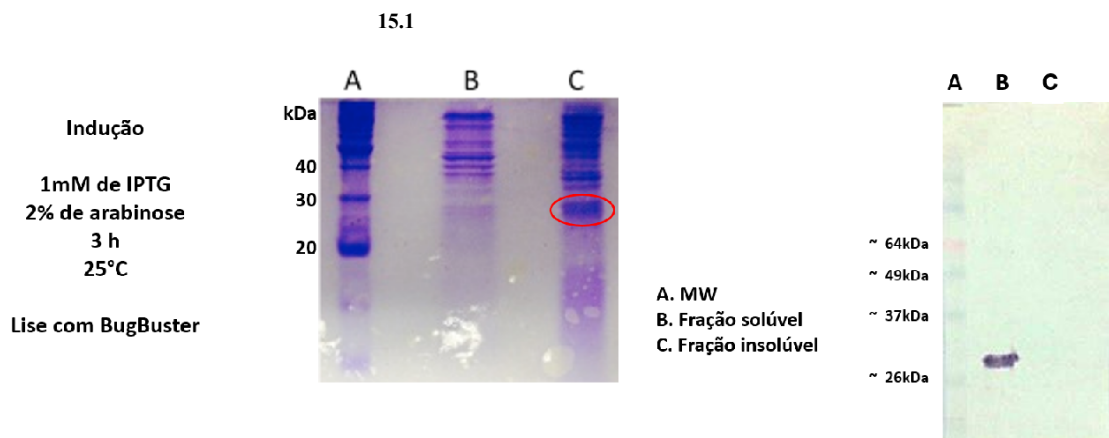



Figura 15: 15.1 SDS-PAGE de HSP 70Lb com a banda de aproximadamente 26kDa na fração insolúvel. A. Marcador *BeachMark™ Protein Ladder*. B. Fração solúvel da proteína HSP70Lb. C. Fração insolúvel da proteína HSP70Lb. 15.2. Expressão de HSP70Lb na fração insolúvel. A. Marcador *Beach Mark™ Pre- Stained Protein Ladder*. B. Fração insolúvel da proteína HSP70Lb com a banda de aproximadamente 26kDa.

5.2.4 Avaliação dos extratos das culturas isoladas de pacientes resistentes e não resistentes.

Foram usados dados coletados da análise do banco do Laboratório de Dermatocologia de isolados armazenados de pacientes atendidos no HUB. Foi feita a seleção de isolados identificados como resistentes e não resistentes ao SbV em outros projetos de alunos do Laboratório de Dermatocologia (Graziani, 2013; Urdapilletta, 2011). No decorrer das análises, ocorreram alguns entraves e a readequação do quantitativo foi necessária finalizando a descriopreservação com 26 amostras. Apenas 12 isolados tiveram a multiplicação de promastigotas e foram utilizadas nas primeiras análises sem o uso da droga NMG, onde 7 cepas foram de pacientes considerados resistentes ao tratamento e 5 foram de pacientes sem resistência ao tratamento. Com os extratos de promastigotas dos pacientes que responderam ao tratamento, de pacientes que não responderam ao tratamento, e com o extrato *L.(V.) braziliensis* (padrão OMS) realizamos os *Western blot* para análise das bandas (figuras 19 a 20).

Os pacientes 3R, 4R, 7R e 8R (figura 19) que em sua totalidade tiveram falha terapêutica, apresentaram as bandas de Anti ATPase de 62kDa e Anti ATPase de 26kDa com intensidade mais forte do que os demais pacientes dentre os que responderam ao tratamento e não responderam ao tratamento.

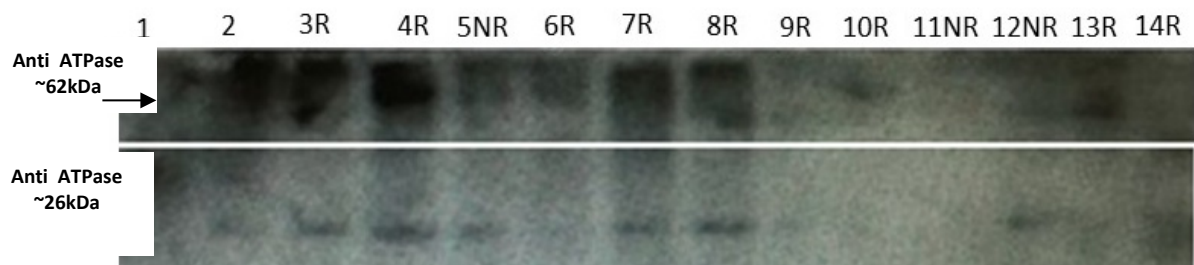


Figura 19: Expressão de ATPaseLb de isolados de pacientes considerados resistentes (3R, 4R, 6R, 7R, 8R, 9R, 10R, 13R e 14R) e não resistentes (5NR, 11NR e 12NR) ao tratamento realizado com N-metilglucamina, utilização de BCIT e NBT. 1. Marcador *Beach Mark™ Pre-Stained Protein Ladder*. 2. Extrato de *L.(V.)braziliensis*, (padrão OMS).

Na figura 20 é possível notar que os pacientes 4R e 8R, apresentaram as bandas de Anti ATPase de 62kDa com maior intensidade que os demais e diferindo dos pacientes 10NR, 12R e 13R que apresentaram maior intensidade de banda no Anti ATPase de 26kDa, sendo que, a intensidade da banda mais forte é de paciente que não teve falha terapêutica, paciente 10NR.

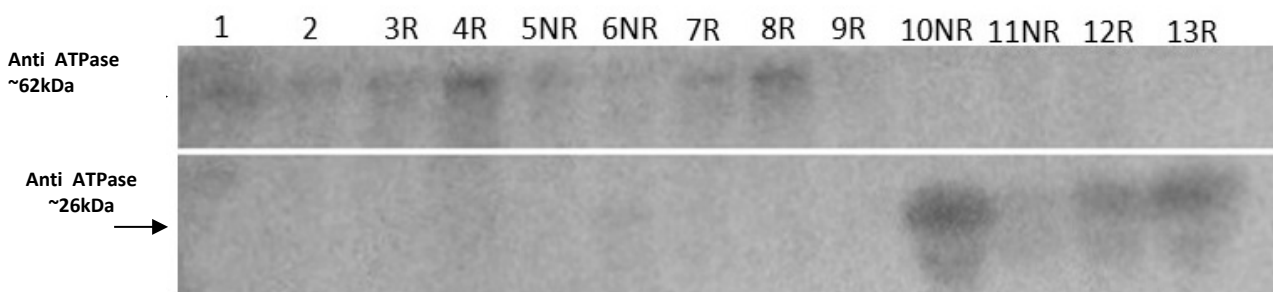


Figura 20: Expressão de ATPaseLb de isolados de pacientes considerados resistentes e não resistentes ao tratamento realizado com N-metilglucamina, utilização de BCIT e NBT. 1. Marcador *Beach Mark™ Pre-Stained Protein Ladder*. 2. Extrato de *L.(V.) braziliensis*, (padrão OMS).

