

ADA AMÁLIA AYALA URDAPILLETA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO CLÍNICO, EFEITO DE DROGAS *IN VITRO* E
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LEISHMANIA ISOLADAS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA QUE NÃO
RESPONDERAM AO TRATAMENTO**

Brasília, DF

2011

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

ADA AMÁLIA AYALA URDAPILLETA

ESTUDO DO COMPORTAMENTO CLÍNICO, EFEITO DE DROGAS *IN VITRO* E
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LEISHMANIA ISOLADAS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA QUE NÃO
RESPONDERAM AO TRATAMENTO

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: Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio
Co-orientador: Alan Carvalho Andrade

Brasília, DF
2011

ADA AMÁLIA AYALA URDAPILLETA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO CLÍNICO, EFEITO DE DROGAS *IN VITRO* E
IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LEISHMANIA ISOLADAS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA QUE NÃO
RESPONDERAM AO TRATAMENTO.**

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.

Aprovado em 09 de dezembro de 2011

Banca Examinadora

Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio - (presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Izelda Maria Carvalho
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jaime Martins de Santana
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Gilcilene Maria dos Santos – (suplente)
Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde

“Vá em busca do seu sonho. Se tropeçar, não pare nem perca de vista sua meta. Continue subindo. Só do alto podemos apreciar toda a paisagem”.

Frases das Rosas.

Dedico este trabalho ao amor da minha vida, Rodrigo e aos meus pais, César e Nidia. Eles são meu alicerce e minha fonte de inspiração na busca de novos desafios, conhecimento e crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a DEUS, presente em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, pela orientação, pela dedicação e confiança depositada em mim durante o desenvolvimento deste trabalho, e por me fortalecer nos momentos de dificuldade. Meu agradecimento e respeito, sempre;

Ao meu co-orientador Prof Dr Alan Carvalho de Andrade, muito obrigada por tudo, pelas sugestões, pelas conversas sobre o trabalho ou não, pelas várias risadas. Minha admiração, sempre;

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB, Prof Dr Leopoldo Luiz dos Santos Neto, por todo o incentivo e amizade;

À Prof^a Dr^a Selma A. Souza Kuckelhaus, pela amizade, competência e disponibilidade constante em ajudar, ensinar e sugerir idéias no desenvolvimento deste trabalho, também pelas risadas. Meu muito obrigada e admiração;

Ao Prof Dr Jaime Martins de Santana pela gentileza e auxílio em todos os momentos que solicitei. Obrigada pelas conversas e pela disponibilidade;

Aos colegas e amigos, Killarney Ataíde Soares, Jacksandra Farias de França Campos e Gilcilene Maria dos Santos El Chaer pelos bons momentos, especialmente os de descontração;

Aos técnicos e amigos Tércio Rodrigues e Viviane Medeiros, pela atenção e ajuda na realização deste estudo;

Aos alunos, colaboradores e estagiários do Laboratório de Dermatômica da Unb, Fabiana, Dalila, Andrea, Ricardo, Mariana, Charlene e Juliana, pela ajuda sempre que necessário, pelas conversas e pela amizade;

Aos amigos do LGM e Agroenergia da Embrapa, Felipe, Luciana, Ingrid, Maria, Éder, Natália, Bárbara, André, Rebecca, Gabriel e Vladimir, meu muito obrigada pela ajuda, pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração. Também agradeço imensamente ao Dr. Pierre Marraccinni pelos ensinamentos e momentos de descontração;

Ao Jorge Taquita, por toda ajuda, ensinamento e profissionalismo;

A Prof^a Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira e aos alunos e técnicos do laboratório de Imunologia da UnB, Érica, Martina, Carlos, Cezar, Shirley e Luciana, pela ajuda com reagentes, equipamentos e ideias no desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Secretário e colaboradoras da Pós-Graduação em Ciências Médica, Gledson Alessandro Ribeiro da Silva, Daniele Gomes de Miranda e Jaqueline Almeida, que sempre que precisei de alguma informação ou documentação, estavam dispostos em me ajudar;

Aos meus familiares: meus pais, meus sogros, meus irmãos, meus sobrinhos e meus cunhado(a)s. Obrigada pela torcida e apoio no meu desenvolvimento profissional. Por proporcionarem momentos de felicidade e descontração;

Em especial, agradeço ao meu amado Rodrigo, com quem compartilho meus sonhos. Por ter sido o primeiro a me apoiar e acreditar em mim. Obrigada pela amizade, pela paciência, pela compreensão, pela ajuda, por ser completo e me completar...pelo amor que compartilhamos. Amo-te!

E, não posso deixar de agradecer aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

À Universidade de Brasília pela oportunidade;

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer deste trabalho;

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
APENDICÊ	128

LISTA DE ABREVIATURAS

%	- porcentagem
°C	- graus centígrados
μM	- micromolar
ACN	- acetonitrila
ADH	- álcool desidrogenase
C	- Citosina
cm ²	- centímetro quadrado
CO ²	- dióxido de carbono
d	- dia
DF	- Distrito Federal
dl	- decilitro
DMSO	- dimetil sulfóxido
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DTT	- ditioneitol
ESI	- <i>electrospray ionozation</i>
FA	- Face
FM	- Faculdade de Medicina
Fmol	- femtomol
G	- Guanina
g	- grama
h	- hora
H ₂ O ₂	- peróxido de hidrogênio
hsp	- <i>heat shock protein</i>
HuB	- Hospital Universitário de Brasília
IC ₅₀	- concentração inibitória de 50% da população
IDRM	- intradermorreação de Montenegro
IFN	- interferon
IL	- interleucina
Kg	- kilograma
LACK	- <i>activated protein kinase C receptor</i>

LC	- Leishmaniose Cutânea
LCD	- Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	- Leishmaniose Cutânea Mucosa
LC-MS	- Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LGM	- Laboratório de Genética Molecular
LPG	- lipofosfoglicano
LTA	- Leishmaniose Tegumentar Americana
MALDI	- <i>Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization</i>
mg	- miligrama
MHOM	- Mammalia <i>Homo sapiens</i>
mL	- mililitros
mm	- milímetro
mM	- milimolar
MMII	- membros inferiores
Mmol	- milimol
MMSS	- membros superiores
mRNA	- ácido ribonucleico mensageiro
MS	- espectrometria de massa
MTT	- metil-tiazol-tetrazólio
mW	- massa molecular
N	- nódulo
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	- <i>natural killer</i>
nm	- nanômetro
NNN	- McNeal, Novy e Nicolle
OMS	- Organização Mundial de Saúde
P	- presente
PBS	- tampão fosfato salino
PCR	- reação em cadeia polimerase
pH	- potencial de hidrogênio
PI	- placa

PI	- ponto isoelétrico
PLGS score	- <i>Protein Lynk Global Server score</i>
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonil
PP	- pápula
PS	- fosfatidilserina
Rpm	- rotação por minuto
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SbIII	- antimonial trivalente
SbV	- antimonial pentavalente
SDS	- duocedil sulfato de sódio
SFB	- soro fetal bovino
SFM	- sistema fagocítico monocitário
STF	- solução tamponada fosfatada
TFA	- Ácido trifluoroacético
Th	- célula T <i>helper</i>
TNF	- fator de necrose tumoral
TOF	- <i>Time-of-flight</i>
UnB	- Universidade de Brasília
µL	- microlitros
µM	- micromolar

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Manifestações e distribuição das lesões cutâneas apresentadas pelo paciente portador de leishmaniose cutânea difusa sem resposta aos tratamentos convencionais para LTA.....36
- Tabela 2- Esquemas terapêuticos usados durante o período de setembro de 1994 a outubro de 1996 pelo paciente portador de leishmaniose cutânea difusa sem resposta adequada aos tratamentos convencionais.....37
- Tabela 3 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* controle por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *L.(V.) braziliensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....58
- Tabela 4 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* controle por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania spp*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....60
- Tabela 5 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* isoladas do paciente com LCM por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *L.(V.) braziliensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....64
- Tabela 6 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* isoladas do paciente com LCM por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania spp*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....65
- Tabela 7 - Proteínas identificadas em *L.(L.) amazonensis* controle por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *L.(L.) amazonensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....66
- Tabela 8 - Proteínas identificadas em *L.(L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania amazonensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....68
- Tabela 9 - Proteínas identificadas de *L. (L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania (L.) amazonensis*, a partir de dados coletados por

espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....72

Tabela 10 - Proteínas identificadas em *L.(L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania spp*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.....74

Tabela 11 - Proteínas identificadas de *L. (V.) braziliensis* controle selecionadas para análise quantitativa.....79

Tabela 12 - Proteínas *L. (L.) amazonensis* controle selecionadas para análise quantitativa.....80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	16
Figura 2 - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp. Promastigota (A) e Amastigota (B).....	17
Figura 3 - Fórmula estrutural da pentamidina.....	20
Figura 4 - Fórmula estrutural da anfotericina B desoxicolato.....	21
Figura 5 - Fórmula estrutural da miltefosina.....	21
Figura 6 - Câmara de Neubauer de contagem adaptada para microscópio de campo claro ou de contraste de fases. A área marcada com L corresponde à parte da câmara para contagem de leucócitos.....	28
Figura 7 - Microplaca de Elisa de 96 poços.....	30
Figura 8 - Paciente 2 do sexo masculino com leishmaniose mucosa grave do septo nasal com desfiguração facial.....	38
Figura 9 - Paciente 2 com LCM: ajuda de prótese para evitar desconforto respiratório e permitir a alimentação oral.....	39
Figura 10 - Paciente com Leishmaniose mucocutânea: (a) infiltração do palato duro e mole; redução do espaço aéreo – 1 ^o ciclo com miltefosina. (b) Melhora progressiva da infiltração em palato mole – 2 ^o ciclo com miltefosina. (C) Resposta clínica 3 meses após tratamento – mucosa sem infiltração, orofaringe livre de lesão.....	42
Figura 11 - Distribuição das médias do número de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> controle e de <i>L. (L.) amazonensis</i> isoladas do paciente 1 segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). Diferença estatística no crescimento do isolado do paciente no 4 ^o dia ($p < 0,0001$) e para o controle no 6 ^o dia ($p < 0,0001$).....	43
Figura 12 - Distribuição das médias do número de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> controle e <i>L. braziliensis</i> isoladas do paciente 2, segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). Diferença estatística no crescimento da cepa controle no 4 ^o , 5 ^o e 6 ^o dia ($p < 0,05$).....	44
Figura 13 - (A) Índice Fagocitário; (B) Média de formas amastigotas ingeridas por macrófagos peritoneais de camundongos; (C) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose.....	45

Figura 14 - Efeito de diferentes concentrações de antimoniato de meglumina sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste de ANOVA, $p=0,09$47

Figura 15 - Efeito de diferentes concentrações da anfotericina B lipossomal sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste de ANOVA, $p=0,55$48

Figura 16 - Efeito de diferentes concentrações de pentoxifilina sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p=0,3$49

Figura 17 - Efeito de diferentes concentrações de itraconazol sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p=0,55$50

Figura 18 - Comparação do efeito de diferentes concentrações do alopurinol sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p<0,05$51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nível de evidência dos estudos da terapêutica da LTA no período de 1972 a 2011.....	5
Quadro 2 - Características genômicas de três espécies de <i>Leishmania</i>	10
Quadro 3 - Origem e identificação de <i>Leishmania spp</i> disponível no laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.....	26
Quadro 4 - Tratamento realizado pelo paciente 2 durante período de 23 anos no Hospital Universitário de Brasília, Brasil.....	39
Quadro 5 - Classificação das proteínas identificadas em categorias por processos biológicos.....	95

RESUMO

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana constitui um importante problema de saúde pública. É uma doença de difícil controle com aumento de casos que não respondem ao tratamento. Até o momento, não existe terapêutica ideal para as leishmanioses, contudo os antimoniais pentavalentes têm representado a droga de escolha com cura de 60 a 90%, nos últimos anos. A não resposta ao tratamento é complexa com vários fatores envolvidos tais como, a falha terapêutica vinculada à resposta do hospedeiro e a resistência do parasito as drogas. O objetivo deste estudo foi analisar isolados de *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* obtidos de lesão cutânea de portador de Leishmaniose Cutânea Difusa e Leishmaniose Cutânea Mucosa respectivamente com sucessivas falhas terapêuticas, comparados com *Leishmanias* controles. Os isolados dos pacientes foram estudados em relação a manifestação clínica, a ação de drogas *in vitro* e a identificação de proteínas. Os testes *in vitro* foram realizados com formas promastigotas e amastigotas axênicas testadas com antimônio pentavalente, miltefosina, anfotericina B lipossomal, pentoxifilina, itraconazol e alopurinol. As drogas foram distribuídas em placas Elisa de 96 poços em concentrações de 0 até 3000 µg/mL para formas promastigotas e de 0 a 50 µg/mL para formas amastigotas axênicas. A suspensão utilizada foi de 10^6 para formas promastigotas incubadas por 48 h e de 10^7 amastigotas/mL incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO² para as formas amastigotas axênicas. Em ambas as formas foi empregado o método colorimétrico, com o *Methyl Thiazolyl Blue* e a leitura dos testes foi realizada em leitor de placas Elisa (Molecular Devices-Spectra Max, 385 plus - USA) no comprimento de onda de 570nm. As drogas alopurinol e miltefosina apresentaram maior eficácia ($p < 0,05$) frente às formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* comparadas com o controle. E para as formas amastigotas axênicas da mesma espécie, as drogas anfotericina B lipossomal e miltefosina mostraram redução significativa ($p < 0,05$) do número de parasitos em relação ao controle. Na identificação de proteínas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massa, foram identificadas em maior quantidade as proteínas *malate dehydrogenase* no isolado de *L.(L.) amazonensis* e as proteínas

ATPase alpha subunit Leishmania braziliensis e putative heat shock protein hsp70 Leishmania braziliensis no isolado de L.(V.) braziliensis, indicando possível relação destas proteínas no comportamento da doença. Acredita-se que seja necessária, além da identificação e elevação dos níveis das proteínas, a constatação da super-expressão das mesmas nas populações sensíveis e resistentes das espécies de *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* estudadas para explicar melhor a falha terapêutica dos isolados dos pacientes.

Palavras-Chaves: *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis*, resistência a drogas, falha terapêutica, proteínas, cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

In Brazil, American cutaneous leishmaniasis is an important public health problem. It is a difficult disease to control with an increase in cases no-response to treatment. At the moment, no exist ideal therapy for leishmaniasis, but the pentavalent antimonials have represented the drug of choice to cure 60-90% in recent years. The non-responsiveness to treatment is complex with many factors involved such as therapeutic failure linked to the host response and parasite resistance to drugs. The objective of this study was analyze isolated from *L.(L.) amazonensis* and *L.(V.) braziliensis* obtained from patients with diffuse cutaneous leishmaniasis and cutaneous mucosa leishmaniasis respectively with successive therapeutic failures, compared with controls *Leishmanias*. The isolates of patients were studied in relation to clinical manifestation, the action of drugs in vitro and identification of proteins. The in vitro tests were performed with promastigotes and axenic amastigotes with pentavalent antimony, miltefosine, liposomal amphotericin B, pentoxifylline, itraconazole and allopurinol. The drugs were distributed in 96-well ELISA plates in concentrations ranging from 0 to 3000 mg/mL for promastigotes and 0-50 mg/mL for axenic amastigotes. The suspension used was 10^6 to forms promastigotes/mL incubated for 48 h and 10^7 forms amastigotes/mL incubated for 24 hours at 37°C and 5% CO₂. In both forms was used the colorimetric method, with Methyl Thiazolyl Blue and reading test was performed in Elisa plate reader (Molecular Devices, Spectra Max 385 plus - USA) at a wavelength of 570nm. The drug allopurinol and miltefosine showed greater efficacy ($p < 0.05$) compared to the promastigotes of *L.(L.) amazonensis* compared with control. And for the axenic amastigotes of the same species, the drug miltefosine and liposomal amphotericin B showed a significant reduction ($p < 0.05$) of the parasites number when compared to the control. The identification of proteins by the technique of high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry identified in higher quantities the proteins *malate dehydrogenase* isolated from *L.(L.) amazonensis* and *ATPase alpha subunit Leishmania braziliensis* and *putative heat shock protein hsp70* in *Leishmania braziliensis* isolated from *L.(V.) braziliensis*, indicating a possible relationship of these proteins in disease behavior. It is

believed that besides the identification and increased levels of proteins, it is necessary the realization of over-expression of the same in sensitive and resistant populations of the species of *L.(L.) amazonensis* and *L.(V.) braziliensis* studied to explain better the treatment failure from patients isolates.

Keywords: *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis*, therapeutic failure, drug resistance Proteins, high performance liquid chromatography.

1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças infecciosas que acometem primordialmente os países em desenvolvimento e consideradas negligenciadas, encontra-se a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que consiste em uma zoonose endêmica não contagiosa que acomete pele e mucosa (Lainson & Shaw 1973; Magalhães et al. 1990; Desjeux 2001; Alzate et al. 2006).

A LTA é um severo problema de saúde pública, tendendo a aumentar devido a fatores de risco ambiental como migração em massa, desmatamento, urbanização da doença, e também, a fatores de risco individuais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e genética (Desjeux 2001).

É uma doença de difícil controle e encontra-se amplamente distribuída nas Américas, Ásia e África. Acarreta problemas físicos e psíquicos, causando sérios prejuízos socioeconômicos ao país por comprometer o indivíduo em sua fase mais produtiva (Lainson & Shaw 1973; Magalhães et al. 1990; Barral et al. 1991; Rodrigues et al. 2002; Desjeux 2004; Rodrigues et al. 2006).

No Brasil, pelo menos sete espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* foram identificadas como agentes da LTA: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Lainson & Shaw 1972; Lainson & Shaw 1987; Silveira et al. 2002; Gontijo & Carvalho 2003).

A LTA pode ter ampla variedade de apresentações clínicas, sendo as mais freqüentemente encontradas no Brasil a forma cutânea localizada (única ou múltipla), a forma cutânea disseminada, a forma cutânea difusa e a forma mucosa (associada ou não a lesões cutâneas).

As lesões iniciais geralmente são assintomáticas, constituídas por pápulas, e podem estar associadas à adenite satélite (Llanos-Cuentas et al. 1984).

Na forma cutânea não há invasão das mucosas do paciente, enquanto que na forma mucosa pode ocorrer acometimento da mucosa nasal, faringe e outras. A

leishmaniose cutânea difusa (LCD) caracteriza-se por lesões em placas infiltradas, nódulos ou tubérculos associados a raras exulcerações envolvendo grandes áreas do tegumento cutâneo.

Um amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo pele e mucosas pode ser visto na LTA, variando desde uma lesão auto-resolutiva a lesões múltiplas ou desfigurantes. De um modo geral, a maioria das infecções por *Leishmania* permanece localizada na pele ou linfonodos adjacentes. Entretanto, os parasitos de algumas espécies podem escapar para mucosas, múltiplos locais na pele ou para fígado, baço e linfonodos distantes. Os pontos de disseminação da doença variam principalmente, mas não exclusivamente, devido a diferentes propriedades do parasito: sensibilidade à temperatura, tropismo tecidual, capacidade de imunoevasão (Murray et al. 2005).

Na leishmaniose cutânea, a infecção pode evoluir, de uma pápula que aumenta de tamanho e finalmente ulcera, após o período de incubação de 1-12 semanas. A lesão típica é indolor e apresenta bordas salientes com fundo necrótico granuloso e úmido.

As diferentes manifestações clínicas dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, da relação do parasito com o seu hospedeiro e da sua resposta imune. A maioria dos casos da forma mucosa no continente americano é causada pela espécie *L.(V.) braziliensis*, e a LCD é causada por *L.(L.) amazonensis* e *L.(L.) mexicana* (Bittencourt et al. 1992).

A LCD é considerada uma forma rara da leishmaniose tegumentar. O parasito responsável pela doença pertence ao subgênero *Leishmania*, e no Brasil tem como agente causal específico a *L.(L.) amazonensis*. Foi descrita pela primeira vez no Pará, Amazônia brasileira, por Silva em 1958, que no início dos anos 70, descreveu aspectos da leishmaniose anérgica hansenoide, especialmente as alterações histopatológicas da doença pela semelhança dos aspectos clínicos da LCD com os da conhecida forma lepromatosa da hanseníase (Silva 1978).