A partir da figura 21, fizemos a avaliação e quantificação das bandas de HSP 70.

Visualmente não podemos confirmar que a análise realizada possui diferença significativa para super expressão comparando-se os pacientes que responderam ao tratamento (5NR e 6NR) e os que tiveram falha terapêutica (2R, 3R e 4R).

Ao realizamos análises estatísticas após normalização e verificação das intensidades das bandas encontramos que, nas situações apresentadas abaixo e entre os isolados comparados $p > 0,05$ não tendo, portanto, significância estatística.

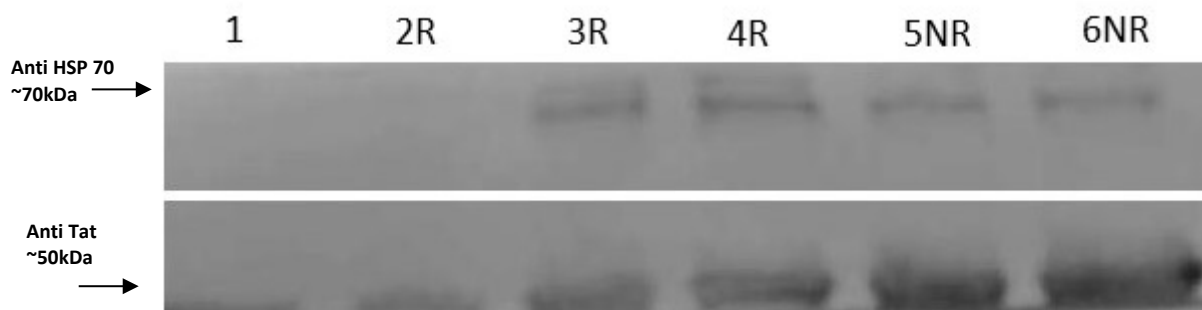


Figura 21: Expressão de isolados de pacientes considerados resistentes (2R, 3R e 4R) e não resistentes (5NR e 6NR). Bandas (~70kDa) anti HSP70Lb e bandas (50kDa) Anti Tat. Utilização de BCIT e NBT. 1. Extrato de *L.(V.) braziliensis* padrão OMS. $P > 0,05$.

Para a realização de uma análise quantitativa optamos por medir a densidade das bandas tanto de interesse do trabalho quanto as bandas reveladas com o anti-tat por meio do software ImageJ como descrito na metodologia. Após normalização com as densidades obtidas com o anti-tat pudemos inferir se houve ou não diferença de expressão da HSP70 e ATPase entre os diferentes isolados de pacientes.

Observou-se que para o quantitativo e cepas trabalhadas não houve diferença entre os pacientes com falha e sem falha terapêutica (Figuras 22, 23 e 24). Sendo que a normalização, unidade arbitrária de intensidade das bandas de pacientes que responderam e pacientes que não responderam ao tratamento, foi variável com a cepa e não de acordo com a resposta ou não do indivíduo tratado.

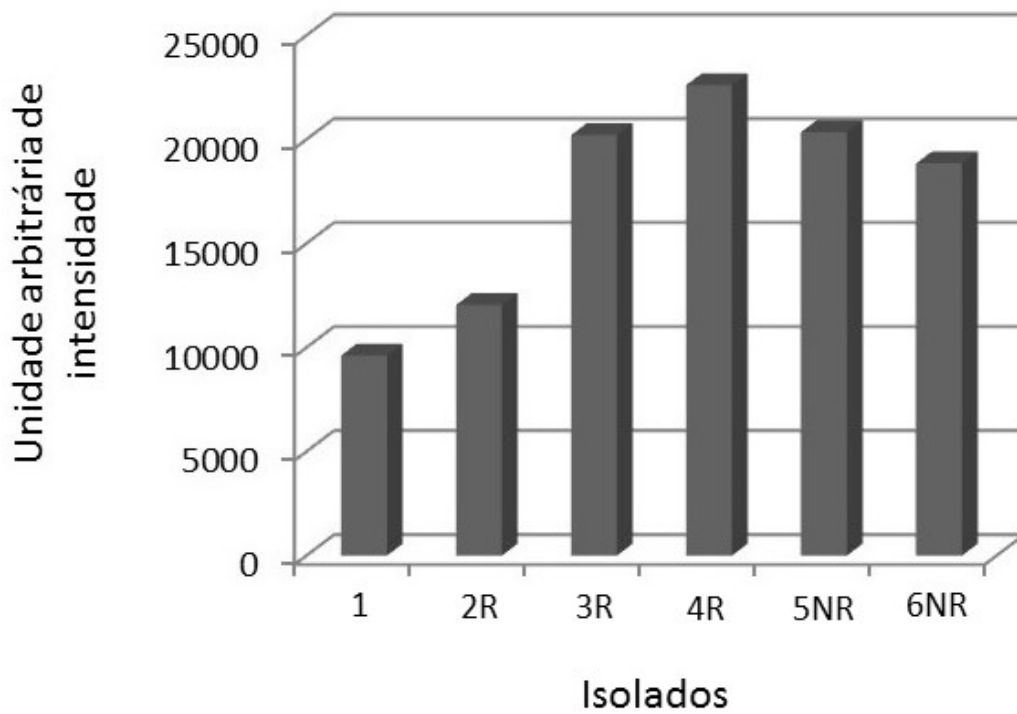


Figura 22: Comparação entre as bandas de HSP70 de isolados de pacientes tratados com IC50 de NMG. 1. Extrato de *L.(V.) braziliensis* padrão OMS.

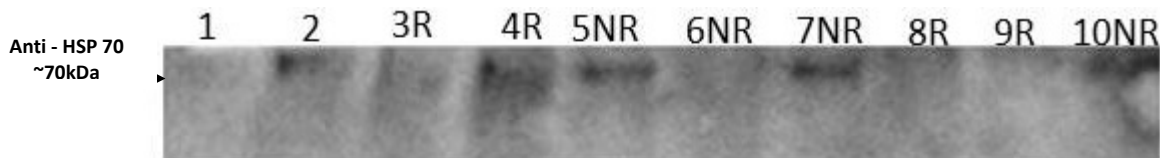


Figura 23: Expressão de HSP70Lb de isolados de pacientes considerados resistentes e não resistentes ao tratamento realizado com N-metilglucamina, utilização para visualização do ImageQuant LAS 4000. 1. Marcador *Beach Mark™ Pre- Stained Protein Ladder*, 2. Extrato de *L. (V.) braziliensis* (padrão OMS).

Anti - HSP 70
~70kDa →

Anti Tat
~50kDa →

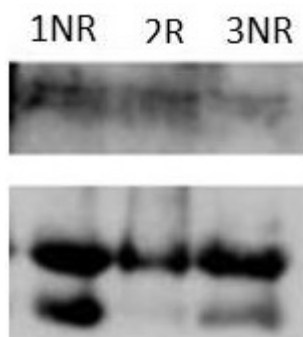


Figura 24: Expressão de HSP70Lb (70kDa) e anti Tat (50kDa) de isolados de pacientes resistentes e não resistentes ao N - metilglucamina, atendidos no Hospital Universitário, utilização para visualização do ImageQuant LAS 4000. $P > 0,05$.

Com a finalização desse processo, percebemos que não obtivemos diferenças quantitativas e qualitativas nas análises realizadas e optou-se por descripreservar novamente as cepas que havíamos analisado sem tratamento, mas agora com protocolo de tratamento com o SbV.

Das 12 cepas que descripreservamos, apenas 7 chegaram no quantitativo mínimo de multiplicação de 1×10^7 /mL. Com essas 7 cepas fizemos subdivisões de 3 grupos (controle sem tratamento, com tratamento por 24 horas e com tratamento em 48 horas), as quais adicionamos o IC50 do NMG. Com os extratos de promastigotas dos isolados dos pacientes realizamos os *Western blot* para análise das bandas (figura 25).

Observou-se novamente que as variações das proteínas não parecem estar diretamente ligadas à resposta ao tratamento com SbV. É possível considerar que algumas cepas possuem como características uma maior quantidade das proteínas analisadas não podendo neste contexto do estudo afirmar que as que não obtiveram resposta ao tratamento possuem super expressão quando comparadas com as que obtiveram resposta ao tratamento com NMG.

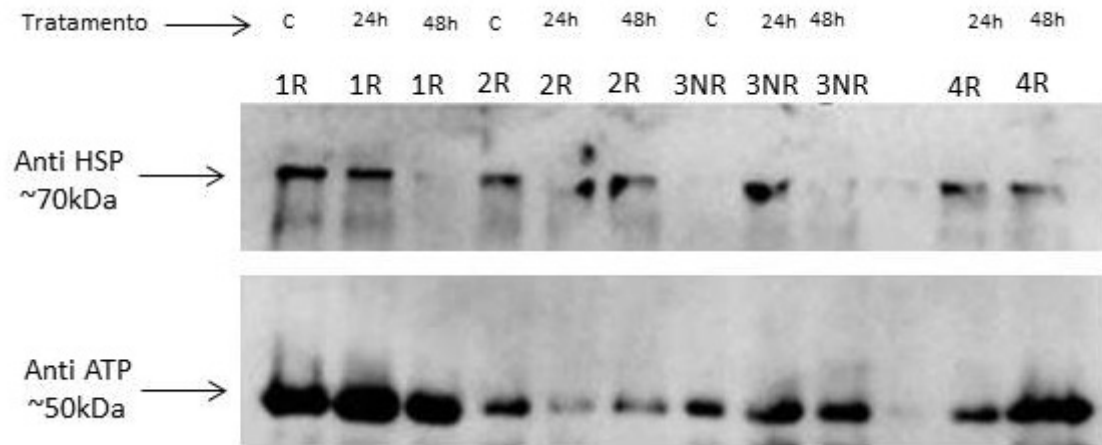


Figura 25: Expressão de HSP70Lb (A) e anti Tat (B) em isolados de pacientes considerados resistentes e não resistentes ao tratamento com N-metilglucamina, visualização por ImageQuant LAS 4000. Nos isolados foi utilizado IC50 de NMG, e subdivididos em grupos (controle, 24 horas e 48 horas) para análise. $P > 0,05$.

Na figura 26 houve diferença entre as colunas de isolados tratados e não tratados com NMG. Já no primeiro isolado (1R) que é de paciente com falha terapêutica, observamos que com o tratamento realizado a expressão das proteínas diminuiu quando comparado ao controle, 24 horas e 48 horas de tratamento. Resultado semelhante ao que observamos no isolado do paciente resistente (4R) que também teve queda na quantidade de proteína estudada. Em todos os isolados apresentados, resistentes e não resistentes, podemos notar que a adição do NMG nas análises *in vitro*, atuou na diminuição da proteína pesquisada, quando comparando os tempos 24h e 48h.

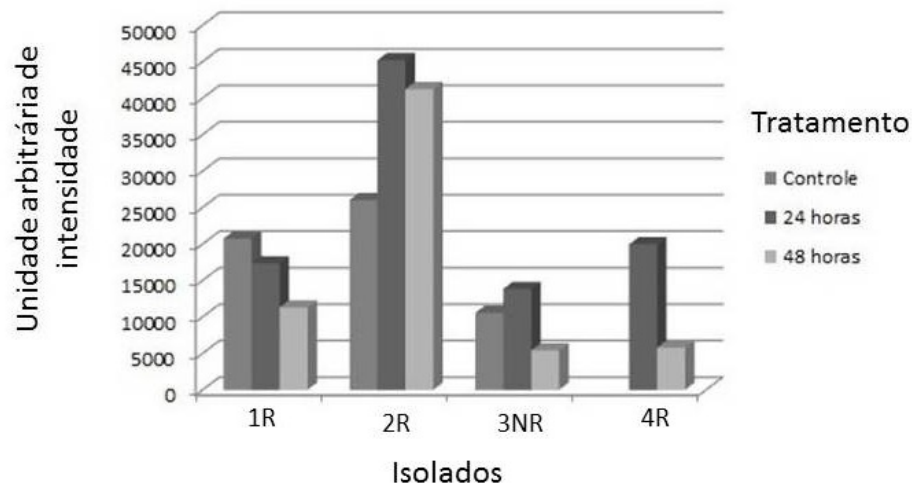


Figura 26: Comparação entre as bandas de HSP70 de isolados de pacientes tratados com IC50 de N-metilglucamina.

Abaixo demonstramos a tabela 3 com levantamento epidemiológico das cepas analisadas em relação às proteínas. Em um total de isolados estudados 66,6% foram de pacientes do sexo masculino, e dos resistentes 28,5% eram do sexo feminino. A média da idade dos pacientes era de 42,5 anos. Quanto à forma clínica da lesão 9 pacientes (75%) apresentaram a forma cutânea e 3 pacientes (25%) a forma mucosa, sendo que das lesões cutâneas, cinco pacientes não apresentaram êxito com o tratamento e com a lesão mucosa foram dois pacientes. Foi observado que 41,6% das lesões foram no braço, 33,3% na cabeça, 16,6 nas pernas e 8,33% na cabeça e tronco.