A LCD caracteriza-se por nódulos não ulcerados, repletos de parasitos que se disseminam do local original de infecção para todo o tegumento do doente.

Esta manifestação da doença é típica em pacientes com anergia do sistema imune, sendo comum em casos de co-infecção HIV/*Leishmania* (Reithinger et al. 2007).

A *L.(L.) amazonensis* é considerada a principal espécie com competência imunopatogênica para determinar a LCD, ou seja, com capacidade de desviar a resposta imune celular do indivíduo infectado para o polo de hipossensibilidade celular do espectro clínico e imunológico da leishmaniose tegumentar, caracterizado por forte expressão da resposta imune celular do tipo CD4+ Th2. (Lainson & Shaw 1998; Bailey & Lockwood 2007).

A leishmaniose mucosa, manifestação mais severa da LTA, parece não curar espontaneamente e é de difícil tratamento. Pode ocasionar destruição de cartilagens e tecidos moles, com possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo. Nos casos mais graves, o paciente pode morrer por complicações respiratórias, dificuldades de alimentação ou infecções secundárias que evoluem para septicemia (Hepbur 2000).

A disseminação de espécies como *L.(V.) braziliensis*, para as mucosas ocorre em até 10% das infecções, após 1-5 anos da cura das lesões cutâneas. Embora cerca de 90% dos pacientes com a forma mucosa apresentem uma cicatriz de lesão cutânea anterior, há alguns casos que coincidem com lesões ativas (Murray et al. 2005).

Embora o homem seja um hospedeiro acidental, infecções com *Leishmania* spp. são bastante comuns. Em áreas endêmicas, até 9% da população sadia pode responder positivamente para testes de hipersensibilidade tardia, indicativos de infecção anterior, por vezes assintomática (Hepburn 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde do Brasil recomendam para o tratamento da LTA os antimoniais pentavalentes como drogas de primeira escolha. Em casos de insucesso, na segunda frente de combate ao parasito, recomendam a anfotericina B desoxicolato, a pentamidina ou a anfotericina B na forma lipossomal (Brasil 2010).

A OMS relata que a eficiência terapêutica do Glucantime® depende de uma série de fatores, como a área geográfica e os protocolos de tratamento determinados (Carvalho et al. 2000).

No que diz respeito ao tratamento da LCD, novas pesquisas tornam-se imprescindíveis, considerando a duração dos esquemas propostos, as vias de administração dos medicamentos e, sobretudo o potencial de toxicidade das drogas utilizadas.

Já na forma mucosa da LTA o tratamento é difícil e constitui um desafio. Vale enfatizar também que, mesmo com o tratamento adequado com antimonial, a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento de mucosas é frequente, sendo de 2% nos casos tratados e ao redor de 10% nos casos não tratados (Name et al. 2005; Almeida & Santos 2011).

Para a maioria das regiões endêmicas, com exceção da Venezuela, Guiana Francesa e Suriname que seguem políticas próprias de saúde, a OMS recomenda o tratamento contra a LC 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).

Existe um aumento de evidências que a resposta ao tratamento contra LTA depende da espécie e cepa de *Leishmania* spp. Além disso, a utilização do antimônio pentavalente tem sido ameaçada pelo desenvolvimento natural de resistência dos parasitos à droga (Soto et al. 2004; Yardley et al. 2005; Croft, Sundar, Fairlamb 2006; Arevalo et al. 2007).

Na última década, medicamentos alternativos e novas formulações de fármacos tradicionais têm sido disponibilizados e já estão em uso em alguns países (Croft, Seifert, Yardley 2006). Outros ainda estão na fase dos testes clínicos, como miltefosine, paramomicina em nova formulação, imiquimod e anti-fúngicos azólicos, como cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Entretanto, é pouco provável que estes estudos levem ao desenvolvimento de um único fármaco capaz de tratar todas as variantes das leishmanioses, com suas diferentes

espécies causadoras e diferentes graus de resistência aos tratamentos tradicionais (Croft, Seifert, Yardley 2006).

A despeito das posologias e das respostas ao tratamento serem variáveis de acordo com a espécie do parasito, região endêmica e fatores do hospedeiro, geralmente os mesmos fármacos e posologias continuam sendo utilizados para tratar as leishmanioses independentemente da espécie causadora (Reithinger et al. 2007). O levantamento realizado por Saboia (2011), corroboram com esses dados (Quadro 1).

Segundo Saboia (2011), no Novo Mundo, nos últimos 22 anos, a taxa de cura da leishmaniose variou de 33 a 100%. Na maioria dos estudos clínicos realizados não houve grupo controle e o número de pacientes avaliados foi pequeno (menos de 25). Esses fatores refletem o baixo nível das evidências para auxiliar a escolha da melhor conduta para o tratamento da doença e, reforçam a necessidade de realização de novas pesquisas clínicas.

Quadro 1- Nível de evidência dos estudos da terapêutica da LTA no período de 1972 a 2011.

antimoniato de meglumina			
Autor, Ano, País	Tratamento	%Cura	Desenho de Estudo /Nível evidência
Sampaio et al. 1989/Brasil	20mgSbV/kg/dia-20 dias	85,7	NC, NR/ Moderada
Machado et al. 2010/ Brasil	NM Glucamina 15 a 20 mg/kg/dia-20dias	53	C, R / Alta
Crusciak -Talhari 2011/ Brasil	15 a 20 mg/kg/dia-20 dias	53,6	C , R/ Alta
Sampaio, Sampaio, Marsden 1989/Brasil	20mgSbV/kg/dia-30 dias	60	C/ Moderada
pentamidina			

Autor, Ano, País	Tratamento	%Cura	Desenho de Estudo /Nível evidência
de Paula, Sampaio, Cardoso, Sampaio 2003/ Brasil	3 - 4 mg/ kg/dia - 1 semana X	100	C/ Moderada
Amato et al. 1997/ Brasil	Pentamidina 2 a 4 g total	90 a 94	C/ Moderada
anfotericina B lipossomal			
Autor, Ano, País	Tratamento	%Cura	Desenho de Estudo /Nível evidência
Sampaio, Marsden 1997/ Brasil	2mg/kg/dia 2 a 5 g	83	C/ Moderada
miltefosina			
Autor, Ano, País	Tratamento	%Cura	Desenho de Estudo /Nível evidência
Machado et al./ 2010/ Brasil	Miltefosine 2,5mg/kg/dia-28 dias	75	C , R/ Alta
Chrusciak - Talhari 2011/Brasil	Miltefosine 2,5mg/kg/dia-28 dias	71,3	C , R/ Alta
Soto et al. 2007/Bolivia	2,5mg/kg/dias-4 semanas	71	C / Moderada
Soto et al. 2009/ Bolivia	2,5mg/kg/dias-6 semanas	75	C/ Moderada
Saboia 2011/Brasil (dissertação)	Miltefosine 100mg dia - 28 dias	100	C , R/ Alta
associação de drogas			
Autor, Ano, País	Tratamento	%Cura	Desenho de Estudo /Nível evidência
Machado et al. 2007/Brasil	Oral pentoxifilina (1200 mg/dia) + antimonia pentavalente(20mg/kg/dia)	100	C, R/ Alta
Machado et al. 2007/Brasil	Oral alopurinol (20mg/kg/dia) + antimonia pentavalente (20mg/kg/dia),28 dias	95	C, R/ Alta

C: Controlado, R: Randomizado, NC: Não controlado, R: Não randomizado. Adaptado de Saboia, 2011.

A resistência parasitária aos quimioterápicos é um problema a ser solucionado e apesar da diversidade clínica, patológica e etiológica observada nas leishmanioses, os derivados do antimônio pentavalente têm sido utilizados há mais de 60 anos para tratar todas as formas clínicas da doença. Foram relatados casos que não responderam ao esquema terapêutico convencional, assim como parasitos resistentes às drogas vêm aumentando nos últimos anos (Croft, Sundar, Fairlamb 2006).

Na Índia, os dados são alarmantes, a terapia da leishmaniose visceral com antimônio pentavalente apresenta falha ao tratamento em 34 a 65% dos casos (Sundar et al. 2000; Sundar 2001; Thakur et al. 1998). O mesmo já foi observado com a utilização de terapia convencional na leishmaniose cutânea (Romero et al. 2001a; Palacios et al. 2001).

O cenário de falha terapêutica da leishmaniose cutânea na América Latina revela que: 7% ocorrem na Bolívia (Bermúdez et al. 2006), 16% no Brasil (Oliveira-Neto et al. 1997), 21,9% no Peru (Arevalo et al. 2007) e 39% na Colômbia (Palacios et al. 2001).

No fenômeno de falha terapêutica estão envolvidos vários fatores como: características do hospedeiro, a genética e a resposta imunológica; fatores farmacológicos, como a qualidade da droga, o seu lote e a empresa que a produz; a duração do tratamento; e a biologia do parasita, como uma ausência de sensibilidade intrínseca de uma determinada espécie ou cepa e o fenótipo de resistência à droga (Grogl et al. 1989; Torres 2009).

No Brasil, apesar de vários relatos de casos refratários ao tratamento em diferentes estados, poucos estudos foram realizados analisando a sensibilidade de isolados clínicos à droga (Oliveira-Neto et al. 1997; Romero et al. 2001a; Teixeira et al. 2008).

Diferentes espécies de *Leishmania* são conhecidas por apresentar variabilidade intrínseca em relação à suscetibilidade ao antimônio (Allen & Neal 1989). Já foi constatado no Brasil que na leishmaniose cutânea, há uma diferença na resposta terapêutica ao tratamento com antimônio dependendo do agente etiológico. No caso da *L.(V.) braziliensis* a taxa de cura foi de 50,8% enquanto

que para *L.(V.) guyanensis* foi de 26,3% (Romero et al. 2001a). Há também diferenças em relação a origem geográfica, uma vez que pacientes infectados com *L.(V.) braziliensis* no Peru apresentaram uma taxa de cura de 69,6% (Arevalo et al. 2007). Além disso, tanto a resistência primária como a secundária ao antimônio podem contribuir para a falha terapêutica na LC (Rojas et al. 2006). Portanto, a sensibilidade de isolados clínicos de *Leishmania* ao antimônio está sob influência de diversos fatores, que merecem devida atenção no planejamento de futuros estudos envolvendo esta área.

O fenótipo de resistência a drogas em *Leishmania* pode ocorrer espontaneamente na natureza (Grogl, Thomason, Franke 1992), sendo determinado geneticamente, e pode também ser induzido *in vitro* pela exposição do parasito a doses crescentes da droga (Grogl et al. 1989).

É importante ressaltar que falha terapêutica e resistência às drogas são dois fenômenos distintos que devem ser cuidadosamente analisados. O primeiro é uma resposta da interação parasito-hospedeiro-droga e o segundo a seleção de parasitos resistentes quando em contato com a droga. Ambos os fenômenos já foram encontrados na Índia (Lira et al. 1999) e no Irã (Hadighi et al. 2006), entretanto o mesmo não ocorreu no Nepal (Rijal et al. 2007) e no Sudão (Abdo et al. 2003).

Alguns estudos relatam uma associação com a resposta terapêutica apenas em testes de susceptibilidade na forma amastigota (Ibrahim et al. 1994; Lira et al. 1999), enquanto outros encontraram uma correlação na forma promastigota (Azeredo-Coutinho et al. 2007; Moreira et al. 1998; Robledo, Valencia, Saravia 1999). Portanto, ajustar e padronizar os ensaios de susceptibilidade às drogas em *Leishmania* deve ser de fundamental importância de modo a permitir que possam ser usados no prognóstico da doença (Torres 2009).

Levando-se em consideração as deficiências no tratamento corrente, o surgimento de cepas de parasitos resistentes aos medicamentos disponíveis e a co-infecção leishmaniose-HIV, admite-se a necessidade urgente de pesquisas

voltadas a esclarecer esta situação (Reithinger 2001; Kolodziej & Kiderlen 2005; Seifert & Croft 2006).

A única característica que difere os organismos da ordem Kinetoplastida é a presença de um DNA mitocondrial presente no cinetoplasto (kDNA), localizado próximo ao corpo basal do flagelo (Simpson 1987).

Leishmania spp reproduzem-se por divisão binária (Grimaldi, Tesh, McMahon-Pratt 1989) e sua diversidade biológica é decorrente de mutações e/ou trocas genéticas entre os parasitos (Cupolillo, Grimaldi, Momen, 1997). Apesar de ser um organismo eucarioto, apresenta uma série de características únicas, similares aos seus ancestrais bacterianos: carência de *introns*, agrupamento policistrônico dos genes com uma maquinaria transcricional simplificada, no qual há processamento de mRNA por *trans-splicing* acoplado a poliadenilação (Ivens et al. 2005; Smith, Blanchette, Papadopoulos 2008). Considerando que a regulação da expressão gênica em Kinetoplastida é realizada principalmente ao nível pós-transcricional, estudos relatam uma grande importância de regiões não traduzidas da posição 3' (3'-UTR) com função regulatória (Boucher et al. 2002; Haile & Papadopoulos 2007; Torres 2009).

As diferentes espécies de *Leishmania* apresentam de 34 a 36 cromossomos (Wincker et al. 1996; Britto et al. 1998), nos quais 31 são conservados e os outros são oriundos de eventos de fusão ou fissão. Uma comparação de genomas completos de três espécies de *Leishmania* (*L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) infantum*, *L.(L.) major*) revelou conteúdo, sintenia e arquitetura genética bem conservados (Quadro 2), sendo a perda de genes e formação de pseudogenes os principais fatores que transformam esses genomas (Peacock et al. 2007).

Foram encontrados 78 genes espécie-específicos e o mais interessante foi a presença de uma maquinaria de interferência mediada por RNA (RNAi) e elementos transponíveis somente em *L. (V.) braziliensis*. Essa alta conservação genômica sugere que um pequeno número de genes espécie-específico seria relevante para a patogenicidade, que o perfil de expressão gênica difere consideravelmente entre espécies ou que o genoma do parasito apresenta apenas

um pequeno papel na apresentação clínica da doença (Smith, Peacock, Cruz 2007).

Quadro 2 - Características genômicas de três espécies de *Leishmania*.

Espécies Características	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>
Cromossoma	36	34	35
Contigs	36	562	1041
% Citosina(C) + Guanina(G)	89,7	59,3	57,76
Tamanho (Nucleotídeo, bp)	32.816.678	32.134.935	32.005.207
Genes codificantes	8298	8154	8153
Pseudo genes	97	41	161
% C + G - região de codificação	52,5	52,45	60,38

Adaptado de Kazemi, 2011. C= citosina. G= guanina.

Parasitas do gênero *Leishmania* possuem dois genomas – DNA nuclear e DNA cinetoplastideal. *L. infantum* e *L. major* apresentam um cariótipo de 36 cromossomas (Wincker et al. 1996; Bañuls et al. 2007) e *L.(V.) braziliensis* 34 a 35 cromossomas (Bañuls et al. 2007, Peacock 2007), nos quais cerca de 30% consiste em seqüências repetitivas que resultam da região telomérica, microsatélites, *transposons* e repetições de algumas famílias de genes dispersos. Em geral as espécies de *Leishmania spp* parecem ter um genoma diploide relativamente rico em conteúdo G + C, alcançando aproximadamente 65% (Ivens & Blackwell, 1999).

O genoma de *L. major* está seqüenciado em sua totalidade e a cepa utilizada para o projeto foi a *L. major* MHOM/IL/80/Friedlin Friedlin (Ivens et al. 2005) (www.genedb.org). Assim como o genoma de *L. infantum* clone JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877) e *L.(V.) braziliensis*, com 36 e 35 cromossomos respectivamente, porém o número de proteínas é muito maior, o que possivelmente se deve ao processo de *splicing* alternativos, já que a *Leishmania*

spp é desprovida de *introns*. Análises iniciais indicam que mais da metade desses genes seriam únicos em *Leishmania* spp. (Ivens et al. 2005; Torres 2009)

Com o progresso mundial da plataforma genômica, a base de entendimento em dados de expressão utilizados para a análise de proteínas tem aumentado drasticamente. O termo “proteoma” surgiu pela primeira vez em 1994 para definir o conjunto total de proteínas expressas pelo genoma de uma célula, tecido ou organismo em um determinado ambiente, sob determinadas condições, além de produzir informações complementares sobre a função celular dos genes (Wilkins et al. 1995).

Nesse sentido, a análise do proteoma tornou-se uma importante ferramenta complementar aos estudos da expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo (Cahil et al. 2001). Outra abordagem da proteômica é estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, interações, modificações pós-traducionais e pós-transcricionais, tais como fosforilação, metilação, acetilação, clivagem proteolítica, entre outras (Blackstock & Weir 1999; Cahil et al. 2001).

A proteômica faz uso de metodologias que se complementam para a identificação das proteínas. O fluxo experimental consiste na extração, quantificação e identificação de proteínas. O proteoma de uma amostra pode ser analisado por meio de duas estratégias. A primeira analisa as proteínas intactas (proteômica *top-down*), já a segunda faz análises a partir de seus peptídeos (proteômica *bottom-up*) (Nesaty & Suter 2008). Na proteômica *bottom-up*, as proteínas de uma mistura são digeridas e os peptídeos resultantes são analisados por um perfil de digestão ou impressão digital de peptídeos (do inglês *Peptide Mass Fingerprinting*) utilizando *mass spectrometry* (MS) ou sequenciamento *de novo* via *tandem* MS (MS/MS) (Nesaty & Suter 2008).

Os primeiros estudos proteômicos datam de 1975, quando O’Farrel & Klose descreveram pioneiramente a técnica de eletroforese bidimensional com o isolamento e a visualização de proteínas de alguns organismos e a construção dos primeiros bancos de dados. Entretanto não era possível a identificação das proteínas por falta de métodos de sequenciamento sensíveis. O primeiro método

desenvolvido para a identificação de proteínas foi desenvolvido por Edman (1949). Este sequenciamento consiste na leitura dos aminoácidos da extremidade N-terminal livres da proteína, porém deixou de ser usual por apresentar pouca sensibilidade, consumir muito tempo (horas ou dias) e não ser aplicável às proteínas cujo N-terminal estivesse bloqueado como resultado de modificações sofridas durante a sua purificação (Ashcroft, 2003).

A partir da década 1980, os avanços instrumentais e o desenvolvimento metodológico da espectrometria de massa (*mass spectrometry-MS*) facilitaram a identificação das biomoléculas tornando-a mais rápida, sensível e precisa, com capacidade de fragmentar os peptídeos em segundos, sem a necessidade de purificação prévia ou sem apresentar problemas com as extremidades N-terminal bloqueadas ou modificadas (Pandey & Mann 2000; Griffin, Goodlett, Aebersold 2001).

A proteômica é uma área atual de grande interesse mundial, a qual está relacionada com a determinação em grande escala do gene que expressa a proteína e de sua função celular. Em paralelo, a procura médica por biomarcadores é cada vez mais evidente e as proteínas, moléculas fundamentais para a vida, podem atuar como biomarcadores de diversas doenças, sendo detectadas em concentrações mínimas por MS. A proteômica usa uma coleção de várias técnicas, e entre elas encontramos imagens celulares por microscopia eletrônica e experimentos com *chip* e *array*, e experimentos genéticos de leitura (Slemmon et al. 1994; Aebersold & Mann 2003).

Outra abordagem importante em proteômica é a análise *de novo* de proteínas e populações proteicas isoladas de células e tecidos. Tais estudos normalmente representam grandes desafios devido ao elevado grau de complexidade de proteomas celulares e à baixa abundância de muitas das proteínas envolvidas, o que requer técnicas analíticas altamente sensíveis.

A MS tem se tornado cada vez mais a técnica de escolha para a análise de amostras complexas de proteínas. A proteômica utilizando a MS se torna viável pela disponibilidade de base de dados de sequências de genes (genoma) e avanços técnicos e conceituais em muitas áreas, como a descoberta e

desenvolvimento de métodos de ionização de proteínas, reconhecidos com o prêmio Nobel de 2002 em química (Abdelnur 2010).