Podemos perceber que o isolado nove, de paciente resistente, do sexo feminino e de 28 anos, teve sua normalização mais alta nas duas figuras em que foi analisada e possui um dos valores mais elevados do teste intradérmico de Reação de Montenegro (IDRM). Já o isolado oito de paciente de 65 anos do sexo feminino, com forma clínica cutânea, não resistente e com um dos IDRM negativo, apresentou na figura 25, comparando-se com os demais a menor normalização.

Para o isolado dois, de paciente resistente, com forma clínica mucosa e de acordo com a tabela 3, com lesões mais agressivas com perda do palato duro e desabamento nasal, não apresentou a normalização elevada em relação aos outros isolados.

Tabela 3: Correlação dos isolados de pacientes atendidos no HUB, tratados com N - metilglucamina, identificados como *L. braziliensis*, resistentes e não resistentes ao tratamento com N-metilglucamina, com a idade, sexo, forma clínica, local da lesão, teste intradérmico de Reação de Montenegro e normalização das bandas de HSP70 das figuras 21, 24 e 25.

Paciente	Idade	Sexo	Forma Clínica	Local da Lesão	IDRM/mm	Resistente (R)/ Não resistente (N)	Figura 21 WB anti HSP70Lb	Figura 24 WB anti HSP70Lb	Figura 25 WB anti HSP70Lb controle	Figura 25 WB anti HSP70Lb 24h	Figura 25 WB anti HSP70Lb 48h
1	46	Masculino	Mucosa	cabeça/nasal	9x6	N		51473			
2	68	Masculino	Mucosa	cabeça/perda do palato duro e desabamento nasal	10X8	R	12042		20757	17309	11282
3	41	Masculino	Cutânea	Braço	15X12	N	20347	4848			
4	35	Masculino	Cutânea	Braço	NI	N	18842				
5	30	Masculino	Cutânea - mucosa disseminada	cabeça, tronco, MMSS, MMII	0X0	R					
6	39	Masculino	Cutânea	Cabeça	25X26	R				19941	5781
7	47	Masculino	Cutânea	Braço	NI	R		58394			
8	65	Feminino	Cutânea	Perna	0X0	N			10559	13825	5392
9	28	Feminino	Cutânea	Braço	20X17	R	22602		26015	45198	41211
10	41	Masculino	Cutânea	Braço	18X17	R	20208				
11	36	Feminino	Cutânea	Perna	NI	R					
12	35	Feminino	Cutânea	Cabeça	17x10	N					

0X0 – negativo; NI – sem informação; R – resistente; N – não resistente; WB – *Western Blot*; MMSS – membros superiores; MMII – membros inferiores

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas doenças endêmicas em diversas regiões do mundo. A doença vem preocupando autoridades sanitárias por sua expansão, principalmente em áreas periurbanas, já que o crescimento descontrolado das cidades, aumenta a chance de contato dos seres humanos com os reservatórios naturais do protozoário *Leishmania* (Sampaio & Paula, 1999; Carvalho et al, 2010; Rufino, 2011). Nas américas e no Brasil, existem espécies como a *L. braziliensis* e a *L. (L) amazonensis* que exibem intenso tropismo pelo tegumento, podendo resultar em lesões cutâneas e mucosas desfigurantes. Logo, o diagnóstico correto e pronto tratamento são tarefas essenciais na redução da transmissão e das sequelas resultantes da doença.

A resistência ao tratamento é uma preocupação crescente já que as drogas existentes são tóxicas e de difícil administração (Rath et al., 2003). Esta preocupação com a inefetividade ao tratamento, principalmente aos antimoniais pentavalentes, é proveniente de casos refratários, cada vez mais comuns na literatura (Sampaio & Marsden, 1997; Hadighi et al, 2006; Arevalo et al 2007; Llanos-Cuentas et al, 2008; Torres 2009; Oliveira et al 2011; Savoia 2015). Dentre os isolados de pacientes cultivados todos foram tratados laboratorialmente com N-metiglucomina, sete apresentaram falha terapêutica.

Para elucidar o mecanismo destas resistências, estudos, nas mais várias fases da pesquisa, pré-clínica ou clínica, são necessários para identificar mecanismos genéticos, imunológicos ou ambientais que levem ao efeito insatisfatório do tratamento (Croft et al, 2006; Ashutosh et al, 2007; Romão et al, 2008; Bhattacharjee & Mukhopadhyay, 2009; Mohapatra, 2014). O mecanismo de resistência é heterogêneo nas diversas formas da doença e em diferentes regiões do mundo. O mecanismo é também complexo e depende de fatores como resposta imunológica do hospedeiro, expressão gênica do parasita e exposição a fatores ambientais (Romão et al, 2008; Bhattacharjee & Mukhopadhyay, 2009).

Pesquisadores acreditam na resposta terapêutica em testes de susceptibilidade apenas nas formas amastigotas (Ibrahim et al. 1994; Lira et al. 1999), também quando se trata da forma promastigota (Moreira et al, 1998; Robledo et al, 1999; Azeredo-Coutinho et al, 2007;). Neste estudo, a ação das drogas para avaliar a resistência de

Leishmania foi realizada em teste *in vitro* em formas promastigotas. Apesar dos relatos na literatura de que formas promastigotas de *Leishmania* são menos sensíveis ao N - metilglucamina foi possível observar a diminuição de parasitas ~~de *Leishmania*~~ quando adicionado este fármaco no período de 24 e 48h (Fumarola et al, 2004; Azeredo-Coutinho et al, 2007; Zauli- Nascimento 2009).

A resposta imune protetora contra a leishmânia é mediada principalmente por células (Van Griendven et al, 2014). O parasita induz mecanismos imunológicos que favorecem sua multiplicação no hospedeiro inibindo a produção de linfócitos Th1, produtores de citocinas como interferon gama e interleucina 2, que fazem as células macrofágicas infectadas produzir óxido nítrico (NO) e eliminar o parasita. Neste caso o hospedeiro produziria resistência à infecção (Kemp, 1997; Barral-Netto, et al, 1998). A toxicidade de NO contra esses parasitas já foi confirmada em diferentes modelos (Bogdan, 2001; Brunet, 2001; Gantt et al., 2001). Alguns estudos relatam que o N - metilglucamina não age senão na medida em que os macrófagos estejam estimulados e o doente comece a se defender contra o parasita (Minodier et al, 2003; Russo et al, 2003).

Na literatura encontramos vários relatos do desenvolvimento de LTA em pacientes com HIV, sendo essa co-infecção cada vez mais reportada no Brasil. Os casos publicados demonstraram uma diversidade clínica, quadros graves, disseminação e resistência aos tratamentos habituais (Coura et al, 1987; Rabelo et al, 2003; Manfredi et al, 2008). Este fator demonstra-se como colaborador da expansão das leishmanioses pelo crescimento do número de casos de reativações assintomáticas da doença entre portadores de HIV em decorrência da baixa resposta imune destes indivíduos (Roberts et al, 2000). Em pacientes com LTA e infectados pelo HIV, observa-se progressivo desequilíbrio do sistema imunológico. Sabendo-se que resposta a infecção varia de acordo com a espécie do parasita, a predisposição genética e o estado de imunossupressão do hospedeiro, observa-se que pacientes infectados com HIV possuem desvio da resposta celular tipo Th1 para a humoral tipo Th2, situação que é favorável para a disseminação e replicação dos parasitas intracelulares. Ambas as infecções, leishmaniose e pelo HIV, favorecem a replicação uma da outra, medida em que as manifestações clínicas da leishmaniose dependem da interação entre o número de parasitas, resposta imune do hospedeiro com deficiência ou mesmo falta na resposta celular (Scaglia et al, 1996; Vinhal et al, 2007; Van Griendven et al, 2014). Dentre os

isolados um foi de paciente HIV positivo o qual apresentou lesões cutânea mucosa disseminada e falha terapêutica ao tratamento preconizado, além de não responder a Reação de Montenegro (0x0).

Outras condições de leishmaniose em imunocomprometidos incluem pacientes que realizaram transplantes de órgão, pacientes com imunossupressão e com terapias imunomoduladoras (Vinhai et al, 2007; Van Griensven et al, 2014). Nessas condições os parasitas podem se tornar mais numerosos e o quadro pode se agravar (Zijlstra, 2014).

Sob outro ponto de vista, a falha terapêutica pode, também, ter correlação com a resistência do parasita ao antimônio. McConville e Ralph (2013) indicam que os baixos índices de desenvolvimento socioeconômico, a pobreza e a deficiência no controle endêmico da *Leishmania* no Nordeste da Índia constituem uma das razões para a disseminação da leishmaniose visceral com alto índice de resistência ao fármaco à base de antimônio. Neste caso, além dos baixos indicadores de cura, observou-se o desenvolvimento da resistência do parasita ao fármaco, conduzindo à renovação do ciclo de infecção de novos vetores por uma nova cepa de protozoários resistentes.

Nessa região da Índia, de clima subtropical, e, portanto, favorável à sobrevivência do vetor, a população consumiu, continuamente e por longo período, água contaminada por arsênio em níveis não-letais. Arsênio e antimônio são ambos metais com propriedades químicas semelhantes; ambas apresentam naturalmente as formas trivalente e pentavalente. Perry e colaboradores (2013) comprovaram em testes com camundongos a hipótese de que a exposição da *L. donovani* ao arsênio em níveis moderados, de forma contínua e persistente, leva ao desenvolvimento de resistência cruzada ao antimônio. Os animais, submetidos à forma trivalente do arsênio, desenvolveram alta resistência ao Pentostam (Perry et al, 2015).

Agrava o quadro epidemiológico o maior potencial patogênico do parasita resistente ao antimônio: há indícios de que parasitas com resistência cruzada entre antimônio e arsênio podem infectar humanos – nesta região a infecção é primordialmente antroponótica – de regiões não afetadas pela contaminação da água por arsênio, o que multiplicaria o fenômeno da resistência ao antimônio (McConville & Ralph, 2013). Ao adquirir resistência ao antimônio, o parasita renova o ciclo com a infecção de vetores por uma população de *Leishmania* resistente.

O isolado do paciente com maior gravidade da lesão - na cabeça/perda do palato duro e desabamento nasal -, nesta pesquisa, apresentou frequentes recidivas. Foi submetido a vários esquemas terapêuticos durante o período de 23 anos. O mesmo não aparentava ter comprometimento imunológico, já que tinha IDRMs positivas e testes sorológicos para doenças imunossupressoras negativos. Apresentou alteração na determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com baixa produção (Urdapilleta, 2011). A produção de H₂O₂ está envolvida no mecanismo de destruição da leishmânia pelo monócito/macrófago depois da fagocitose. Esta alteração sugere que o paciente não produziu adequadamente substâncias leishmanicidas (Saldanha 2009).

As manifestações clínicas da leishmaniose e seu grau de severidade variam de acordo com a espécie e fatores próprios da leishmânia infectante, como a capacidade de gerar resistência aos antimoniais e a resposta imune do hospedeiro (Rojas et al, 2006; Malla e Mahajan, 2006).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) tem uma evolução progressiva, evolui mal por não responder adequadamente à terapêutica sendo uma das formas que representa um sério desafio aos tratamentos. Algumas são as situações que favorecem essa característica distinta dessa infecção, principalmente atribuída ao parasita e aspectos imunogenéticos do hospedeiro.

Hospedeiros com LCD são caracterizados por ausência de resposta celular, apresentando quando infectados resposta humoral contra antígenos da leishmânia, diferentemente da forma mucosa e cutânea, que induzem a imunidade celular. Por este motivo, pacientes com LCD indicam predominância de Th2 em suas respostas, e em consequência, no teste de hipersensibilidade cutânea tardia para leishmânia (intradermorreação de Montenegro-IDRM) apresenta-se negativo (Petersen et al, 1982; Lainson, 1983; Barral et al, 1995).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas encontradas altamente conservadas em células procarióticas e eucarióticas. O papel fisiológico do HSP70 tem sido bem descrito em situações que as células são expostas às condições estressantes. As Hsp 70 são conhecidas por estimular uma forte resposta imune em mamíferos e em *L.(L.) infantum* (Blachere et al. 1997; Rico et al. 1998).

Alguns estudos demonstraram que em isolados resistentes e não resistentes ao N - metilglucamina a expressão de HSP70 ficou estável após centenas de passagens *in vitro* do agente (Brochu et al, 2004). Assim como a HSP70 a ATPase também participa

no dobramento das proteínas que são sintetizadas pela maquinaria de pré replicação, tradução mitocondrial, que protegem as proteínas mitocondriais de eventos estressores (Neuwald et al 1999; Campos, 2007; Calderano et al 2011).

As HSP 70, entre outras funções, estão envolvidas na sobrevivência intracelular, diferenciação e virulência do parasita (Shonhai et al, 2011). Já foram relatados por aumentar a tolerância ao SbIII em mutantes resistentes de *Leishmania* quando superexpressos (Brochu, Haimeur, Ouellette 2004), sugerindo o seu potencial como primeira linha de defesa contra a droga (Palacios et al. 2001; Torres 2009). Kumar e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com antimonio pentavalente causou uma expressão aumentada de HSP70 em *L. donovani* e *L. chagasi*.