A proteômica baseada em MS tem se estabelecido como uma tecnologia indispensável para interpretar as informações codificadas em genomas. Até o momento, análises proteicas (sequência primária, modificações pós-traducional ou interações proteína-proteína) por MS têm tido maior sucesso quando aplicadas a pequenos conjuntos de proteínas isoladas em contextos funcionais específicos. A análise sistemática de um número muito maior de proteínas expressas em uma célula, um objetivo explícito da proteômica, está agora também avançando rapidamente, principalmente devido ao desenvolvimento de novas abordagens experimentais (Aebersold & Mann 2003).

Embora tenha tido enorme sucesso, a proteômica-MS ainda enfrenta significantes desafios técnicos. Cada avanço que permite um novo tipo de medida ou melhora da qualidade dos dados por tipos tradicionais de medidas, expande a gama de aplicações potenciais de proteômica-MS para biologia molecular e celular. A proteômica utilizando a MS além de contribuir com dados confiáveis em relação à estrutura química da molécula poderá contribuir com a habilidade de analisar as proteínas em seus níveis endogênicos e em seus estados nativos (Steen & Mann 2004; Abdelnur 2010).

O objetivo deste trabalho foi estudar as cepas de *Leishmania* isoladas das lesões de dois pacientes, um portador de leishmaniose cutânea difusa e outro de leishmaniose cutânea mucosa que não tiveram resposta clínica satisfatória aos tratamentos convencionais para leishmaniose, visando testar a virulência, o comportamento perante a fagocitose e sensibilidade dessas cepas às drogas específicas usadas no tratamento da LTA e também identificar e caracterizar proteínas das mesmas .

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico:

Trata-se de um parasito protozoário intracelular monoflagelado que pertence a família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, classe *Zoomastigophorea*, filum *Sarcomastogophora*. As espécies abordadas no presente trabalho são:

2.1.1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

Esta espécie de *Leishmania* causa a forma cutânea-localizada. Tem como reservatórios naturais roedores (*Proechimys* spp. e *Oryzomys* spp.) e frequentemente marsupiais (*Didelphis* spp., *Philander* spp., *Marmosa* spp., *Caluromys* spp. e *Metachirus* spp.). Também é responsável pela forma LCD, caracterizada por: infiltrações, pápulas e tubérculos, envolvendo extensas áreas cutâneas. É transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomya flaviscutellata* e *Lutzomya olmeca* (Shaw & Lainson 1975; Funasa 2000).

Casos de LTA atribuídos à *L.(L.) amazonensis* têm sido assinaladas na região Amazônica, no Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e no Sul do país.

2.1.2- *Leishmania (Viania) braziliensis*:

A leishmaniose tegumentar, cuja etiologia é atribuída a *L. (V.) braziliensis*. É o principal agente da forma cutânea-mucosa, produzindo também a forma

cutânea-localizada e a forma disseminada. Apresenta ampla distribuição no Brasil e já foi identificada em todas as áreas endêmicas do país (Barral et al. 1991; Passos et al. 1999; Funasa 2000; Grisard et al. 2000).

A doença acomete pele e mucosa e é caracterizada por úlcera, única ou múltipla. É a forma mais predominante em humanos. Sua transmissão está associada aos vetores *Lutzomya whitmani*, *Lutzomya wellcomei* e *Lutzomya intermédia* (Lainson & Shaw 1973; Funasa 2000; Gontijo & Carvalho 2003). Seus hospedeiros naturais são mamíferos silvestres, tendo sido registrada em roedores (*Proechimys sp.*, *Rhipidomys sp.*, *Oryzomys sp.*, *Akodon sp.* e *Rattus sp.*) e em marsupiais (*Didelphis sp.*). O homem, assim como os roedores domésticos, cães, equinos, gatos e mulas são hospedeiros acidentais (Funasa 2000).

2.2 Ciclo de vida

Durante seu ciclo de vida, as espécies de *Leishmania* circulam entre dois hospedeiros distintos, o flebotomíneo e o hospedeiro mamífero. Sua sobrevivência em diversos organismos se dá pela evolução de formas parasitárias distintas que se adaptam às diferentes condições de vida encontradas em ambos os hospedeiros (Molyneux & Killick-Kendrick 1987).

As duas formas principais encontradas no ciclo (Figura 1) do parasito são: a forma flagelada promastigota (Figura 2A) e a amastigota (Figura 2B). A primeira é encontrada no tubo digestivo e na saliva do flebotomíneo, e pode ser mantida em meio de cultura artificial que mimetiza os nutrientes, o pH e a temperatura encontrados no trato digestivo do inseto. A forma amastigota, após ser inoculada no mamífero pelo vetor hematófago, desenvolve-se dentro do vacúolo fagolisossômico de macrófagos nos tecidos de hospedeiros vertebrados (homem e outros mamíferos), raramente se multiplicando em outras células. Uma vez dentro do macrófago, as formas amastigotas inibem diversos mecanismos de defesa celular que deveriam ser responsáveis por sua lise, tais como, fusão

fagossomoendossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (Cysne-Finkelstein et al. 1998; Cunningham 2002; Guerin et al. 2002; Desjeux 2004; Alzate et al. 2006).

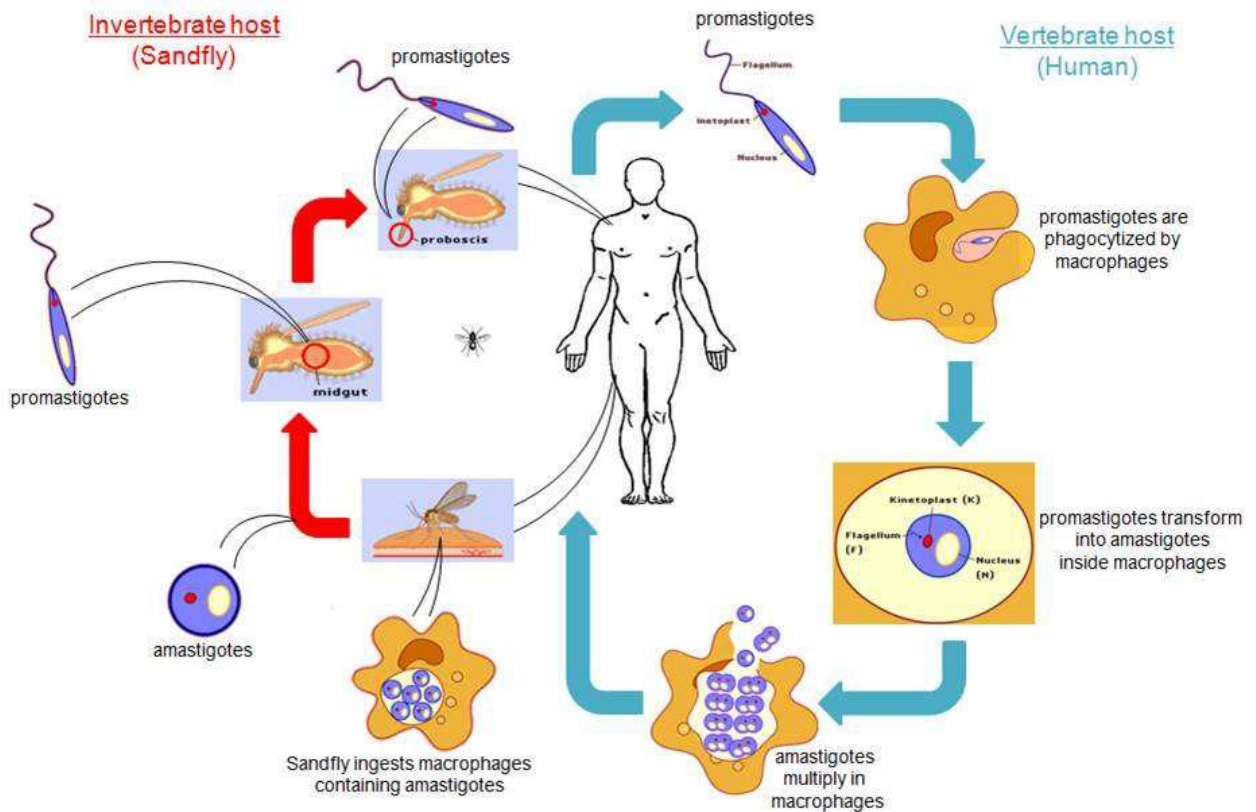


Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp. (LANG et al. 2009)

Além das formas promastigotas e amastigotas, outra forma evolutiva de destaque é a promastigota metacíclica. Esta forma possui características biológicas específicas que a diferenciam da forma amastigota e da promastigota, como a falta de capacidade de replicação. Ademais, ela é o produto final do desenvolvimento no interior do flebotomíneo e a forma infectiva adaptada para a transmissão aos hospedeiros mamíferos (Courret et al. 2002; Gossage, Rogers, Bates 2003; Akopyants et al. 2004; Ramos et al. 2004).

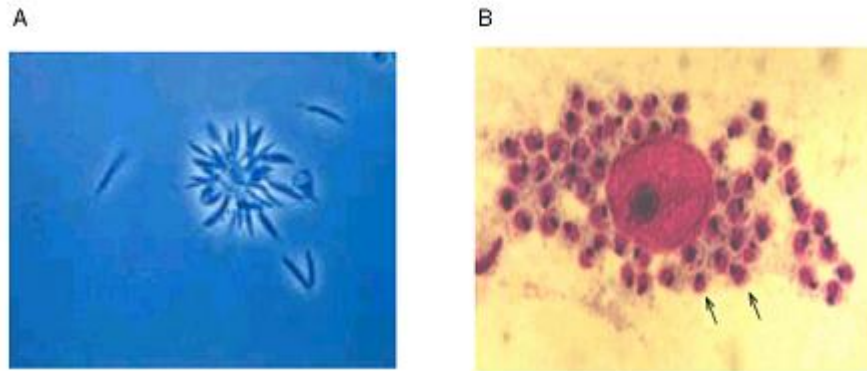


Figura 2 - Formas evolutivas de *Leishmania* spp. Promastigota (A) e Amastigota (B). (FonteA: http://www.ioc.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/fevereiro/13_02_06_01.htm FonteB: <http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>)

2.3 Estabelecimento da infecção

Uma vez transmitida ao hospedeiro mamífero, a *Leishmania*, passa pela corrente sanguínea evitando ser destruída pelo sistema imune do hospedeiro antes de infectar os macrófagos. A resistência à lise mediada pelo sistema complemento se deve ao glicocálix que as formas promastigotas metacíclicas têm, em parte às moléculas de lipofosfoglicano (LPG) (Spath et al. 2000).

A via pela qual a *Leishmania* entra no macrófago é conhecida como fagocitose mediada por receptor. Foi demonstrado que as glicoproteínas associadas e os lipídios da superfície do parasito estão implicados na adesão à membrana plasmática do macrófago (Henriques & De Souza 2000).

No reconhecimento e internalização do parasito participam fatores como: os receptores do macrófago e as fibronectinas (Alexander, Satoskar, Russell 1999).

Foi demonstrado por Tripathi & Gupta (2003) que promastigotas metacíclicas cultivados *in vitro*, na fase estacionária de crescimento apresentam mais fosfatidilserina(PS) na parte externa da membrana, o que condiciona sua infectividade.

2.4 Resposta imune

A resposta imune do hospedeiro contra a *Leishmania* pode determinar a evolução da doença. A resposta imune celular Th2 está associada com a piora da doença e o padrão Th1 com a cura, envolvendo linfócitos T CD4+, com a produção de IL-2, IL-3 e *interferon* que ativam os linfócitos citotóxicos, células NK e macrófagos (Lux et al. 2000).

Os macrófagos, depois de fagocitarem as leishmânias, desencadeiam mecanismos microbicidas muito importantes como, a produção de óxido nítrico e de radicais de oxigênio. Os radicais de oxigênio podem ter ação diretamente sobre as leishmânias, desnaturando proteínas, lesando membranas das células e o DNA. Os radicais de nitrogênio (óxido nítrico), geralmente agem pela reação com os radicais de oxigênio, formando peroxinitritos, que são altamente tóxicos para os parasitos (Muniz-Junqueira & de Paula-Coelho 2008).

Nas lesões ativas da forma mucosa da leishmaniose foram achados níveis elevados de linfócitos T CD4+ e células T produtoras de IFN- γ , com redução destes elementos após o tratamento. A atividade citotóxica mediada por linfócitos T CD8+ específicos para os parasitos, bem como altos níveis locais de IFN- γ , TNF- α , e IL-4 foram considerados marcadores da patogênese na LM. O dano mucoso parece estar relacionado à resposta imune exacerbada. Em pacientes curados, os macrófagos e IL-10 estão significativamente aumentados, enquanto linfócitos T CD8+ e células NK estão mais elevados em casos de recidiva (Amato De Andrade, Duarte 2003) A inibição da ativação macrofágica e da atividade da enzima óxido nítrico sintase são os principais mecanismos responsáveis pela reativação da doença (Tuon 2008).

2.5 Tratamento

O antimônio trivalente foi o primeiro medicamento utilizado em 1912. Entre 1920 e 1930 foram introduzidos os antimoniais pentavalentes na terapêutica da leishmaniose visceral, mostrando menor toxicidade (Vianna, 1912; Murray 2000; Sundar 2001; Soto et al. 2005).

Até o momento, não existe terapêutica ideal para as leishmanioses, contudo os antimoniais têm representado a base principal nas últimas décadas, com cura de 60 a 90% dos casos, apresentando-se como a melhor opção terapêutica disponível (Berman 1997; Herwaldt 1999; Name et al. 2005).

As maiores incidências de leishmaniose são encontradas nas zonas rurais e a administração parenteral da droga é cara e de difícil acompanhamento. Apresentam ainda, outros inconvenientes como elevação dos níveis de transaminases, reações dérmicas locais, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (Katakura 1999; Sampaio, Porto, Mota 2003; Name et al. 2005).

A necessidade de administração parenteral e a toxicidade da droga, principalmente para idosos, cardiopatas e nefropatas, dificultam o seu emprego. Embora raros, existem relatos de morte súbita desencadeada pela cardiotoxicidade dos antimoniais (Sampaio, Porto, Mota 2003; Name et al 2005).

Apesar da efetividade comprovada dos antimoniais pentavalentes, como o antimônio de meglumina, deve-se levar em conta o custo, o longo período de tratamento e a resistência, que é um fenômeno crescente em todas as formas de leishmaniose, com relatos cada vez mais frequentes de tratamentos não responsivos (Sampaio et al 1990; Sampaio et al 1991; Brendle et al. 2002).

A pentamidina (Figura 3), utilizada como tratamento de segunda escolha em casos não responsivos aos antimoniais, é uma diamina aromática utilizada inicialmente no tratamento de infecções por *Pneumocystis carinii* (Singh & Sivakumar 2004).

Esse composto parece atuar no DNA do cinetoplasto do parasito onde é capaz de inibir suas funções. Entretanto, o declínio nos percentuais de cura sugere o desenvolvimento de resistência dos parasitos a este fármaco (Donkor et al. 2001, Andersen et al. 2005).

Apresentam problemas de toxicidade, entre estes, pancreatite, hipotensão, disglucemia e anormalidades cardíacas (Brendle et al. 2002).

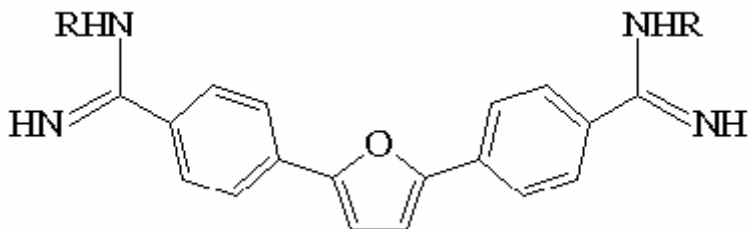


Figura 3 - Fórmula estrutural da pentamidina.
(Fonte: <https://www.sbj.org.br/ranteriores/23/resumos/0548-1/index.html>).

A anfotericina B (Figura 4) é um antifúngico, utilizado no tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos, e apresenta atividade contra parasitos do gênero *Leishmania*.

Acredita-se, que assim como nos fungos, a anfotericina B atue ligando-se ao ergosterol da membrana celular do parasito *Leishmania*, o que explica sua eficácia no tratamento (Singh & Sivakumar 2004; Sundar et al. 2004).

Suas outras formulações, especialmente a lipossomal, são consideradas ativas e apresentam menor toxicidade. É constituída por pequenas vesículas unilamelares feitas a partir de uma membrana dupla de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e distearolfosfatidilglicerol estabilizado com colesterol em uma relação de 2:0.8:1 combinada com anfotericina B. Ela é melhor tolerada que a anfotericina B desoxicolato (Hiemenz & Walsh 1996; Singh & Sivakumar 2004; Sundar et al. 2004).

Age especificamente sobre as células alvo (macrófagos), sendo incorporada ao meio intracelular e, assim, reduz os efeitos colaterais com maior eficácia terapêutica, inclusive em pacientes sem resposta ao tratamento com o antimonial. Seu uso é limitado pelo alto custo e administração endovenosa. Apresenta eventos adversos como febre, dor de cabeça e nefrotoxicidade

(Bryceson 1987; Sampaio et al. 1997; Davidson et al.1991; Torres-Cisneros et al. 1993; Hashim et al. 1995; Brendle et al. 2002).

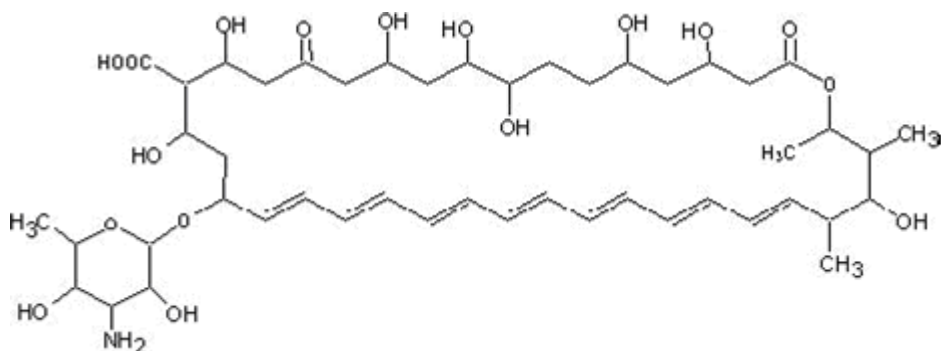


Figura 4 - Fórmula estrutural da anfotericina B desoxicolato.
(Fonte:http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Salud/Arias_Z_R/generalid.htm)

A miltefosina (Figura 5) é um alquil-fosfolipídio, inicialmente desenvolvido como um agente antineoplásico, que nos últimos anos, foi identificado como o primeiro tratamento oral para leishmaniose. Esta droga foi responsável por 95% de cura em pacientes tratados em ensaios clínicos, e é ativa sobre parasitos resistentes aos antimônios. Seu uso é desaconselhável em mulheres grávidas e pode causar esterilidade em cães machos (Belliard et al. 2003; Seifert & Croft 2006).

Por ser um medicamento recentemente aprovado para o tratamento da leishmaniose, não se tem muitos dados em relação à resistência dos parasitos; porém, pode ser induzida *in vitro* facilmente (Perez-Victoria et al. 2003).

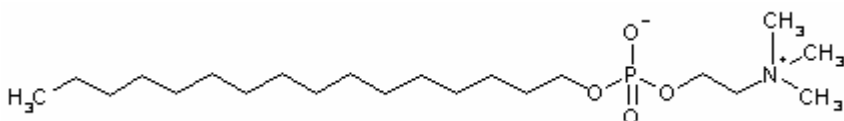


Figura 5 - Fórmula estrutural da miltefosina.
(Fonte: <http://www.prous.com/images/moleculas/144760.gif>)

Outros medicamentos

O aluporinol, análogo da hipoxantina, apresenta atividade citotóxica seletiva aos parasitos. Estes parasitos são incapazes de sintetizar purinas e necessitam,

portanto, de purinas pré-formadas do hospedeiro para sobreviver (Singh & Sivakumar 2004).

Embora este fármaco seja pouco eficaz na terapia isolada da leishmaniose cutânea, o aumento de sua eficácia é observado em combinação com outras drogas (Koutinas et al. 2001; Pasa et al. 2005).

Um antibiótico aminoglicosídeo, a paramomicina, produzido pelo *Streptomyces rimosus*, utilizado em infecções bacterianas, demonstrou capacidade de inibir o crescimento de protozoários do gênero *Leishmania*. Esta tem sido usada no tratamento da leishmaniose visceral, tanto sozinha quanto em combinação com agentes antimoniais (Olliaro et al. 2005).

Outra classe de antifúngicos, os azóis, o itraconazol e o cetoconazol, têm demonstrado serem efetivos no tratamento das leishmanioses cutâneas (Alrajhi et al. 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

3.1.1 Estudar duas espécies de *Leishmania* isoladas de pacientes com diagnóstico de LTA sem resposta satisfatória ao tratamento comparando-as com cepas padrões, visando avaliar *in vitro* a ação das drogas utilizadas no tratamento e identificar e caracterizar proteínas dos isolados.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Relatar e analisar dois casos clínicos de pacientes com diagnóstico de LTA que não responderam ao tratamento convencional; um com diagnóstico de LCD e outro com LCM.

3.2.2 Avaliar o crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* isolada de lesões do paciente portador de LCD e *L. (V.) braziliensis* isolada do paciente portador de LCM comparando com promastigotas de cepas controles dessas espécies de *Leishmania*.

3.2.3 Avaliar a cinética de infecção e determinar o tempo gasto na transformação de formas promastigotas para amastigotas dos isolados de lesões dos pacientes estudados.

- 3.2.4 Avaliar a ação *in vitro* das drogas antimoniato de meglumina, anfotericina B lipossomal, pentoxifilina, itraconazol, alopurinol e miltefosina, sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* isolada de lesões do paciente portador de LCD e *L. (V.) braziliensis* isolada do paciente portador de LCM comparando com promastigotas de cepas controles dessas espécies de *Leishmania*.
- 3.2.5 Avaliar a ação *in vitro* das drogas antimoniato de meglumina, anfotericina B lipossomal e miltefosine, utilizadas no tratamento da LTA sobre formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* isolada de lesões do paciente portador de LCD e *L. (V.) braziliensis* isolada do paciente portador de LCM comparando com amastigotas axênicas de cepas controles dessas espécies de *Leishmania*.
- 3.2.6 Identificar e caracterizar proteínas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* dos isolados dos pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Realizou-se um estudo retrospectivo (em prontuário médico) do diagnóstico clínico e laboratorial de um paciente com LCD e de um paciente com LCM que procuraram o serviço de referência de Leishmaniose Tegumentar Americana do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) do Distrito Federal (DF) e que foram tratados com várias drogas específicas para LTA, sem sucesso terapêutico.

Os critérios utilizados para o diagnóstico dos pacientes foram: a história clínica, o exame físico, a intradermoreação de Montenegro com resultado maior que 5mm, exame histopatológico com presença de infiltrado linfocitoplasmocitário e imunofluorescência indireta com títulos maiores que 1:40, a pesquisa de amastigota em esfregaço e a inoculação em hamster positivos. Estes critérios laboratoriais também foram usados para estabelecer as recidivas.

4.2 Cepas controle de *Leishmania*

Os parasitos controles utilizados neste trabalho foram formas promastigotas (Quadro 3) oriundas de culturas de cepas mantidas crio-preservedas (-196°C) no laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Quadro 3 - Origem e identificação de *Leishmania spp* disponível no laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Espécies	Designação ^a / Origem geográfica
<i>L. L. amazonensis</i>	MHOM/BR/PH8
<i>L. V. braziliensis</i>	MHOM/BR/94/M15176

a: designação: hospedeiros [M = Mammalia: HOM: *Homo sapiens*/país de origem/ano de isolamento/código de origem.].

O isolado de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/M15176) foi cedida pelo Instituto Evandro Chagas-Belém, Pará e identificada por técnicas de anticorpos monoclonais e em reação em cadeia polimerase (PCR).

O isolado de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foi identificada pelas técnicas de isoenzimas e anticorpos monoclonais, e é oriunda da OMS isolada a partir de flebotomíneo.

As referidas cepas foram freqüentemente inoculadas em hamsters para assegurar a infectividade e garantir a virulência dos inóculos.

4.3 *Leishmania spp* isoladas de pacientes.

A cepa de *L.(L.) amazonensis*, identificada por isoenzimas e anticorpos monoclonais e por imunohistoquímica com anticorpos monoclonais específicos, corresponde à forma de LCD e a cepa de *L. (V.) braziliensis* identificada por isoenzimas, anticorpos monoclonais e PCR corresponde à forma de LCM e foram isoladas de pacientes que não responderam ao tratamento com as drogas específicas para LTA. Os referidos isolados foram mantidos sob congelamento em nitrogênio líquido (-196°C).

4.4 Culturas de formas promastigotas

Uma alíquota do material descriopreservado do nitrogênio líquido foi coletado 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 por cinco dias. Após esse período, a cultura foi transferida ao meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco® Laboratório, BRL), suplementado com 7,5% de bicarbonato de sódio, 0,02% de gentamicina e 20 % de soro fetal bovino (SFB), em pH final de 7,2 ou meio Schneider (Sigma®) suplementado com 0,02% de gentamicina e 20% de SFB.

O SFB usado foi inativado a 56°C por 2 horas em banho-maria e submetido a alíquotas em frascos de vidros estéreis, estocados a – 20°C e, no momento do uso, descongelado. O RPMI e Schneider foram estocados a 4°C.

4.4.1 Contagem dos parasitos

Após replicação das formas promastigotas a contagem foi feita com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Os parasitos, em fase logarítmica de crescimento, foram suspensos em uma solução contendo 10µL do meio de cultura e 90µL de PBS, homogeneizados e uma pequena alíquota dessa suspensão foi utilizada para preencher a câmara de Neubauer.

A contagem dos parasitos foi feita na parte da câmara de Neubauer utilizada para contagem de leucócitos (Figura 6).

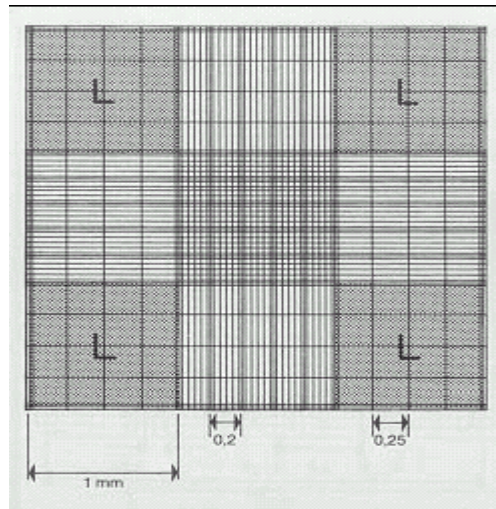


Figura 6 - Câmara de Neubauer de contagem adaptada para microscópio de campo claro ou de contraste de fases. A área marcada com L corresponde à parte da câmara para contagem de leucócitos.

Foram contados dois quadrantes opostos (área marcada com L) e calculada a média, dividindo-se o número total de parasitos por dois. Os critérios para contagem foram:

- Não foram contadas rosetas ou emaranhados;
- Foram contadas como dois as formas promastigotas em divisão avançada;
- Foram contadas como um as formas no início da divisão;
- Formas que estavam em cima da linha e muito próximas do quadrante também foram contadas.

Após três contagens e obtenção da média das formas promastigotas, foi obtida a quantidade em volume de meio de cultura que continha 10^6 formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* que foi depositado em cada poço da placa de Elisa.

4.5 Culturas de formas amastigotas axênicas

Formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis*, tanto da cepa controle quanto dos isolados foram cultivadas até a fase exponencial tardia

ou fase estacionária de crescimento e lavadas uma vez em PBS pH 7,4 a 2.000xg/10 minutos. Em seguida, a concentração foi ajustada para 3×10^6 promastigotas/mL em meio Schneider suplementado com 0,02% de gentamicina e 20% de SBF em frasco de cultivo celular 25cm² e mantidos a 37°C com 5% CO₂ por 48 horas. Para desagregação de grumos, os parasitos foram passados 3 vezes por agulha 26G½.

As formas arredondadas obtidas foram avaliadas quanto à morfologia (forma oval/arredondada e flagelo livre ausente) coradas pelo Giemsa e observadas em microscopia óptica.

4.6 Drogas utilizadas

A miltefosina foi cedida ao Laboratório de Dermatômologia da Faculdade de Medicina da Unb pela Indústria Farmacêutica Zentaris GmbH (Alemanha). O antimoniato de meglumina (Glucantime®, AVENTIS, França) e a anfotericina B lipossomal (Ambisome®, UnitedMedical-Gilead) foram cedidas pelo Serviço de Dermatologia do HUB. E as drogas pentoxifilina (SANOFI-AVENTIS), itraconazol (RANBAXY – GENERICO) e alopurinol (Zyloric® - GlaxoSmithKline) foram adquiridas pela pesquisadora.

4.7 Diluição seriada

Na primeira linha (A) de uma placa de Elisa de 96 poços (Figura 7) foi adicionada a solução contendo as drogas testadas, previamente preparada com 192µL de meio Schneider e volume final de 200µL por poço.

Nas demais linhas (B a H), foram adicionados 100µL de Schneider em todos os poços. A seguir, foi realizada a diluição seriada como segue:

- Da linha A foi retirado 100µL e transferido para a linha B;
- Após misturar e homogeneizar a solução na linha B retirou-se 100µL que foi transferido para a próxima linha, e assim sucessivamente até a linha G;
- No final da diluição, em G, restaram 100µL que foram desprezados;
- Na linha H foram adicionados o meio com os controles, que não receberam a droga testada.

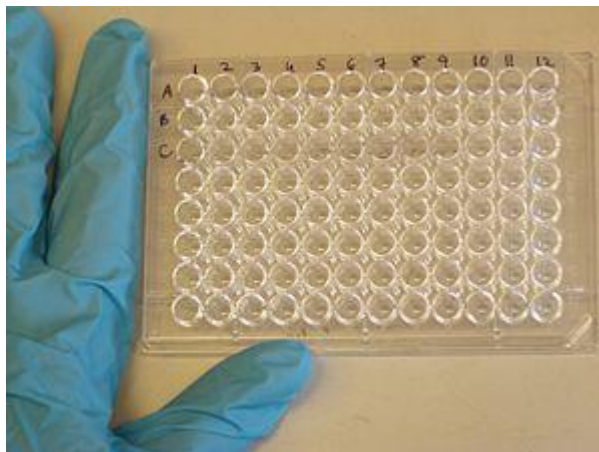


Figura 7 - Microplaca de Elisa de 96 poços
(Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/ELISA>)

4.8 Determinação da curva de crescimento das cepas

A avaliação do desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas das cepas de *Leishmania* foi realizada através de uma curva de crescimento estabelecida pela metodologia descrita por Brener (1961) adaptada para microscópio binocular, que consiste na quantificação de formas promastigotas, realizada em câmara hemacitométrica de Neubauer.

As curvas foram realizadas a partir de um inóculo contendo 1×10^7 promastigotas de *L.(L.) amazonensis* controle, *L.(V.) braziliensis* controle e dos isolados dos dois pacientes, em meio de cultura líquido Schneider (Sigma®) acrescido de 20% de soro fetal bovino e 0,2% de gentamicina, distribuídos em

garrafas para cultivo de 25 mL (área de crescimento 25 cm²). A contagem das formas promastigotas foi realizada conforme o item 4.4.1

4.9 Avaliação da capacidade fagocitária em macrófagos

O ensaio foi realizado em placa de microcultivo de fundo plano de 24 poços, onde foram previamente depositadas lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro. Foram distribuídas 2×10^5 células em volume de 500µL de meio RPMI 1640 sem soro em todas as escavações da placa, e em seguida foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 2 horas, com 5% de CO² para a aderência dos macrófagos. Em seguida, as escavações foram lavadas três vezes com STF, pH 7,2 a 37°C, para retirar as células não aderidas.

Após suspensão de *Leishmania* contendo 8×10^5 formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, previamente sensibilizadas com soro fetal bovino inativado; com volume final de cada escavação igual a 500µL. As placas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C em atmosfera de ar com 5% de CO².

Em seguida, as escavações foram lavadas com STF aquecida a 37°C (0,15M, pH 7,2), para retirar as leishmanias não fagocitadas. A última lavagem foi feita com RPMI 1640, pH 7,2, contendo 30% de SFB para preservar melhor as preparações.

Posteriormente, as lamínulas foram secas, fixadas com metanol absoluto por 1 minuto e coradas com Giemsa a 10% em tampão de coloração por 10 minutos. Depois cada escavação foi lavada três vezes com tampão de coloração e as lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia com Entellan (Merk, Alemanha).

Para estimar o índice fagocitário, 200 macrófagos foram contados em microscópio óptico sob aumento de 100x, em óleo de imersão. O cálculo foi feito

multiplicando o percentual de macrófagos envolvidos com a fagocitose pela média de leishmanias fagocitadas (Ponte 2011).

4.10 Determinação da sensibilidade *in vitro* das formas promastigotas dos isolados a diferentes drogas comumente utilizadas no tratamento da LTA.

4.10.1. Ação dos medicamentos sobre formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*

Em uma placa de Elisa de 96 escavações foi colocado, em cada poço, meio de cultura estéril seguido de uma suspensão de 10^6 formas promastigotas dos parasitos. Em seguida, os medicamentos foram adicionados à primeira linha (A) da placa de Elisa. Foi feita a diluição seriada e a placa incubada por 48h. Após este período, 10 μ L de uma solução de MTT de 5mg/mL foram adicionadas a todos os poços e a placa foi novamente incubada por 4h à temperatura de 22°C protegida da luz. Depois deste período, foram adicionadas 100 μ L de DMSO para liberação dos cristais de *formazan*. A leitura da placa foi feita em leitor de placa de Elisa (Molecular Devices-Spectra Max, 385 *plus* - USA) no comprimento de 570nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados, analisados pelo teste de ANOVA.

4.10.2 Ação dos medicamentos sobre amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis*

As formas amastigotas axênicas foram semeadas em placas de 96 orifícios, em concentração de 10^7 amastigotas/ml em meio Schneider completo e incubadas

por 24 horas na presença de diferentes concentrações das drogas a serem testados a 37°C e 5% de CO².

A atividade leishmanicida foi avaliada através da técnica do MTT, conforme descrito no item 4.10.1.

4.11 Identificação de proteínas.

4.11.1 Extração e quantificação de proteínas

4.11.1.1 Preparo da massa parasitária (“pellet”)

Foi centrifugada uma suspensão de cultura em fase logarítmica de crescimento a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos. Foi desprezado o sobrenadante, o “pellet” foi lavado com 5mL de tampão, agitado em “vortex” e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores por duas vezes. O sobrenadante da terceira lavagem foi desprezado e o “pellet” armazenado em freezer a -20°C até o momento do uso.

4.11.1.2 Extração de proteínas

O processo de extração das proteínas foi executado utilizando o protocolo proposto por Sussulini (2007) modificado.

Foi adicionado ao “pellet” de *Leishmania*, 1 mL de éter de petróleo e, então, o solvente foi deixado em contato com a amostra durante 15 min, sob forte agitação para a remoção de lipídeos. A seguir, as proteínas foram extraídas da amostra com 1 mL de uma solução contendo Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8),

cloreto de potássio 1,5 mmol L⁻¹, DTT 10 mmol L⁻¹, PMSF 1,0 mmol L⁻¹ e SDS 0,1% (m/v). O extrato protéico obtido foi, então, agitado por 10 min em banho de gelo, e os materiais insolúveis foram removidos por centrifugação durante 5 min, a 5000 g e a 4°C.

O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e armazenado em tubos do tipo Eppendorf e as proteínas foram precipitadas com acetona *overnight*.

4.11.1.3 Quantificação das alíquotas de proteínas

A dosagem das proteínas foi feita pelo “Qubit™ Protein Assay Kits” da Invitrogen™.

4.11.1.4 Digestão de proteínas

As amostras foram ressuspensas em 60 µL de bicarbonato de sódio 50mM. A seguir, adicionou-se 25 µL de solução 0,2% do *RapiGest SF* que foram agitadas em “vortex”. Depois, foram aquecidas por 15 minutos a 80°C e centrifugadas. As proteínas foram reduzidas adicionando-se 2,5µL de DTT 100mM e aquecidas a 60°C por 30 minutos.

As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, alquiladas com 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM e incubadas à temperatura ambiente no escuro por 30 minutos, e finalmente foram tripsinizadas com 10µL Tripsina Promega 50mM durante 20 horas a 37°C.

A reação de hidrólise foi interrompida com a adição de 10µL de TFA 5% incubando as amostras a 37°C por 90 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm, 6°C por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um frasco e adicionou-se 5µL de ADH (1 pmol/µL) e 85uL de acetonitrila 3%

contendo 0,1% de ácido fórmico. A concentração final de proteínas foi de 250ng/μL, de ADH foi de 25fmol/μL e o volume final foi de 200mL.

4.12 Análise dos dados

A solução peptídica resultante foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa utilizando uma coluna capilar (*NanoAcquity, UPLC-Waters, USA*) em um gradiente de 2-97% B (AcN + Ácido Fórmico 0,1%). Os dados obtidos, resultantes dos experimentos de LCMS/MS, foram processados usando o programa *ProteinLynx* (versão 2.0) da *Waters/Micromass*, um aplicativo para identificação das proteínas utilizando banco de dados obtidos do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

4.13 Análises estatísticas

A normalidade das variáveis foi analisada com o teste de Kolmogorov-Smirnov e para a comparação entre grupos foi utilizado o ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido pelos métodos de Student-Newman-Keuls para as múltiplas comparações. As análises foram feitas utilizando o programa *Sigma-Stat* (Jandel Scientific, San Rafael ,CA) e os gráficos usando o programa *Microcal™ Origin 6.0®* (Microcal Software Inc. 1999), ou o *Prism® Software Package* (GraphPad, USA, 1997) . Foram consideradas significantes diferenças de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Paciente portador de LCD

5.1.1 História clínica e exame físico

Paciente do sexo masculino, 76 anos de idade, procedente de Viçosa/MG tratado por quase 3 anos para LCD. O paciente procurou o Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília apresentando lesões em atividade do tipo pápulas, placas, tubérculos e nódulos, com acometimento de MMII, MMSS, face e demais partes corpo. As manifestações e distribuição das lesões encontram-se detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Manifestações e distribuição das lesões cutâneas apresentadas pelo paciente portador de leishmaniose cutânea difusa sem resposta aos tratamentos convencionais para LTA.

Localização das lesões	Tipos de lesões cutâneas		
	N	PP	PI
MMII	P	P	-
MMSS	P	P	-
FA	P	P	P

N= nódulo; PP= pápula; PI= placa, MMSS= membros superiores; MMII= membros inferiores; FA= Face; P= presente.

5.1.3 Tratamento

Os dados relativos aos esquemas terapêuticos e a evolução clínica desse paciente encontram-se na Tabela 2.

Em 1994, esse paciente realizou tratamento com gabromicina 16mg/kg/dia intramuscular, durante 15 dias, sem internação hospitalar e foi acompanhado clínica e laboratorialmente durante todo o período do tratamento. Houve a desinfiltração das lesões.

Em maio de 1995, apresentou recidiva, com lesões em face, braço esquerdo e coxa direita. Foi internado para tratamento com pentamidina 4mg/kg/dia durante 15 dias, completando 2000mg com melhora parcial das lesões.

Após seis meses apresentou nova recidiva sob forma de pápula eritêmato-infiltrativa na orelha direita.

Em outubro de 1996 o paciente foi novamente internado para tratamento com antimoniato de meglumina 15mg/kg/dia, com alteração da função renal (uréia 120mg/dl e creatinina 1,82 mg/dl) no 26º dia de tratamento. A medicação foi suspensa por 7 dias e, quando houve normalização dos exames laboratoriais, foi reintroduzida completando 30 dias de tratamento. Durante esta internação, o paciente também apresentou, como intercorrência, “herpes zoster”, seguido de neuralgia pós-herpética.