No presente estudo, verificou-se a expressão das proteínas HSP70 e ATPase em isolados clínicos considerados resistentes ao NMG e não resistentes ao tratamento com NMG portanto, observou-se que não houve diferença representativa em pacientes com falha terapêutica e pacientes que não apresentaram falha terapêutica. Resultado semelhante foi encontrado e descrito por Maharjan e Madhubala (2015). No entanto, ambos os estudos consideram como desfecho principal, a falha terapêutica. Possivelmente, seria necessário uma amostragem maior de pacientes para detectar alterações mais sutis resultante da expressão das proteínas citadas.

Como padronização bem estabelecidos do resultado do tratamento ou tempo de duração para cicatrização da úlcera, diâmetro ou tamanho da intradermoreação de Montenegro e a resposta imune do hospedeiro, poderiam ser usados como desfechos intermediários com o objetivo de melhor avaliar a influência destas proteínas no tratamento da LTA. Pelo reduzido tamanho da amostra de pacientes não foi possível neste trabalho fazer tal avaliação.

7. CONCLUSÕES

A observação da expressão dos genes estudados em isolados de leishmânia de pacientes considerados resistentes e não resistentes não demonstrou diferença, em sua maioria a diferença ocorreu por características do hospedeiro. Sugere-se que estudos futuros sejam realizados com uma amostra maior de pacientes podendo, possivelmente, revelar o real impacto destas características genéticas nas mais diversas formas terapêuticas existentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adaui V, Castillo D, Zimic M, Gutiérrez A, Decuypere S, Vanaerschot M, Dedoncker S, Llanoscuentas A, Arévalo J, Dujardin J C. Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different *in vitro* susceptibility to pentavalent antimony. *Parasitology* 138:183, 2011.

Almeida O L S; Santos J B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *An. Bras. Dermatol.* 86: (3) Rio de Janeiro May/June, 2011.

Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by bcl-xl expression. *Apoptosis.* 11:161–171, 2006.

Amato V S. Utilização do isotionato de pentamidina para tratamento da leishmaniose mucosa. *Soc. Bras. Med. Trop.* 30: (6), 529-30, 1997.

Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 31:109–118.10.1007/s10096-011-1276-0, 2012.

Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin J C, LlanosCuentas A. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 195, 1846- 1851, 2007.

Arruda C C P. Indução de resistência à infecção por *Leishmania amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) no modelo murino por formas atenuadas do parasita. *Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.*

Ashutosh; Sundar S; Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmani* *J. Med. Microbiol.*, February 56: 143-153, 2007.

Azeredo-Coutinho R B, Mendonça S C, Callahan H, Portal A C, Max G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other Leishmania species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol.* 93(3): 688-93, 2007.

Barral A, Costa J M, Bittencourt A L, Barral-Netto M, Carvalho E M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int. J. Dermatol.* 34: 474- 479, 1995.

Barral-Netto M, Brodskyn C, Carvalho E M Barral A. Human_ leishmaniasis/cytokines.bahia.br. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 149-155, 1998

Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J Bruchhaus I. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, 3: 1811-1829, 2003.

Bhattacharjee H and Mukhopadhyay R. Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1. Chapter 41. *Drug resistance in Leishmania.* 2009.

Biyani N, Singh A K, Mandal S, Chawla B, Madhubala R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 179: 91-99, 2011.

Blachere N E, Li Z, Chandawarkar R Y, Suto R, Jaikaria N S, Basu S, et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.*;186:1315, 1997.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2: 907-916, 2001.

Brasil Ministério da Saúde do Brasil. *Manual de Controle da leishmaniose Tegumentar Americana.* Brasília; 2000.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de Saúde. In: *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 2: 501-24, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília 2007.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2ª edição atualizada. Brasília 2010.

Brochu C, Haimeur A, Ouellette M. "The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*". In: *Cell Stress & Chaperones*. 9 (3): 294–303. 2004.

Brunet L R. Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol*. 1: 1457-1467, 2001.

Calderano S G, de Melo Godoy P D, da Cunha J P, Elias M C. Trypanosome prereplication machinery: a potential new target for an old problem. *Enzyme Res*. 518258. 2011.

Campos R M. Caracterização molecular e antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral. *Dissertação Mestrado Fundação Oswaldo Cruz*. Recife, 2007.

Carvalho M S L, Brecht A, Meneghin E R S, Oliveira C. Flebotomíneos (Diptera: *Psychodidae*) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 19 (3) Brasília set. 2010.

Carvalho, R.F.; Ribeiro, I. F.; S Filho, J.; Martins, O. P.; Cintra, D. O.; Tedesco, A. C.; Lacava, Z. G.; Bao, S. N.; Sampaio, R. N. R. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Experimental Parasitology*, 135: 217-222, 2013.

Chakravarty J.; Sundar, S. Drug resistance in leishmaniasis.(Symposium - Lieshmaniasis), *Journal of Global Infectious Diseases*, May-August, 2(2): 167, 2010.

Coura JR, Castro GB, Grimaldi Jr G. Disseminated American Cutaneous Leishmaniasis in a Patient with AIDS. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 581-582, 1987.

Croft S L, Sundan S, Fairlamb A H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* Jan; 19(1): 111–126. 2006.

Cruz A, Rainey P M, Herwaldt B L, Stagni G, Palacios R, Trujillo R, Saravia N G. "Pharmacokinetics os antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate". In: *JID* 195: 602 - 608, 2007.

Cuervo P, De Jesus J B, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont G B, Cupolillo E. "Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes". In: *Journal of Proteomics* 73: 79-92. 2009.

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

Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark T G, Coombs G H, Cotton J A, Hilley J D, de Doncker S, Maes I, Mottram J C, Quail M A, Rijal S, Sanders M, Schönian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin J C, Berriman M. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res* 21: 2143–2156. 2011.

Firooz A, Khamesipour A, Ghoorchi MH, Nassiri-Kashani M, Eskandari SE, Khatami AR, Hooshmand B, Gorouhi F, Rashighi-Firoozabadi M, Dowlati Y.

Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: A randomized assessor-blind controlled trial. *Arch Dermatol.* 142:1575–1579. 2006.

Frézard F, Demicheli C, Kato KC, Reis PG, Lizarazo-Jaimes EH . Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. *Rev. Inorg. Chem.* 33:1–12. 2013.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonísio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania spp.* *Res. Microbiol.* 155: 224-230. 2004.