Tabela 2- Esquemas terapêuticos usados durante o período de setembro de 1994 a outubro de 1996 pelo paciente portador de leishmaniose cutânea difusa sem resposta adequada aos tratamentos convencionais

Droga	Dose/Dia	Duração	Ano	Evolução/Resultado
gabromicina	2,4g(2X)	-	1994	recidiva
pentamidina	2g	15 dias	1995	recidiva
antimoniato de meglumine	4,5g	90 dias	1996	recidiva

No ano de 1996 teve alta hospitalar para realizar laringoscopia com ORL para monitoramento de recidiva de CA de laringe. Apresentava melhora das lesões cutâneas e deveria continuar acompanhamento ambulatorial com dermatologia. Sem seguimento do acompanhamento médico no HUB foi a óbito.

5.2. Paciente portador de LCM

5.2.1 História clínica e exame físico

Paciente do sexo masculino, 68 anos de idade, procedente do Tocantins, tratado durante 23 anos para LCM.

Apresentou úlcera cutânea prévia em perna esquerda durante a infância com cicatrização espontânea após 4 meses. Passou longo período internado e queixava-se de obstrução nasal, rinorréia, disfagia e rouquidão.

Ao exame físico, apresentava infiltração nasal, perfuração de septo e úlcera em pirâmide nasal causando desfiguração facial (Figura 8).



Figura 8 - Paciente 2 do sexo masculino com leishmaniose mucosa grave do septo nasal com desfiguração facial.

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) foi maior que 5mm, o exame histopatológico apresentava infiltrado linfo-histioplasmocitário e imunofluorescência indireta com títulos maiores que 1:40, a pesquisa de amastigota em esfregaço e a inoculação em hamster positivos foram os critérios laboratoriais usados para diagnóstico e recidivas.

O referido paciente, devido à perfuração de palato mole e impossibilidade de alimentar-se pela boca foi submetido à gastrostomia com alimentação por sonda nasogástrica e necessitou de prótese de palato, para conforto respiratório e alimentar (Figura 9).



Figura 9 - Paciente 2 com LCM: ajuda de prótese para evitar desconforto respiratório e permitir a alimentação oral.

5.2.3. Tratamento

O tratamento foi iniciado com antimônio pentavalente, seguido de anfotericina B convencional, pentamidina, anfotericina B lipossomal isolada e associada ao antimônio, aminosidina, itraconazol, associação antimônio e talidomida seguindo esquemas de tratamento preconizados pelo Ministério da Saúde e os referidos na literatura. Também foi usado 2mg/kg/dia durante 42 dias de miltefosina. (Quadro 4)

Quadro 4 - Tratamento realizado pelo paciente 2 durante período de 23 anos no Hospital Universitário de Brasília, Brasil.

Droga	Dose/Dia	Duração	Ano	Evolução/Resultado
antimoniato de meglumina	20mgSbV/kg	20 dias	1987	cura clínica
antimoniato de meglumina	20mgSbV/kg	20 dias	1988	cura clínica
antimoniato de meglumina	20mgSbV/kg	20 dias	1991	cura clínica
anfotericina B lipossomal	3 mg/kg (total 4050 mg)	28 dias	1992	cura clínica. aumento de creatinina [1,8 mg/dl (0,6-1,3)] e de potássio [5,5 mmol/l (3,5-5,0)]
sulfato de aminosidina	16 mg/kg (1º. Ciclo)	25 dias	1993	melhora clinica
sulfato de aminosidina	16 mg/kg (2º. Ciclo)	25 dias	1993	cura clínica ganho ponderal de 5kg.
sulfato de aminosidina	16 mg/kg	25 dias	1994	cura clínica com cicatrização completa da úlcera nasal.
pentamidina	4 mg/kg/48h	10 aplicações	1995	cura clínica
itraconazol + alopurinol	200 mg 15 mg/kg	15 dias	1996	sem melhora
antimoniato de meglumina + alopurinol	20 mgSbV/kg 15mg/kg	30 dias 20 dias	1996	cura clínica
antimoniato de meglumina + pentoxifilina	20 mgSbV/kg 1200mg	30 dias	1998	melhora clínica, suspenso devido prurido generalizado.
sulfato de aminosidina	16 mg/kg	25 dias	1999	cura clínica
antimoniato de meglumina + talidomida	20 mgSbV/kg 200mg	30 dias	2000	cura clínica
antimoniato de meglumina	20 mgSbV/kg	30 dias	2002	melhora clínica
anfotericina B lipossomal	1 mg/kg (total dose	90 dias	2002	cura clínica

	2,1g)			
Leishvacin	1 dose por semana	13 semanas	2004	melhora do eritema e infiltração das lesões
anfotericina B lipossomal + antimoniato de meglumina	1mg/kg (2g)/20mg SbV/kg	40 dias	2005	melhora clínica
Leishvacin	1 dose por semana)	7 semanas	2006	melhora clínica
antimoniato de meglumina + pentoxifilina	7mg/SbV/kg 1200 mg	14 dias	2007	suspensão por elevação do QTc (0,5 segundos). Sem melhora
miltefosina	2mg/kg	49 dias	2007	cura clínica
miltefosina	2mg/kg	14 dias (1º. Ciclo) 14 dias (2º. Ciclo)	2009/ 2010	recidiva após 2 anos e 5 meses de tratamento com miltefosine. interrompido no 14 dia devido náuseas, vômitos. Após 1 mês, cura clínica e negatificação dos exames
miltefosina + anfotericina B lipossomal	2mg/kg + 1mg/kg	30 dias 3 x por semana	2011	recidiva após 6 meses. Acompanhamento no Hub

Durante todo o tratamento o paciente recebeu avaliação semanal com hemograma, provas de função hepática, renal e eletrocardiograma.

Após um mês de uso de miltefosina foi constatado diminuição da infiltração da mucosa do septo nasal, palato, orofaringe, epiglote, cartilagens aritenóides e traquéia. O exame histopatológico das lesões, a inoculação em hamster e a cultura foram realizados antes e 3 meses após o tratamento. Antes do início, a cultura e inoculação foram positivas e havia presença de infiltrado linfo-

histioplasmocitário. Após 3 meses do tratamento, a cultura, a inoculação em hamster foram negativos e houve regressão parcial do infiltrado inflamatório, bem como negatização do título de imunofluorescência indireta (Figura 10).



Figura 10 - Paciente 2 com Leishmaniose mucocutânea: (a) infiltração do palato duro e mole; redução do espaço aéreo – 1^o ciclo com miltefosina. (b) Melhora progressiva da infiltração em palato mole – 2^o ciclo com miltefosina. (c) Resposta clínica 3 meses após tratamento – mucosa sem infiltração, orofaringe livre de lesão.

5.3 Ensaio *in vitro*

5.3.1 Determinação da curva de crescimento

A curva de crescimento foi realizada para avaliar o período em que ocorre maior presença de formas promastigotas pró-cíclicas (fase log), até o início da fase estacionária, considerada mais infectante devido à maior concentração de formas promastigotas metacíclicas (Bogdan, 1990). A fase log corresponde à intensa reprodução do parasito que em geral se apresenta mais arredondado, porém com baixa motilidade. A fase estacionária, com promastigotas metacíclicas, formas mais afiladas, com baixa divisão e maior motilidade, é a fase com formas mais infectantes para o hospedeiro mamífero (Killick-Kendrick et al. 1974).

Neste ensaio foi possível demonstrar que o comportamento do crescimento das formas promastigotas dos isolados dos pacientes com LCD e LCM foi significativamente diferente dos seus respectivos controles. As formas

promastigotas de *L.(L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD (Figura 11) alcançaram a fase metacíclica em um tempo significativamente menor (4º dia) que seu respectivo controle (6º dia).

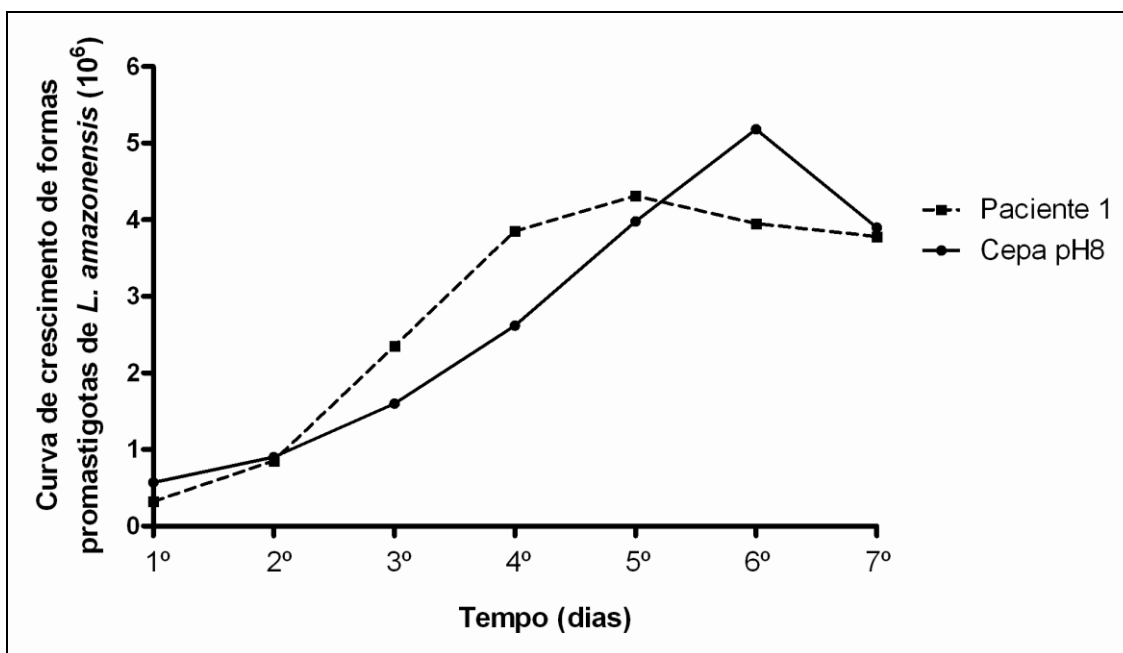


Figura 11 - Distribuição das médias do número de promastigotas de *L. amazonensis* controle e de *L. (L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). Diferença estatística no crescimento do isolado do paciente no 4º dia ($p < 0,0001$) e para o controle no 6º dia ($p < 0,0001$).

Já as formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis* isoladas do paciente com LCM (Figura 12) tiveram também crescimento significativamente diferente do seu controle, não alcançando crescimento adequado, nem chegando à fase metacíclica no período avaliado (7 dias), o que impossibilitou a realização dos testes *in vitro* de ação das diferentes drogas para este isolado. A cepa controle atingiu a fase metacíclica no 5º dia.

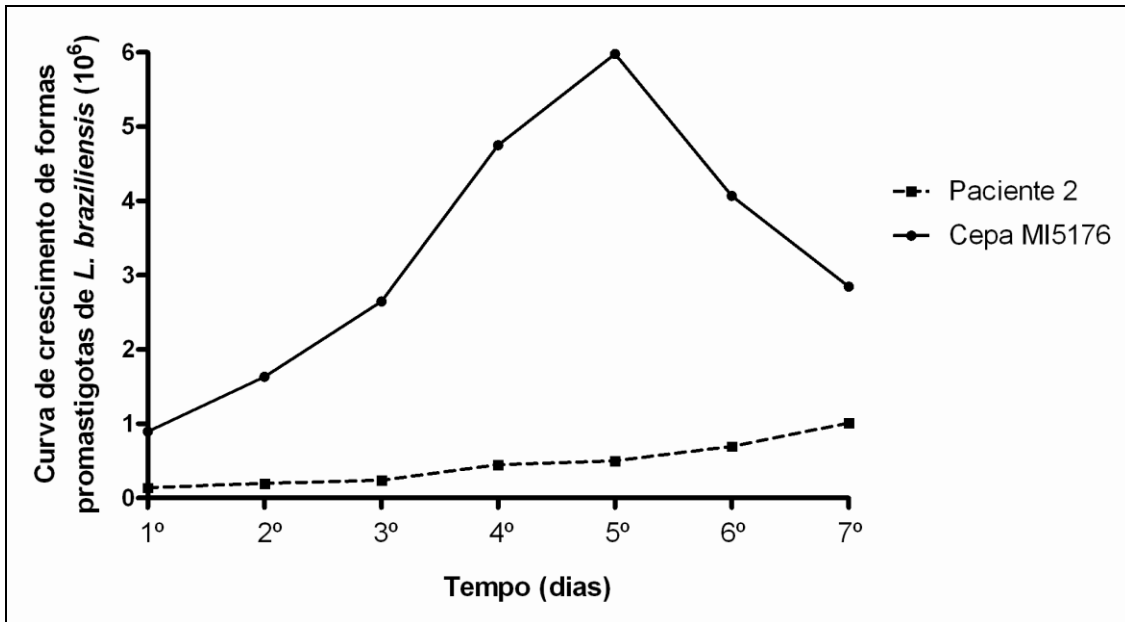


Figura 12 - Distribuição das médias do número de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* controle e *L. (V.) braziliensis* isoladas do paciente com LCM, segundo o tempo de crescimento das culturas (dias). Diferença estatística no crescimento da cepa controle no 4^o, 5^o e 6^o dia ($p < 0,05$).

5.3.4 Capacidade fagocitária em macrófagos

Para o índice fagocitário não houve diferença estatística quando comparados o isolado do paciente com LCD e a respectiva cepa controle ($p=0,0006$). Porém, quando realizada uma análise multivariada, a cepa isolada do paciente 1 apresentou um aumento progressivo do índice fagocitário em função do tempo, com $p < 0,05$ pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto a cepa padrão mostrou um declínio do índice fagocitário após 5 horas (Figura 13a). Já para a ingestão de *L. (L.) amazonensis* por macrófagos, os resultados demonstram que houve aumento significativo, com variação da mediana em 3 horas ($p < 0,05$) para o isolado do paciente e em 5 horas ($p < 0,05$) para a cepa controle (Figura 13b). O percentual de parasitos envolvidas na fagocitose também aumentou, com variação da mediana em 3 horas ($p < 0,05$), em 5 horas ($p < 0,05$) e em 8 horas ($p < 0,05$) (Figura 13c). Nos demais tempos não houve influência de formas ingeridas por macrófagos, nem no percentual de células envolvidas na fagocitose.

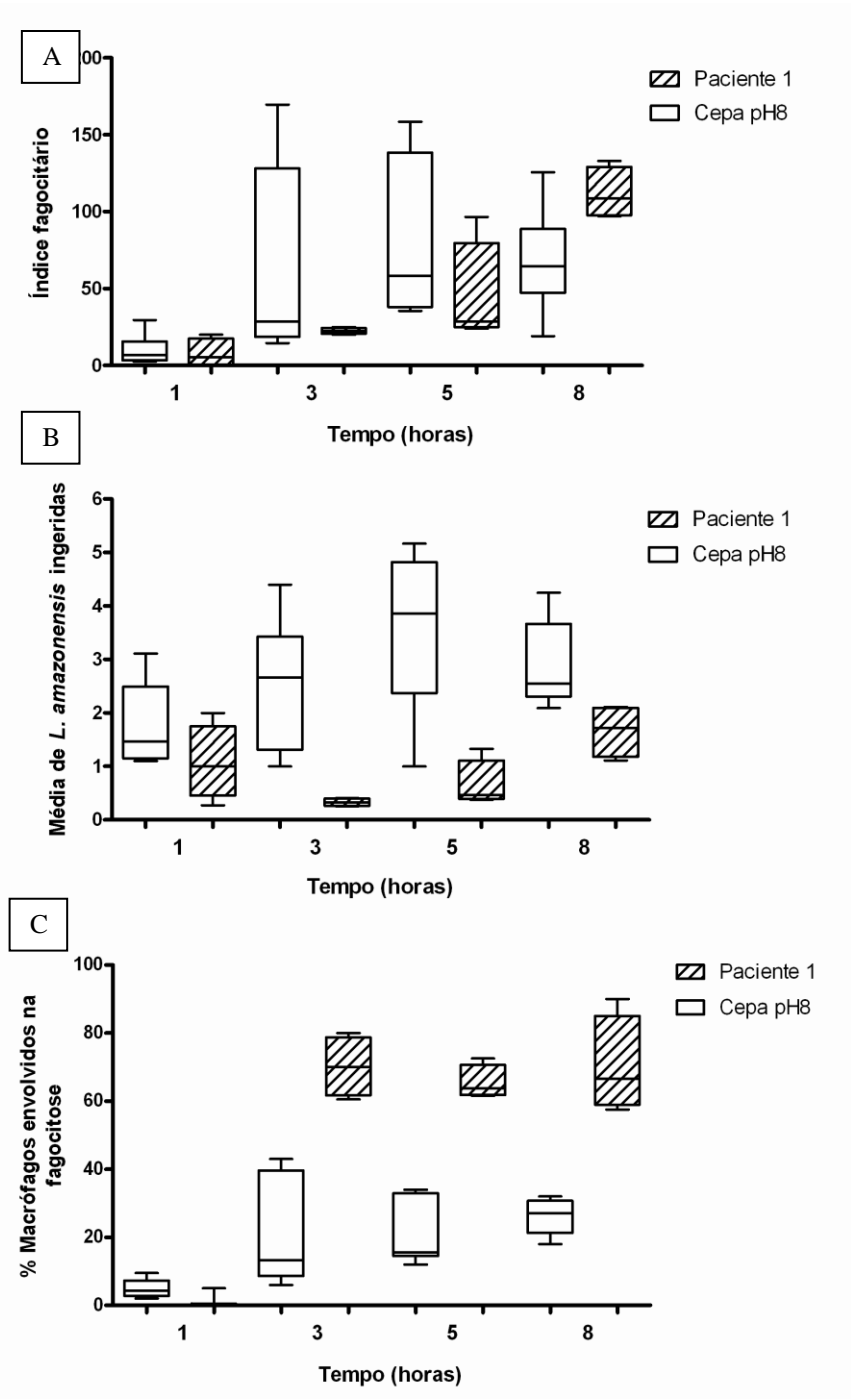


Figura 13 - (A) Índice Fagocitário; (B) Média de formas amastigotas ingeridas por macrófagos peritoneais de camundongos; (C) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose.

5.3.5. Ação e comparação de diferentes drogas sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

A ação de antimoniato de meglumina, miltefosina, pentoxifilina, anfotericina B lipossomal, itraconazol e alopurinol sobre cultivos de *L. (L.) amazonensis* foi avaliada comparando-se o crescimento da cepa controle do parasito e cepa isolada do paciente, incubadas com diferentes concentrações das drogas mencionadas acima. Alguns resultados não mostraram redução significativa do número de protozoários incubados com as diferentes concentrações dessas medicações em formas promastigotas de *Leishmania* como podem ser observados a seguir.

5.3.6 Comparação da ação do antimoniato de meglumina em cultivos de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

Os resultados mostraram que todas as concentrações do antimoniato de meglumina (0 até 3000µg/mL) não causaram redução significativa ($p=0,09$) do número de promastigotas em relação ao grupo controle, após a incubação por 48h (Figura 14). Na análise desses resultados não foi possível calcular a concentração capaz de inibir no mínimo 50% das formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

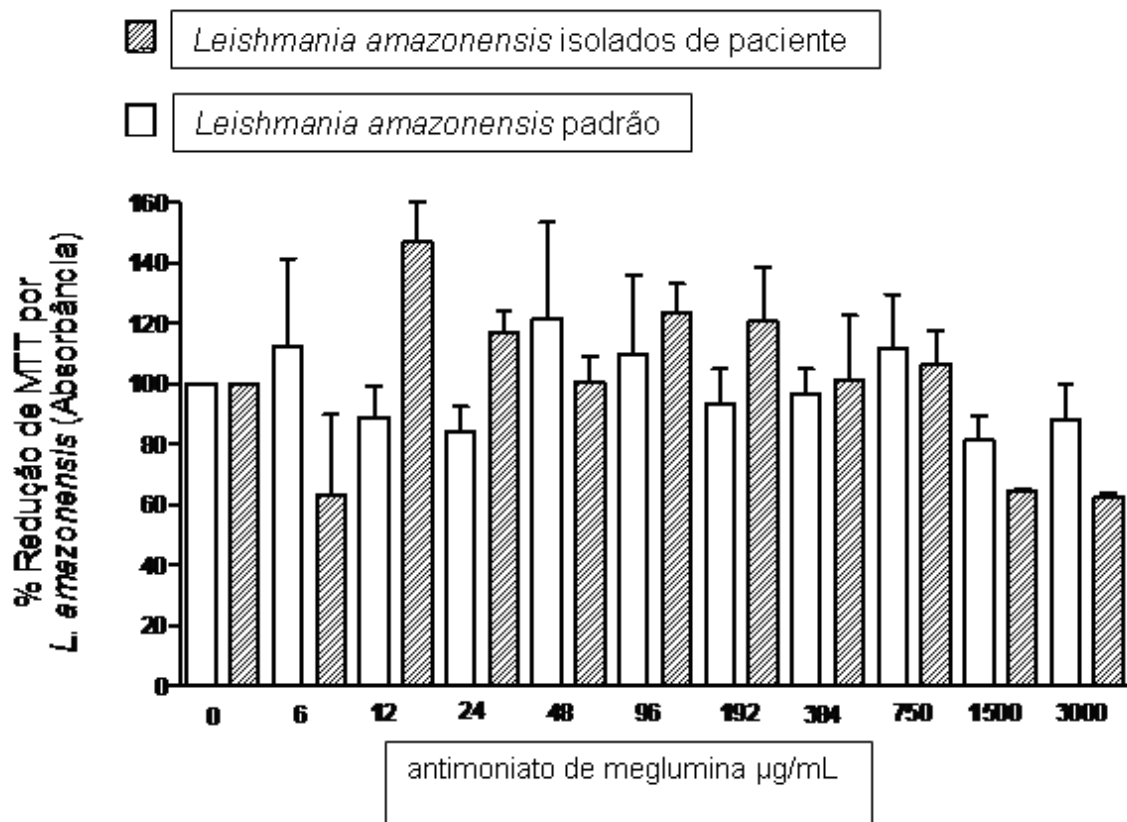


Figura 14 - Efeito de diferentes concentrações de antimoniato de meglumina sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste de ANOVA, $p=0,09$.

5.3.7. Ação e comparação da anfotericina B lipossomal sobre cultivos de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

Quando avaliada a ação da anfotericina B lipossomal nas concentrações testadas (0 até 3000µg/mL) observou-se que não houve redução significativa do número de promastigotas de *L. amazonensis* ($p=0,55$), em relação ao controle. Após a incubação por 48h (Figura 15). Não foi possível determinar a concentração capaz de inibir no mínimo 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

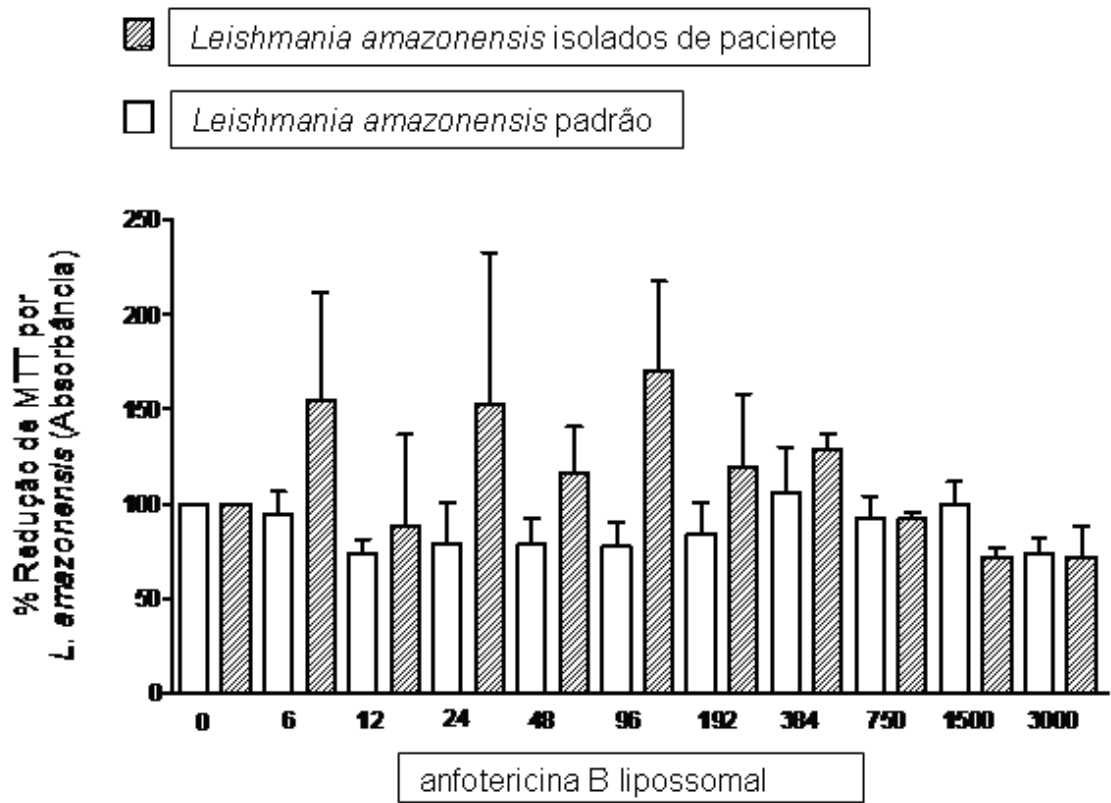


Figura 15 - Efeito de diferentes concentrações da anfotericina B lipossomal sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste de ANOVA, $p=0,55$.

5.5.3. Ação e comparação da pentoxifilina sobre cultivos de formas de *L. (L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

Foram utilizadas as mesmas concentrações testadas para as demais drogas (0 até 3000µg/mL) para avaliar a ação da pentoxifilina. Não houve redução significativa ($p=0,33$) do número de promastigotas, em relação ao grupo controle. Após a incubação por 48h (Figura 16). A concentração capaz de inibir no mínimo 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não foi calculada.

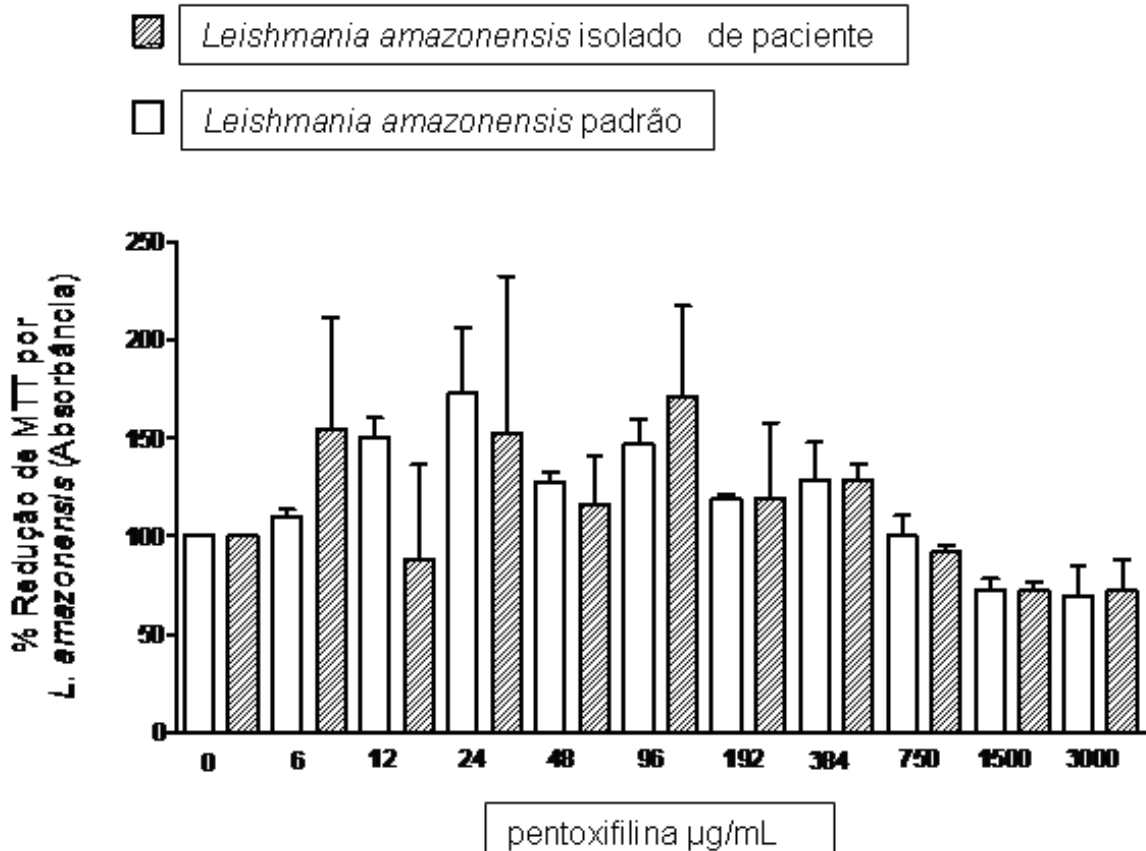


Figura 16 - Efeito de diferentes concentrações de pentoxifilina sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p=0,3$.

5.3.9 Ação e comparação do itraconazol sobre formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

A droga itraconazol foi testada nas concentrações de 0 até 3000µg/mL e observou-se que não houve redução significativa do número de promastigotas ($p=0,55$) em relação ao grupo controle, após a incubação por 48h (Figura 17). Não foi possível determinar a concentração capaz de inibir no mínimo 50% das formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

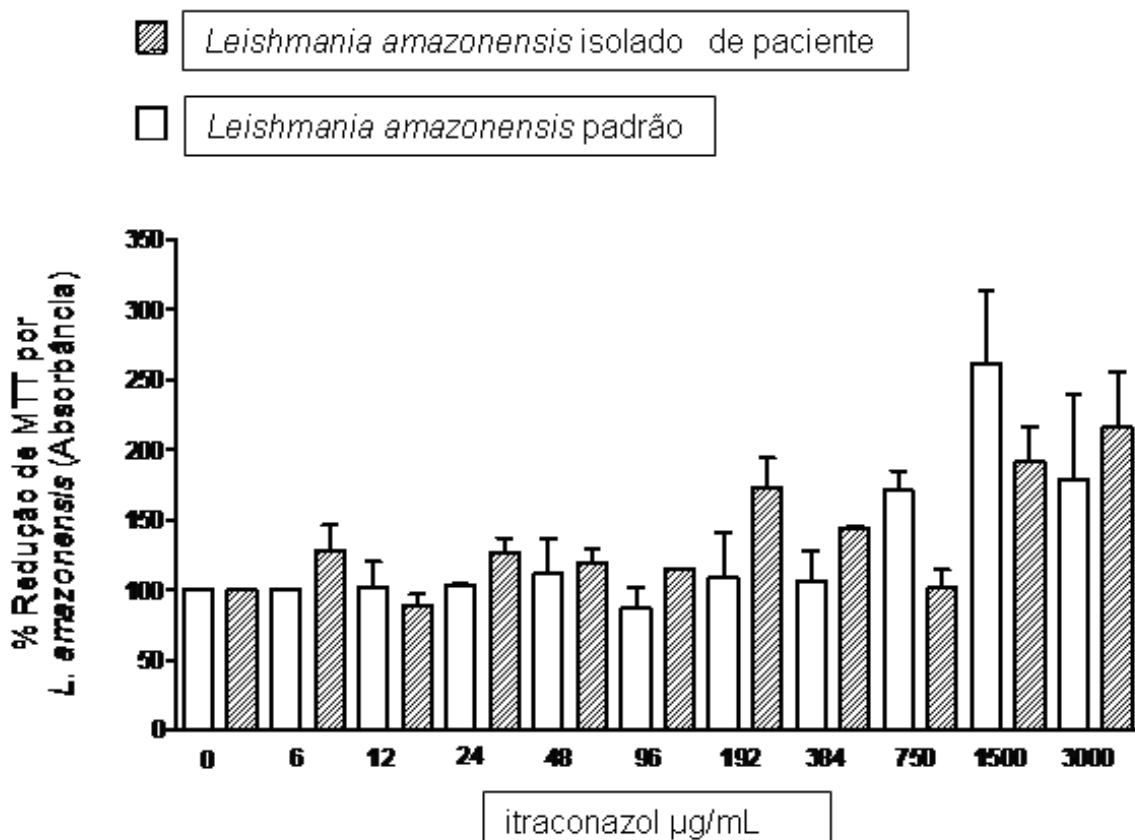


Figura 17 - Efeito de diferentes concentrações de itraconazol sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p=0,55$.

5.3.10 Ação e comparação do alopurinol sobre de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

Para o alopurinol também foram testadas as concentrações de 0 até $3000\mu\text{g/mL}$. Na análise pelo teste de ANOVA, observou-se diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$), após incubação por 48h (figura 18). A concentração capaz de inibir no mínimo 50% das formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* não foi calculada.

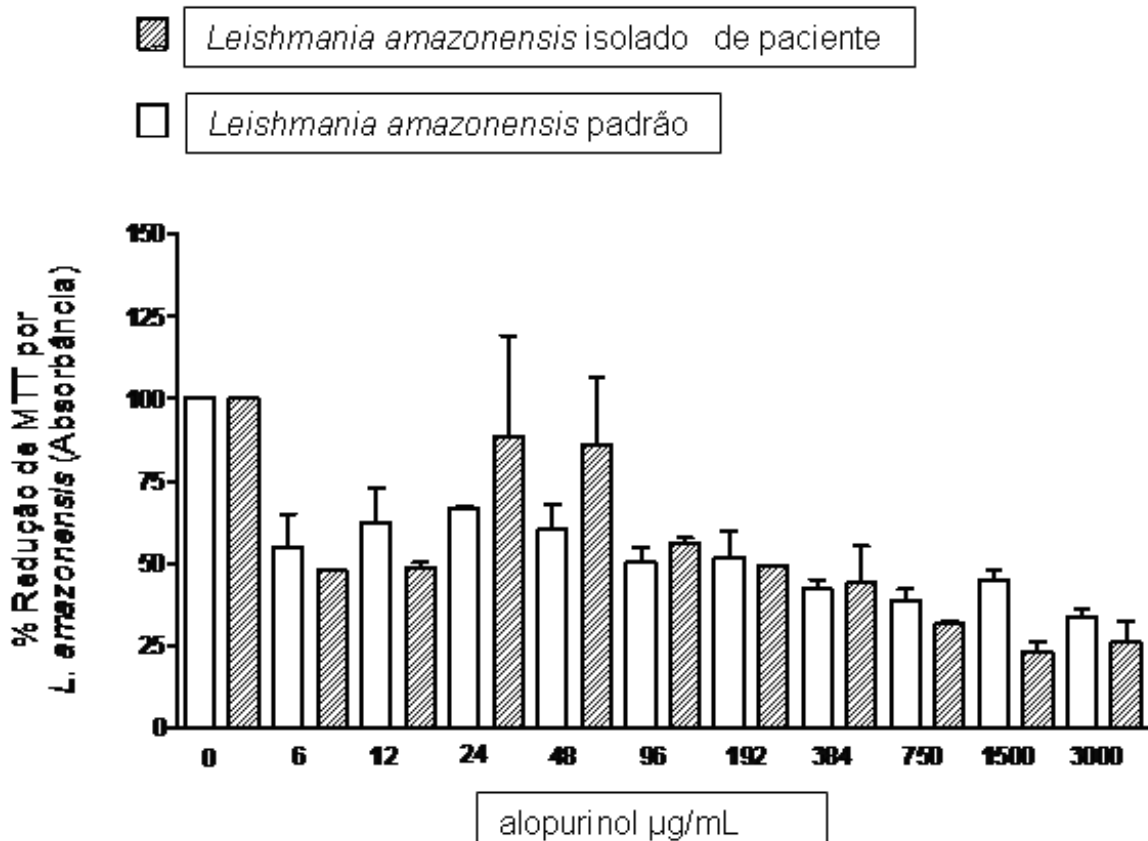


Figura 18 - Comparação do efeito de diferentes concentrações do alopurinol sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p < 0,05$.

5.3.11 Ação e comparação da miltefosina sobre formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

Para as concentrações do miltefosina (0 até 3000µg/mL) observou-se a redução significativa ($p < 0,05$) do número de promastigotas em relação ao grupo controle após a incubação por 48h (Figura 19). A concentração capaz de inibir no mínimo 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não foi calculada.

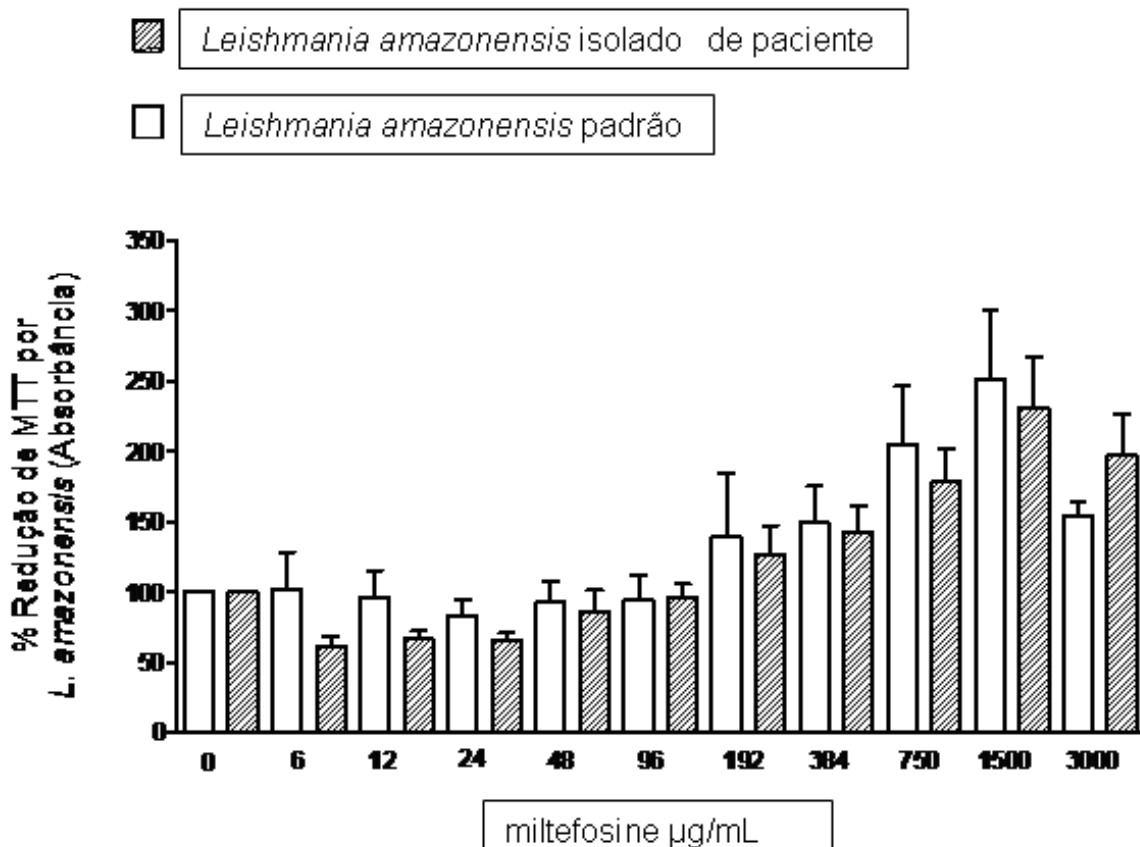


Figura 19 - Efeito de diferentes concentrações de miltefosina sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L. amazonensis* padrão e *L. amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p < 0,05$.

5.3.12 Ação e comparação do antimoniato de meglumina, da anfotericina B lipossomal e da miltefosina sobre formas amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* padrão e de cepa isolada de paciente com LCD.

A ação de antimoniato de meglumina, anfotericina B lipossomal e miltefosine sobre cultivos de formas amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* foi avaliada verificando-se o crescimento da cepa controle do parasito e cepa isolada do paciente incubada com diferentes concentrações das drogas mencionadas acima. Alguns resultados não mostraram redução significativa do

número de protozoários incubados com as diferentes concentrações dessas medicações em formas amastigotas axênicas como pode ser observado a seguir.