Furusava G P & Borges M F. Colaboração para o conhecimento do histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na Vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. *Rev. Patol. Trop.* 43 (1): 7-25. jan.-mar, 2014

Gantt K R, Goldman T L, McCormick M L, Miller M A, Jeronimo S M, Nascimento E T, Britigan B E, Wilson M E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, 167: 893-901, 2001.

Goto H, Lindoso J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 8:419–433, 2010.

Gregory D J & Oliveira M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology.*, 130: S27-S35, 2005.

Hadighi R., Mohebbali M., Boucher P., Hajjaran H., Khamesipour A., Ouellette M. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLOS Medicine*, 3: 659-667. 2006.

Ibrahim ME, Hag-Ali M, el-Hassan AM, Theander TG, Kharazmi A. *Leishmania* resistant to sodium stibogluconate: Drug-associated macrophage-dependent killing. *Parasitol. Res.* 80: 569–574, 1994.

Jacobina, R R; Gelman, E A. "Juliano Moreira e a *Gazeta Medica da Bahia*". In: *Hist. Cienc. Saude-Manguinhos*. 15 (4). Rio de Janeiro Oct./Dec. 2008.

Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Khadem-Erfan M B, Saffari M, Raoofian R, Hajjaran H, Hadighi R, Khamesipour A, Rezaie S, Abedkhozasteh H, Heidari M. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-aflp approach. *Exp. Parasitol.* Oct 6; 135(2):344-9, 2013.

Kemp, M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl.* 68: 1-33, 1997.

Kumar A, Sisodia B, Misra P, Sundar S, Shasany A K, Dube A. "Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*". In: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 70(4): 609–617, 2010.

Lainson, R. The american leishmaniasis: some observations on their and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:569, 1983.

Layegh P, Rahsepar S, Rahsepar AA. Systemic meglumine antimoniate in acute cutaneous leishmaniasis: children versus adults. *Am. J. Trop. Med Hyg.*; 84 (4): 539–542, 2011.

Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof Y D, Rosen B P, Haimour A, Papadopoulou B, Ouellette M. "The *Leishmania* ATP-binding Cassette Protein PGPA Is an Intracellular Metal-Thiol Transporter ATPase". In: *The Journal of Biological Chemistry*. 276(28) 26301-26307, 2001.

Leprohon P, Légaré D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette m. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* 375: 1387–1399. 2009a.

Leprohon P, Légaré D, Ouellette M. Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* 536: 2646–2649. 2009b.

Leroux, A, Fleming-Canepa, X, Aranda, A, Maugeri, D, Cazzulo, JJ, Sanchez, MA, Nowicki, Cl. Functional characterization and subcellular localization of the three malato desidrogenase isozymes in *Leishmania* spp. *Molecular & Biochemical Parasitology* 149. 74–85. 2006.

Lima E. B, Porto C, Motta J O C; Sampaio R N R. Treatment of American cutaneous leishmaniasis. *An. Bras. Dermatol.* 82 (2): 111-24, 2007.

Lindoso J A L, Lindoso A A. "Neglected Tropical Diseases in Brazil". In: *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 51 (5). São Paulo Sept./Oct. 2009.

Lira R, Sunder S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sack D. Evidence that the high incidence of treatment failure in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* 180: 564–567. 1999.

Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araújo-Castillo R, Miranda-Verastegu C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, Lazo M, Doncker S, Boelaert M, Robays J, Dujardin J C, Arevalo J, Chappuis F. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin. Infect. Dis.* 46: 223-231. 2008.

Maharjan M & Madhubala R. Heat shock protein 70 (HSP70) expression in antimony susceptible/resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Nepal Journal of Biotechnology.* Dec . 3 (1 z): 22-28. 2015.

MCConville M J, Ralph S A. "Chronic Arsenic exposure and microbial drug resistance". *PNAS*, 110 (49): 19666-19667, 2013.

Malla N, Mahajan R C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian J. Med. Res.* 123, 267-274. 2006.

Manfredi R, Marinacci G, Calza L, Passarini B. Diffuse cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis during human immunodeficiency virus (HIV) infection, despite negligible immunodeficiency: repeated failure of liposomal amphotericin B administration, followed by successful long-term pentamidine and paromomycin administration. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31: 590-592, 2008.

Mannaert A, Downing T, Imamura H, Dujardin J C Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 28: 370–376. 2012.

Maresca B, Kobayashi G S. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia* 50:1067–74, 1994.

Marsden P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia”Escomel, 1911). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (6): 859-76, 1996.

Martinez S, Marr J. J. Allopurinol in the treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine.* 326 (11): 741-44, 1992.

Medina-Acosta E, Cross G A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59 (2): 327-9, Jun 1993.

Minodier P, Robert S, Retornaz K, Garnier J M. Visceral leishmaniasis: new drugs. *Archives of Pediatrics.* 5: 550-556, 2003.

Mohapatra S. *Tropical Parasitology. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments.* 4: 4-9, 2014.

Mookerjee B J, Mookerjee A S P, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri S K, Saha B, Raha S, Roy S. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase

and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother* 50: 1788–1797. 2006.

Moreira E S, Anacleto C, Petrillo-Peixoto M L. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World Leishmania: Use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitol. Res.* 84(9): 720-6. 1998.

Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Bannerjee B, Chowdhury S, Mukherjee S, Naskar K, Allam U S, Chakravorty D, Sundar S, Dujardin J C, Roy S. Antimony-resistant but not antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. *P Natl Acad Sci USA* 110: E575–E582, 2013.

Name R Q, Borges K T, Nogueira L S C, Sampaio J H D, Tauil P L, Sampaio R N R. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* (Impresso), Rio de Janeiro. 80 (3) 249-254, 2005.

Neuwald A F, Aravind L, Spouge J L, Koonin E V. A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complex. *Genome Research.* 9(1): 27-43. 1999.

Oliveira L F, Schubach A O, Martins M M, Passos S L, Oliveira R V, Marzochi M C, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 118(2): 87-96. 2011.

Ouellette M, Drummel-Smith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug resistance updates.* 7: 257-266, 2004.

Palacios R, Osorio L E, Grajalew L F, Ochoa M T. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64: 187–93. 2001.

Perry M, Wyllie S, Raab A, Feldmann J, Fairlamb A H. "Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis." In: *PNAS*, 110 (49): 19932–19937, 2013.

Perry M, Wyllie S, Raab A, Feldmann J, Fairlamb A H "Arsenic Exposure and Outcomes of Antimonial Treatment in Visceral Leishmaniasis Patients in Bihar, India: A Retrospective Cohort Study" In: *PLoS Neg Trop Dis*. Mar, 9 (3), 2015

Petersen E A, Neva F A, Oster C N, Bogaert Diaz H. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 306: 387-392, 1982.

Polla B S. Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunol. Today* 12:A38–41, 1991.