5.3.12.1 Ação e comparação do antimoniato de meglumina sobre formas amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* isolada de paciente com LCD e respectiva cepa controle.

Os resultados mostraram que todas as concentrações do antimoniato de meglumina (0 até 50 μ g/mL) não causaram redução significativa ($p > 0,05$) do número de formas amastigotas quando comparados com grupo controle. Quando as doses foram comparadas na mesma espécie, o isolado do paciente apresentou diferença ($p < 0,001$) nas doses 1,6 μ g/mL e 3,1 μ g/mL. Já entre as doses em que a cepa controle foi submetida, não houve diferença estatística (Figura 20).

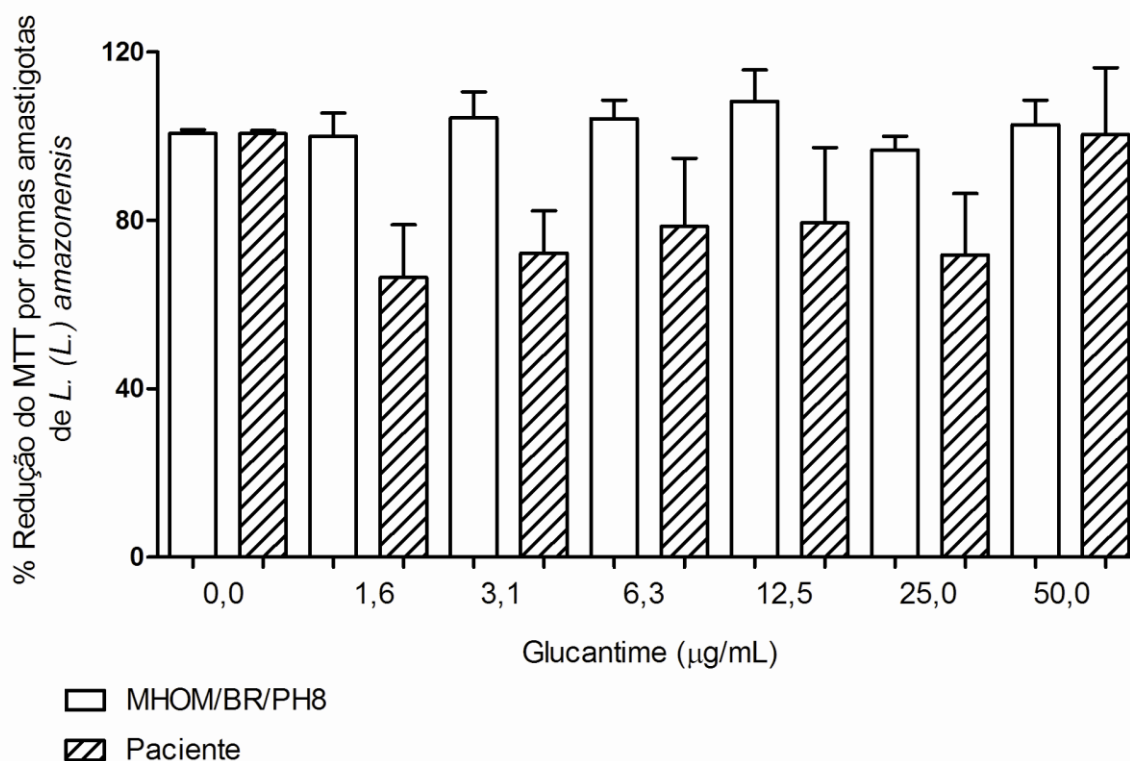


Figura 20 - Efeito de diferentes concentrações de antimoniato de meglumina sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* padrão e de *L. (L.) amazonensis* isolada de paciente com LCD, (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p > 0,05$.

5.3.12.2 Comparação da ação da anfotericina B lipossomal sobre formas amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* isolada de paciente com LCD e respectiva cepa controle.

Quando avaliada a ação da anfotericina B lipossomal nas concentrações acima testadas (0 até 50µg/mL) observou-se a redução significativa ($p < 0,05$) do número de amastigotas, em relação ao grupo controle. Quando comparados entre as doses da cepa controle foi observado diferença ($p < 0,001$) entre as diferentes doses, exceto para as doses de 6,3µg/mL e 50µg/mL. Já entre as doses do isolado do paciente não houve diferença estatística (Figura 21).

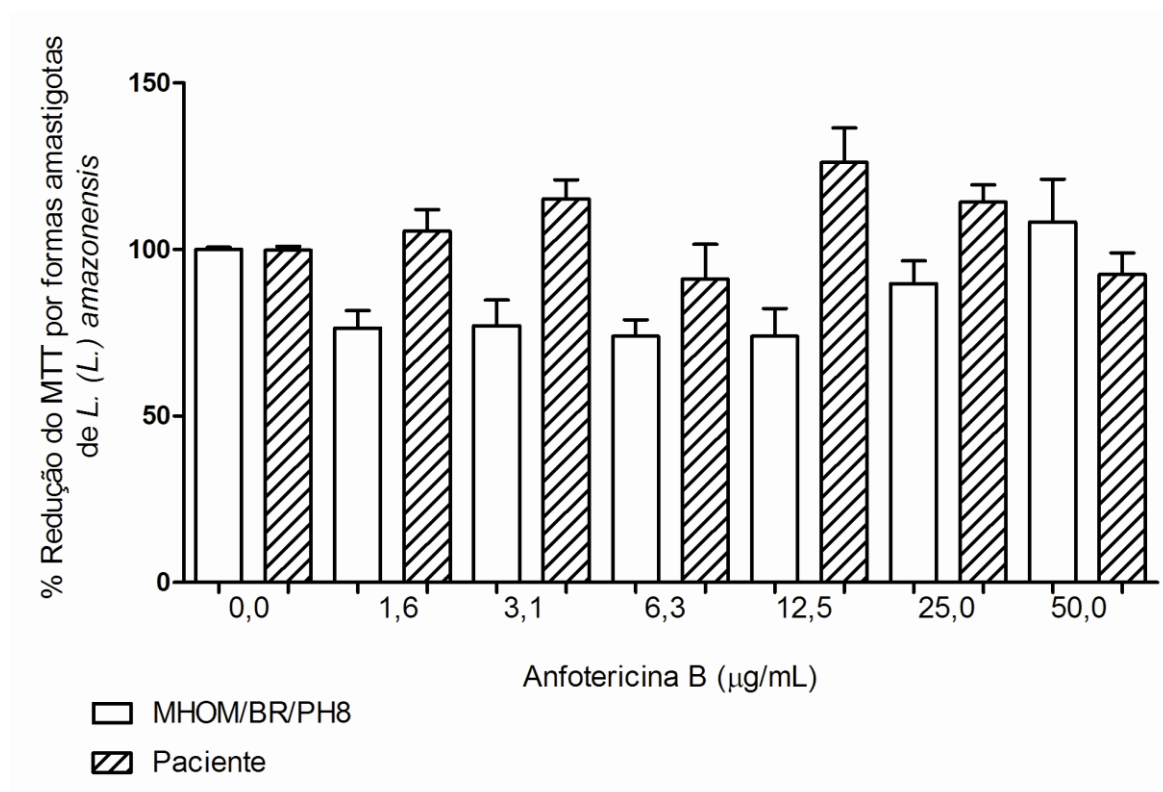


Figura 21 - Efeito de diferentes concentrações da anfotericina B lipossomal sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.amazonensis* padrão e *L. amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p < 0,05$.

5.3.12.3 Comparação da ação da miltefosina sobre formas amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD e respectiva cepa controle.

Para as concentrações do miltefosina (0 até 50 μ g/mL) observou-se a redução significativa ($p < 0,05$) do número de amastigotas em relação ao grupo controle. Quando comparada a ação das doses da miltefosina entre si sobre a cepa controle foi observado diferença ($p < 0,001$) entre as diferentes doses. (Figura 22).

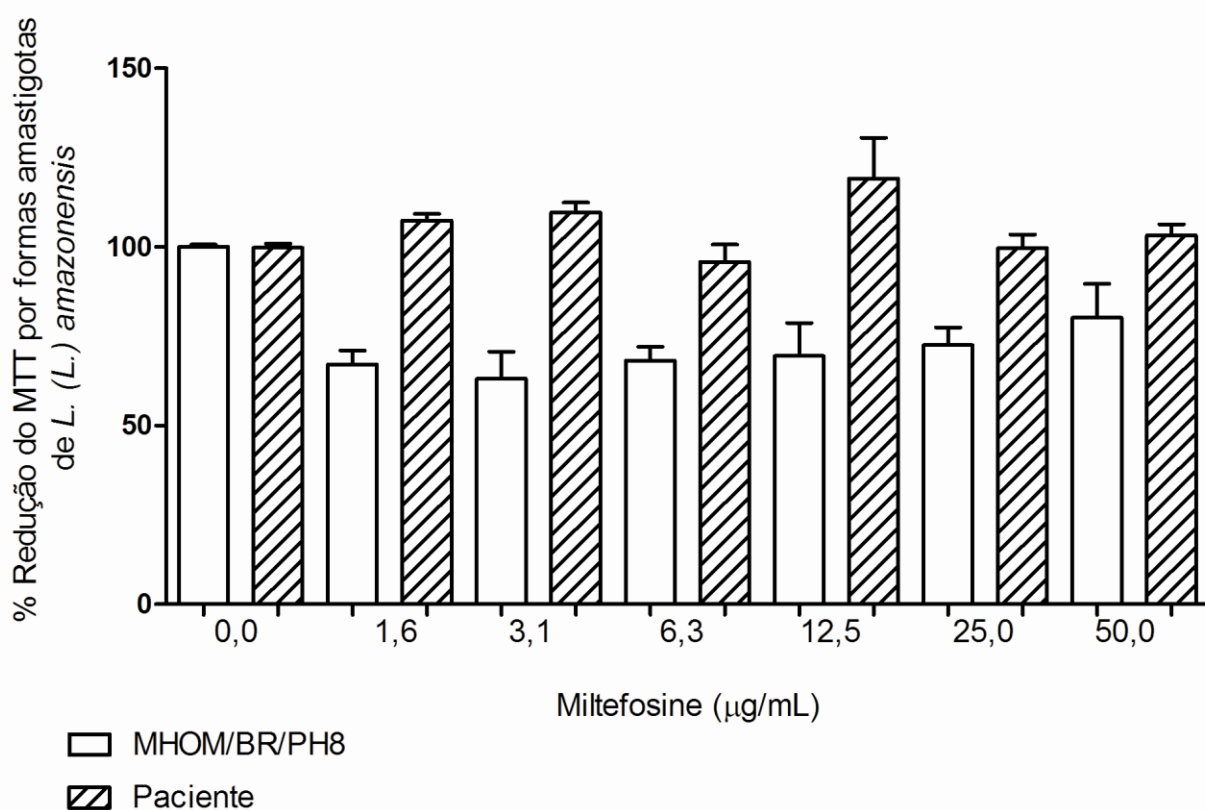


Figura 22 - Efeito de diferentes concentrações de miltefosina sobre o percentual de redução de MTT a cristais de formazan medido em absorbância (570nm), em cultivos de formas promastigotas de *L.amazonensis* padrão e *L. amazonensis* isolada do paciente com LCD (10^6 /mL). Teste ANOVA, $p < 0,05$.

5.4 Identificação e caracterização de proteínas dos isolados de pacientes infectado por *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* e, comparação com seus respectivos controles.

A identificação de proteínas foi realizada por cromatografia líquida (*online*) acoplada à espectrometria de massa e os resultados dos íons obtidos nos modos MS e MS/MS caracterizados automaticamente, pelo *software* “Protein Lynx”, para a determinação da sequência e identificação de moléculas bioativas ou ligantes (*hit*).

As proteínas foram extraídas de massas parasitárias de *Leishmania* isoladas de pacientes, um portador de LCD e outro de LCM, e seus respectivos controles. A digestão foi realizada com tripsina. Foram utilizados dois banco de dados, obtidos do NCBI, um contendo apenas proteínas específicas da *Leishmania* estudada e outro com *Leishmania* spp.

Para facilitar a compreensão das tabelas abaixo, nas quais constam as proteínas identificadas a partir de dados coletados por espectrometria de massa (Apêndice), seus possíveis envolvimento em vias bioquímicas ou funções biológicas é importante saber a quais categorias funcionais elas pertencem.

Relação abaixo:

- Chaperonas: proteínas de choque térmico, peptidil-prolil cis-trans isomerase;
- Citoesqueleto e Movimentação: proteínas associadas a microtúbulos e microfilamentos;
- Metabolismo de lipídios: proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios;
- Metabolismo: proteínas envolvidas em oxi-redução, metabolismo de proteínas e açúcares;
- Proteinases: carbóxi-peptidases, proteínas do complexo ubiquitinaproteossomo, proteinases de forma geral;
- Proteínas de superfície: trans-sialidases, gp63;

- Proteínas de membrana e Transportadores: proteínas de membrana plasmática ou de organelas, transportadores de moléculas localizados na membrana plasmática ou membrana de organelas;
- Replicação, Reparo, Transcrição e Processamento de RNA: proteínas envolvidas com a replicação e reparo do DNA e kDNA, transcrição de RNA, processamento do transcrito primário, proteínas associadas à cromatina, edição de RNA, histonas, proteínas ligadoras de RNA, proteínas nucleolares;
- Sinalização: GTPases, proteína-cinases, proteína-fosfatases;
- Tradução e proteínas ribossômicas: proteínas associadas à tradução, proteínas ribossômicas;
- Proteínas hipotéticas: proteínas assim denominadas pela anotação realizada pelo consórcio TIGR/SBRI/Karolinska (TSK), pois não apresentaram homólogas;
- Proteínas hipotéticas conservadas: proteínas assim denominadas pelo consórcio TSK, pois foram encontradas homólogas em outros organismos, principalmente em *T. brucei* e *L. major*.

5.4.1 Identificação de proteínas de *L.(V.) braziliensis* isolada de paciente portador de LCM e cepa de *Leishmania* controle.

No estudo comparativo por abordagem proteômica de *L.(V.) braziliensis* controle pelo software “Protein Lynx” utilizando o banco de dados de *L.(V.) braziliensis* foram identificados 20 *hits* e 72 proteínas (Tabela 3).

Tabela 3 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* controle por análise realizada com o software “Protein Lynx” utilizando o banco de dados de *L.(V.) braziliensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
beta tubulin <i>L. braziliensis</i>	134065196	49711	4,5205	11649,47	25	30	53,2731	0	0
alpha tubulin <i>L. braziliensis</i>	322504442	49651	4,7051	5993,062	20	34	52,7716	0	0
putative 40S ribosomal protein S15 <i>L. braziliensis</i>	134061998	17447	10,5645	2086,292	2	9	30,9211	33,1405	0,5786
putative 60S Ribosomal protein L36 <i>L. braziliensis</i>	134061825	11955	11,8213	1586,634	5	9	37,1429	26,353	0,3153
putative heat shock protein hsp70 <i>L. braziliensis</i>	134063644	71231	5,2397	1572,809	30	48	52,2936	72,3587	5,1575
heat shock protein 83 1 <i>L. braziliensis</i>	154343720	80611	4,8867	1023,747	15	67	28,9773	83,7245	6,7535
elongation factor 1 alpha <i>L. braziliensis</i>	154335074	49040	9,2021	544,2447	14	38	40,5345	0	0
elongation factor 2 <i>L. braziliensis</i>	134065995	94187	5,707	328,199	19	70	33,2544	17,5193	1,6512

putative small GTP binding protein Rab1 L. braziliensis	134063162	22267	5,3672	299,6804	6	18	35	27,7205	0,6177
40S ribosomal protein S14 L. braziliensis	134063453	15655	10,5454	274,526	4	12	38,8889	0	0
putative heat shock protein DNAJ L. braziliensis	134063332	43404	7,4663	105,6571	9	37	22,9798	9,9449	0,4319
ATPase alpha subunit L. braziliensis	134059187	62576	9,9697	88,4054	8	40	12,1951	30,3553	1,9007
putative 60S ribosomal protein L18a L. braziliensis	134064786	20739	10,5718	87,9436	1	14	6,7039	6,6389	0,1378
putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor L. braziliensis	134064193	70484	5,8301	74,5545	9	59	16,4363	32,3849	2,2841
putative transitional endoplasmic reticulum ATPase L. braziliensis	134066112	87230	5,0991	68,7429	19	71	29,6815	11,0576	0,9652
conserved hypothetical protein L. braziliensis	134059720	114066	6,2842	66,391	15	69	22,719	2,018	0,2303

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= "Protein Lynk Global Server" score, peptides= n° de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

No estudo comparativo por abordagem proteômica de *L.(V.) braziliensis* controle pelo *software* "Protein Lynx" utilizando o banco de dados de *Leishmania spp* foram identificados 63 *hits* e 1109 proteínas (Tabela 4).

Tabela 4 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* controle por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania spp*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
alpha tubulin <i>L. infantum</i>	321399185	54146	4,9116	17375,59	28	37	42,449	363,0164	19,6688
beta tubulin <i>L. major</i>	68224035	49767	4,5205	13911,53	31	30	45,3725	0,2609	0,013
heat shock protein 83 1 <i>L. mexicana</i>	322494527	80521	4,8486	6447,327	25	71	34,6648	0	0
ribosomal protein S15 <i>L. major</i>	157869287	17424	10,5645	4796,442	1	9	10,5263	0	0
tryparedoxin peroxidase <i>L. donovani</i>	145411494	22035	6,936	4767,966	17	17	67,3367	112,698	2,4849
putative heat shock protein hsp70 <i>L. mexicana</i>	322493365	71196	5,1724	4281,186	33	49	37,0031	80,2069	5,7141
tryparedoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	61619791	22002	7,6318	3849,68	18	17	85,9296	5,6841	0,1251
putative transaldolase <i>L. mexicana</i>	322489994	36952	6,0996	3697,759	8	24	31,8182	99,0502	3,6626
tryparedoxin peroxidase <i>L. mexicana</i>	322489864	22196	6,3486	3449,727	12	17	53,2663	2,5879	0,0575
elongation factor 1 alpha <i>L. mexicana</i>	322490098	49175	9,2021	3149,605	24	38	38,7528	0	0
putative 60S ribosomal protein L18 <i>L. mexicana</i>	322489486	22093	12,041	2859,635	6	11	28,2828	0	0
tryparedoxin peroxidase <i>L. infantum</i>	134068535	22166	6,939	2827,727	9	17	37,6884	0	0
putative transaldolase <i>L. major</i>	68125607	36939	5,2632	2469,766	9	22	28,4848	8,0062	0,2959
histone H4 <i>L. mexicana</i>	322490580	11371	10,9878	2365,392	7	9	46	0	0
promastigote surface antigen PSA 38S <i>L. amazonensis</i>	264665726	38526	4,4927	2292,876	7	18	30,7278	56,5555	2,1803
ribosomal protein L36 <i>L. infantum</i>	146101024	11918	11,688	1861,522	3	8	18,0952	0	0
putative hexokinase <i>L. mexicana</i>	322491502	51637	8,6353	1218,386	9	36	21,6561	0	0
putative hexokinase <i>L. mexicana</i>	322491501	60872	9,0483	1218,386	10	38	22,1429	10,3397	0,6298
histone H2B <i>L. major</i>	68124602	12221	11,6616	1070,778	5	12	23,4234	0	0