Porfírio-Passos G. Avaliação soro-epidemiológica e molecular de cães assintomáticos para leishmaniose tegumentar americana em área endêmica. Alegre (ES): Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias; 2013.

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

Rassow J, Dekker P J, Van W S, Meijer M, Soll J. The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.* 286: 105-120, 1999.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC, Andrade Júnior HF, Tempone A G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim. Nova* 26: 550-553. 2003.

Reithinger R, Dujardin J C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7: 581- z596, 2007.

Requena J M, Montalvo A M, Fraga J. Molecular chaperones of *Leishmania*: central players in many stress-related and -unrelated physiological processes. *Biomed Res. Int.* 301-26. 2015.

Rico AI, Del Real G, Soto M, Quijada L, Martinez AC, Alonso C, et al. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. *Infect. Immun.* 66: 347–52, 1998.

Roberts L J, Handman E, Foote S J. Science, medicine and the future – Leishmaniasis. *British Medical Journal*, 321:801-804, 2000.

Robledo S M, Valencia A Z, Saravia N G. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J. Parasitol.* 85(2): 360-6. 1999.

Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona M X, Ouellette M, Saravia N G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J. Infect. Dis.* 193: 1375-1383, 2006.

Romão P R T, Dias R O, Cruz K K, Marques F C S, Monteiro M C. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. periodicos.unesc.net/saude/article/download/2/1. 2008.

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

Rufino A R. A relação entre o desmatamento e a incidência de leishmaniose no município de Mesquita, RJ. *Revista GEOMAE* . 02 (1), 2º Sem, 2011.

Russo R, Nigro L, Panarello G, Montineri A. Clinical survey of Leishmania/HIV co-infection in Catania, Italy: the impact of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Annual Tropical of Medical Parasitology*, 97: 149-155, 2003.

Saldanha, R R. Influência do tratamento com N-metil Glucamina sobre a fagocitose, a produção de radicais de oxigênio e de nitrogênio e a produção de FNT [alfa], IFN-[gama] e IL-10 por fagócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e de camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis* [tese]. Brasília: Universidade de Brasília, Pós-graduação em Patologia Molecular; 2009.

Saldanha R, Kuckelhaus S A S, Sampaio R N R, Junqueira M I M. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106: 596-603, 2012.

Sampaio R N R & Paula C D R. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(5):523-528, set-out, 1999.

Sampaio R N R, Paula C D R, Sampaio J H D, Furtado R S, Leal P P, Rosa T T, Rodrigues M E, Veiga J P R. Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do Antimonial Pentavalente administrado na dose de 40Mg Sb_v/Kg/Dia, de 12 em 12 horas, por 30 dias na forma cutâneo mucosa da leishmaniose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Impresso), Uberaba -MG, 30: (6): 457-463, 1997.

Sampaio, R. N. R.; Marsden, P. D. Mucosal Leishmaniasis Unresponsive to Pentavalent Antimonial Therapy Successfully Treated with Ambisome. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Inglaterra, 91: 77-78, 1997.

Saraiva, E.M., Pimenta, P.F., Brodin, T.N., Rowton, E., Modi, G.B., Sacks, D.L. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology.*, 111 (3): 275-287, 1995.

Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9(6): 588-96, 2015.

Scaglia M, Malfitano A, Douville H, Sacchi P, Gatti S, Gradoni L, Gramiccia M. Dermomodular and visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* with a new isoenzyme pattern: report of a case involving a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 22: 376–377. 1996.

Sheiky Y A, Benson D R, Guderian J A, Whittle J A, Bacelar O, Carvalho E M, Reed S G. "Immune Responses of Leishmaniasis Patients to Heat Shock Proteins of *Leishmania* Species and Humans". In: *Infection and Immunity*. Oct. 4105–4114. 1995.

Shonhai A, Maier A G, Przyborski J M, Blatch G L. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein pept left.* 18: 143-157. 2011.

Soto M, Ramirez L, Pineda M A, Gonzales V M, Entriger P F, Oliveira C I, Nascimento I P, Souza A P A, Corvo L, Alonso C, Bonay P, Brodskin C I, Barral A M P, Barral Neto M, Iborra S. "Searching Genes Encoding *Leishmania* Antigens for Diagnosis and Protection". In: *Scholarly Research Exchange*. Vol. 2009.

Sundar D, Pai K, Kumar R, Pathak-Tripathi K, Gam A A, Ray M, Kenney R T. Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65 (3): 193-196, 2001.

Thakur C P. Drug resistance in kala-azar: an overview. In: Gupta S, Sood OP, eds. Proceedings of round table conference series. No 5. *New Delhi: Ranbaxy Science Foundation.* 27–33. 1999.

Torres, D C. Caracterização molecular de isolados clínicos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* e sua associação com a resposta terapêutica ao antimonio de meglumina no Brasil [*dissertação*]. Rio de Janeiro: *Instituto Oswaldo Cruz*; 2009.

T'kindt R, Scheltema RA, Jankevics A, Bruncker K, Rijal S, Dujardin JC, Breitling R, Watson D G, Coombs G H, Decuypere S. Metabolomics to unveil and understand phenotypic diversity between pathogen populations. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e904. doi: 10.1371/journal.pntd.0000904. 2010.

Tsuji N, Ohta M, Fujisaki K. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from freeliving infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitol. Res.* 83:99–102, 1997.

Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Apr 80 (4):574-9. 2009.

Urdapilleta, A. A. A. Estudo comparativo clínico, efeito de drogas in vitro e identificação de proteínas de leishmanias isoladas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana que não responderam ao tratamento. *Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Ciências Médicas*, 2011.

Vale EC, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An. Bras. Dermatol* 80: 421-428, 2005.

Van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: 286–299. 2014.

Vanaerschot M, Decuypere S, Berg M, Roy S, Dujardin J C. Drug-resistant microorganisms with a higher fitness – can medicines boost pathogens? *Crit. Ver. Microbiology*. 2012.

Vinhal F A, Afonso-Cardoso S R, Silva A G, Pereira C G, Sousa W, Botelho SM, Souza JB, Silva WD, Pena JD, Souza MA. A typical presentation of cutaneous leishmaniasis after renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant* 22: 3674. 2007.

WHO, World Health Organization. *Leishmaniasis. World Health Organization*, Geneva, Switzerland, 2015.

Wyllie, S; Cunningham, M L; Fairlamb, A H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 279: 39925-39932, 2004.

Zauli-Nascimento R C. Determinação da sensibilidade de isolados de *Leishmania* a antimoniato de meglumina, anfotericina B e tamoxifeno [dissertação]. São Paulo: *Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas*, 2009.

Zijlstra E E. Neglected Tropical Diseases PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. *PLOS*. November 8 (11), 2014.