promastigote surface antigen PSA 31S <i>L. amazonensis</i>	264665722	32107	4,3843	763,2507	6	15	31,1688	0	0
glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase glycosomal <i>L. mexicana</i>	322493686	39098	9,4336	587,9641	10	30	25,4848	0,5488	0,0215
putative polyubiquitin <i>L. mexicana</i>	322488997	14619	10,1104	467,5568	6	10	39,8438	18,8039	0,2751
elongation factor 2 <i>L. major</i>	68129663	94072	5,6836	465,5716	14	70	22,0118	0	0
putative histone H2A <i>L. mexicana</i>	322488607	13951	11,3877	456,7223	3	8	21,9697	0	0
ribosomal protein L10a <i>L. major</i>	157867831	24513	9,9668	347,0898	3	17	10,2804	0	0
unnamed protein product <i>L. donovani</i>	322503495	86764	5,0156	267,8329	13	70	16,8367	16,0061	1,3896
surface antigen like protein <i>L. mexicana</i>	322488005	51826	4,2129	257,7871	4	21	18,1818	0	0
putative cystathione gamma lyase <i>L. infantum</i>	134073502	44498	6,3208	200,4554	10	21	25,4279	0	0
ribosomal protein I21 <i>L. infantum</i>	146082526	17979	10,9292	193,1934	4	15	20,7547	0	0
putative kinesin <i>L. major</i>	68125681	246730	3,9316	184,9351	10	166	7,3106	0,1907	0,0471
activated protein kinase c receptor LACK <i>L. major</i>	68127629	34377	6,0469	169,4424	6	25	26,2821	0	0
putative heat shock protein DNAJ <i>L. infantum</i>	134070836	43619	7,3931	166,7491	6	36	12,6263	0	0
ribosomal protein S2 <i>L. infantum</i>	146092851	28740	9,8774	133,4681	3	25	13,9623	0	0
dehydrogenase <i>L. amazonensis</i>	37725959	29299	5,6338	126,3941	6	17	19,3431	8,1884	0,2401
hypothetical protein LINJ 10 1360 <i>L. infantum</i>	134067865	28208	6,3164	122,2755	3	22	31,3008	0,7759	0,0219
putative U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10 <i>L. major</i>	321438647	75461	4,6904	114,7565	7	62	19,2024	1,2293	0,0928
putative 40S ribosomal protein S4 <i>L. mexicana</i>	322489552	47264	10,2964	102,9487	7	38	13,2558	11,1655	0,5281
dehydrogenase <i>L. amazonensis</i>	155675712	29520	7,8252	101,5634	3	19	9,6085	3,7134	0,1097
putative kinesin K39 <i>L. infantum</i>	321399203	326163	4,2773	95,8278	22	395	8,0656	6,5401	2,1344
unnamed protein product <i>L.</i>	322501950	32806	4,8735	91,3053	2	25	23,7113	2,8034	0,092

donovani

RNA helicase L. major	157873697	66820	8,9839	86,106	5	57	11,7264	14,8068	0,99
putative aconitase L. major	68125911	97430	6,2095	75,3391	8	69	12,6116	10,6108	1,0345
chaperonin HSP60 mitochondrial precursor L. infantum	134074164	59320	5,1475	65,1671	10	50	23,1317	0	0
conserved hypothetical protein L. mexicana	322488746	60157	7,9922	63,0542	5	38	23,7847	7,2151	0,4343
putative DNA directed RNA polymerase III subunit L. major	68124575	27004	4,043	61,4386	1	11	11,4068	0,9135	0,0247
Leishmanolysin surface protease L. major surface glycoprotein	51317309	63012	6,9229	60,7043	8	37	20,7705	6,3641	0,4013
putative glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase L. major	321438489	58156	8,0039	58,2528	5	39	13,9048	0	0
putative heat shock protein L. mexicana	322490382	91896	4,897	53,1195	13	81	24,6659	7,0246	0,6459
conserved hypothetical protein L. major	68130184	52653	8,8447	51,3944	3	34	11,499	1,9322	0,1018
terbinafine resistance locus protein yip1 L. major	68126413	21004	5,0596	50,9379	1	11	26,455	0	0
conserved hypothetical protein L. mexicana	322493302	90875	6,5845	49,5706	7	63	13,4293	2,0061	0,1824
ligase like protein L. infantum	146084595	62837	6,5918	48,2425	8	48	14,9742	0	0
putative FtsJ cell division protein L. major	321438509	105115	6,7266	46,0642	8	76	17,7489	2,0102	0,2114
putative casein kinase II L. mexicana	322495417	42530	9,0264	44,4913	3	31	10,5121	222,3423	9,4625
elongation factor 1 gamma L. infantum	134067645	51542	5,8418	42,3149	3	34	7,7263	10,485	0,5408
glycosomal membrane protein L. infantum	134073547	24782	8,666	42,1061	3	19	12,4444	0	0
putative ATP dependent DEAD H RNA helicase L. mexicana	322488402	45901	6,5156	41,4747	3	29	14,4578	7,1855	0,33
iron zinc transporter protein like protein L. infantum	321398573	45377	5,6206	40,9592	1	19	11,5741	0	0

unnamed protein product L. donovani	322497504	67367	10,4209	40,2172	4	59	12,8368	4,2588	0,2871
conserved hypothetical protein L. infantum	134066887	58941	5,436	38,5981	3	40	15,8759	0	0

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= "Protein Lynk Global Server" score, peptides= nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

No estudo comparativo por abordagem proteômica de *L.(V.) braziliensis* isolada do paciente com LCM utilizando o *software* "Protein Lynx" com o banco de dados de *L.(V.) braziliensis* foram identificados 8 *hits* e 16 proteínas (Tabela 5).

Tabela 5 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* isoladas do paciente com LCM por análise realizada com o software “Protein Lynx” utilizando o banco de dados de *L.(V.) braziliensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
putative heat shock protein hsp70 <i>L. braziliensis</i>	134063644	71231	5,2397	1478,351	10	48	12,2324	18,2777	1,309
conserved hypothetical protein <i>L. braziliensis</i>	134066551	26888	6,3428	481,0433	5	12	42,0168	0,5483	0,0149
hypothetical protein <i>L. braziliensis</i>	154342965	20970	5,7876	402,2559	2	18	21,5054	1,3148	0,028
conserved hypothetical protein <i>L. braziliensis</i>	134060347	35548	5,4668	341,4988	4	26	17,3633	0	0
polyubiquitin <i>L. braziliensis</i>	154339611	119546	7,5469	227,3925	28	97	23,5955	13,1361	1,5728
putative calpain like cysteine peptidase <i>L. braziliensis</i>	322505165	560611	4,9146	69,9393	61	387	12,4095	4,6073	2,599

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= “Protein Lynk Global Server” score, peptides= nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

O estudo comparativo por abordagem proteômica de *L.(V.) braziliensis* isolada do paciente com LCM utilizando o software “Protein Lynx” com o banco de dados de *Leishmania spp* foram identificados 8 *hits* e 48 proteínas (Tabela 6).

Tabela 6 - Proteínas identificadas em *L.(V.) braziliensis* isoladas do paciente com LCM por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania spp*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
malate dehydrogenase L. major	68129178	33336	8,3804	982,5131	3	23	11,9874	0	0
shock protein 70 L. amazonensis	293061	20065	4,7813	971,1961	2	15	16,2162	0	0
shock protein 70 L. major	159356	56500	6,4658	874,0948	6	38	12,7907	0	0
putative viscerotropic leishmaniasis antigen L. major	68223711	135900	4,7578	528,3375	34	106	20,5004	111,9907	15,2992
putative microtubule associated protein L. major	68223726	206710	4,3403	291,1445	39	254	27,7625	1,1243	0,2327
putative polyubiquitin L. major	68130008	93930	7,6055	173,5952	11	76	11,828	13,1361	1,2354

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= “Protein Lynk Global Server” score, peptides= nº de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

5.7.2 Identificação de proteínas em *L.(L.) amazonensis* isolada de paciente portador de LCD e cepa de *Leishmania* controle.

Para a abordagem proteômica de *L.(L.) amazonensis* controle utilizando o software “Protein Lynx” com o banco de dados de *L.(L.) amazonensis* foram identificados 24 *hits* e 41 proteínas (Tabela 7).

Tabela 7 - Proteínas identificadas em *L.(L.) amazonensis* controle por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *L.(L.) amazonensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
cytosolic tryparedoxin peroxidase L.amazonensis	61619791	22002	7,6318	2385,94	35	17	91,9598	144,4391	3,18
soluble promastigote surface antigen PSA 38S L. amazonensis	264665726	38526	4,4927	2097,793	29	18	78,1671	98,9188	3,8135
soluble promastigote surface antigen PSA 31S L. amazonensis	264665722	32107	4,3843	1208,112	23	15	78,2468	1,5149	0,0487
soluble promastigote surface antigen PSA 34S L. amazonensis	264665718	34817	4,5322	1108,811	27	18	80,0604	10,6206	0,37
soluble promastigote surface antigen PSA 32S L. amazonensis	264665730	32900	4,2612	1037,422	23	14	61,9048	0	0
malate dehydrogenase L.amazonensis	155675712	29520	7,8252	843,4677	33	19	87,9004	22,8797	0,6758
heat shock protein 70 L. amazonensis	293057	71153	5,2998	717,3788	80	49	92,3313	14,3946	1,0249

Heat shock 70 kDa protein	729766	71153	5,2998	714,0771	80	49	92,3313	14,3946	1,0249
heat shock protein 70 L. amazonensis	293059	71096	5,2998	713,4019	80	49	87,1166	7,1911	0,5116
ADP ATP carrier L. amazonensis	28207692	35135	9,9932	541,7119	37	24	79,4953	27,0682	0,9517
Heat shock protein 83 Short HSP 83	123665	80533	4,8018	469,2401	97	70	81,5977	22,9677	1,8508
Histone H3 L. amazonensis	7544110	14510	11,4419	351,2299	17	13	83,7209	15,202	0,2207
elongation factor 1 L. amazonensis	1162937	10053	8,6118	322,6428	14	8	77,7778	11,6844	0,1175
52 kDa PDI L. amazonensis	116293933	52177	4,9556	318,3977	65	39	98,3087	15,6523	0,8172
actin L. amazonensis	242276402	42064	5,3833	273,8188	49	31	89,0957	16,7776	0,7062
heat shock protein 70 L. amazonensis	293061	20065	4,7813	221,4039	21	15	96,2162	14,6925	0,295
surface protein amastin L. amazonensis	2660758	19722	7,7783	210,5004	17	12	79,235	3,9383	0,0777
LACK L. amazonensis	21355057	34380	6,0469	182,1035	33	25	84,2949	0	0
RNA polymerase II large subunit L. amazonensis	2581912	48321	5,1006	123,6369	54	36	68,0095	2,6475	0,128

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= "Protein Lynk Global Server" score, peptides= n° de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

A abordagem proteômica de *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD utilizando o *software* "Protein Lynx" com o banco de dados de *Leishmania* spp foram identificadas 24 *hits* e 41 proteínas (Tabela 8).

Tabela 8 - Proteínas identificadas em *L.(L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania amazonensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
alpha tubulin L. major	68125071	49727	4,7051	14485,76	21	34	39,6896	0	0
beta tubulin L. major	68124450	49674	4,5439	12433,58	34	30	53,0474	0	0
tryparedoxin peroxidase L. donovani	145411494	22035	6,936	4290,906	14	17	41,206	129,2389	2,8497
tryparedoxin peroxidase L. mexicana	322489864	22196	6,3486	4148,123	13	17	40,201	3,071	0,0682
tryparedoxin peroxidase L. amazonensis	61619791	22002	7,6318	4144,725	12	17	30,6533	0	0
promastigote surface antigen PSA 38S L. amazonensis	264665726	38526	4,4927	3162,77	7	18	25,876	63,6274	2,453
histone H4 L. mexicana	322490580	11371	10,9878	2948,785	8	9	60	0	0
putative hexokinase L. mexicana	322491501	60872	9,0483	1974,495	12	38	24,2857	0	0
promastigote surface antigen PSA 31S L. amazonensis	264665722	32107	4,3843	1755,811	6	15	25,3247	0	0
heat shock protein 83 1 L. mexicana	322494527	80521	4,8486	1363,734	18	71	21,6833	0	0
putative heat shock protein hsp70 L. mexicana	322493365	71196	5,1724	1142,426	16	49	26,9113	0	0
surface antigen like protein L. mexicana	322488006	74084	5,0435	1046,198	22	36	30,6065	34,5396	2,5606
putative transaldolase L. mexicana	322489994	36952	6,0996	956,5945	13	24	38,7879	29,7214	1,099
putative ATPase alpha subunit L. mexicana	322488162	72797	10,0693	911,6846	12	49	18,6846	38,6017	2,8119

surface antigen like protein L.mexicana	322488005	51826	4,2129	775,9498	10	21	36,3636	0,4766	0,0247
elongation factor 1 alpha L.mexicana	322490098	49175	9,2021	598,3698	16	38	37,1938	0	0
putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor L.mexicana	322493637	72476	5,5562	588,4841	14	61	34,6847	18,15	1,3163
carrier L. amazonensis	28207692	35135	9,9932	516,9207	8	24	25,552	0	0
putative histone H2A L. mexicana	322488607	13951	11,3877	454,1088	3	8	13,6364	0	0
putative 60S ribosomal protein L18 L.mexicana	322489486	22093	12,041	403,4396	3	11	14,6465	0	0
histone H3 L. mexicana	322489151	14677	11,5913	376,7379	5	13	15,3846	0	0
putative vacuolar type proton translocating pyrophosphatase 1 L.mexicana	322493886	83668	5,1943	355,4032	9	40	12,9676	21,3802	1,79
mitochondrial processing peptidase beta subunit putative metallo peptidase Clan ME Family M16 Le	322495384	54607	6,6035	307,8063	13	42	34,898	23,5628	1,2875
putative kinesin L. major	68125681	246730	3,9316	306,5053	14	166	8,0638	5,4835	1,3538
glycosomal membrane protein L.major	323363992	24882	8,6631	304,064	9	19	39,5556	50,6554	1,2613
nucleoside diphosphate kinase b L.mexicana	322494390	16663	7,1689	302,6834	5	12	26,4901	0	0
glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase glycosomal L. mexicana	322493686	39098	9,4336	281,1494	11	30	36,8421	25,1799	0,9851
conserved hypothetical protein L.mexicana	322491651	46544	6,46	266,42	3	33	6,8354	11,4665	0,534
dehydrogenase L. amazonensis	155675712	29520	7,8252	266,0972	3	19	14,9466	10,665	0,315

reticulon domain protein 22 kDa potentially aggravating protein pape22 L. mexicana	322493644	22187	9,1479	177,7506	5	19	21,8274	12,8397	0,2851
peroxidoxin L. mexicana	322491865	25356	7,1675	158,758	4	21	18,1416	31,0827	0,7887
aldehyde dehydrogenase mitochondrial precursor L. mexicana	322492408	54224	7,4604	158,4437	9	43	22,6453	20,8403	1,1308
conserved hypothetical protein L.major	68127993	23276	5,0728	151,0852	1	13	8,0189	0	0
conserved hypothetical protein L.mexicana	322487862	31943	8,5737	148,1533	7	25	11,6838	16,4641	0,5263
putative RNA binding protein L.mexicana	322492346	25462	8,7935	143,5639	2	13	25,4167	9,0042	0,2294
putative small GTP binding protein Rab7 L. infantum	134067857	24885	5,3188	141,9573	2	17	14,8649	0	0
tryparedoxin L. donovani	157781821	16566	5,0259	125,4102	1	11	14,4828	19,7584	0,3275
fructose 1 6 bisphosphate aldolase L.mexicana	322490707	40807	8,9692	122,8846	8	30	24,5283	5,4637	0,2231
conserved hypothetical protein L.mexicana	322491077	51779	6,7236	106,2336	2	33	16,3136	1,0505	0,0544
ribosomal protein L3 like protein L.major	321438575	53906	9,3984	92,3641	4	36	11,9914	3,7035	0,1998
hypothetical protein unknown function L. mexicana	322495146	21189	11,5327	85,4384	3	13	30,5699	6,755	0,1432
L. donovani	154101355	24126	5,1108	60,9492	2	19	17,0404	1,2586	0,0304
unnamed protein product L.donovani	322499019	53328	7,3403	57,1718	8	31	42,9735	0,4871	0,026
protein 78 L. donovani	16797868	68864	4,9966	55,4297	16	57	30,0955	5,2482	0,3616
unnamed protein product L.donovani	322504005	40745	5,9019	51,8895	4	28	14,7757	12,814	0,5224
putative P type H ATPase L. mexicana	322490397	107444	5,3408	51,2461	6	62	10,5749	10,2696	1,1041

conserved hypothetical protein L.infantum	134067963	47928	6,3838	50,322	5	32	27,7027	0	0
putative calpain like cysteine peptidase L. mexicana	322492866	268886	4,9893	49,1411	24	187	13,121	33,5836	9,036
dehydrogenase e3 component lipoamidedehydrogenase like protein L. major	157873484	66760	7,7402	49,0172	3	42	9,4855	0	0
conserved hypothetical protein L.major	321438463	11430	8,7349	45,4043	2	8	34,2593	0,6122	0,007
hypothetical protein LMXM 23 1640 L.mexicana	322491927	344504	4,6816	8,7452	19	172	9,9034	0,8717	0,3005

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= "Protein Lynk Global Server" score, peptides= n° de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

A análise proteômica de *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD utilizando o *software* "Protein Lynx" com o banco de dados de *L.(L.) amazonensis* foram identificadas 19 *hits* e 33 proteínas (Tabela 9).

Tabela 9 - Proteínas identificadas de *L. (L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania (L.) amazonensis*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos tripticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
soluble promastigote surface antigen PSA 38S <i>L. amazonensis</i>	264665726	38526	4,4927	2772,989	22	18	50,1348	127,6558	4,9214
cytosolic trypanredoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	61619791	22002	7,6318	1947,363	25	17	89,4472	83,6944	1,8427
soluble promastigote surface antigen PSA 31S <i>L. amazonensis</i>	264665722	32107	4,3843	1846,5	18	15	44,8052	0,4744	0,0152
soluble promastigote surface antigen PSA 34S <i>L. amazonensis</i>	264665718	34817	4,5322	1582,016	30	18	71,9033	7,1426	0,2489
soluble promastigote surface antigen PSA 32S <i>L. amazonensis</i>	264665730	32900	4,2612	1566,904	21	14	56,1905	0	0
heat shock protein 70 <i>L. amazonensis</i>	293057	71153	5,2998	1401,901	88	49	89,4172	0	0
Histone H3 <i>L. amazonensis</i>	7544111	14667	11,5913	946,9781	15	13	76,9231	14,7022	0,2158
malate dehydrogenase <i>L. amazonensis</i>	155675712	29520	7,8252	943,1307	31	19	91,1032	40,8935	1,208
GP63 Leishmanolysin surface protease	51317309	63012	6,9229	842,2138	66	37	71,1893	101,5805	6,4049
HSP83 Heat shock protein 83 Short HSP 83	123665	80533	4,8018	437,7666	95	70	86,3053	0	0
ADP ATP carrier <i>L. amazonensis</i>	28207692	35135	9,9932	283,4638	38	24	75,7098	11,9181	0,419
actin <i>L. amazonensis</i>	242276402	42064	5,3833	212,0689	40	31	88,2979	8,5714	0,3608
mitochondrial trypanredoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	61619796	25327	7,166	202,0365	29	20	92,9203	9,3227	0,2363

myo inositol 1 phosphate synthase L.amazonensis	1928870	58469	7,2524	175,0489	64	39	90,8918	10,5011	0,6144
putative U5 small nuclear ribonucleoprotein like protein L.amazonensis	40804908	26838	4,4092	169,2265	29	16	77,2	2,3679	0,0636
RNA polymerase II large subunit L.amazonensis	2581912	48321	5,1006	155,02	52	36	87,2038	5,0656	0,2449

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= "Protein Lynk Global Server" score, peptides= n° de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

A análise proteômica de *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD utilizando o *software* "Protein Lynx" com o banco de dados de *Leishmania* spp foram identificadas 58 *hits* e 1030 proteínas (Tabela 10).

Tabela 10 - Proteínas identificadas em *L.(L.) amazonensis* isoladas do paciente com LCD por análise realizada com o software “*Protein Lynx*” utilizando o banco de dados de *Leishmania spp*, a partir de dados coletados por espectrometria de massa das amostras de peptídeos trípticos desse isolado.

Protein	Entry	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides	Coverage (%)	Amount (fmol)	Amount (ngrams)
alpha tubulin <i>L. infantum</i>	321399185	54146	4,9116	14493,83	25	37	40,4082	163,5607	8,862
beta tubulin <i>L. major</i>	68224035	49767	4,5205	8629,47	30	30	51,2415	1,8567	0,0925
tryparedoxin peroxidase <i>L. donovani</i>	145411494	22035	6,936	4578,023	18	17	55,2764	93,5961	2,0638
promastigote surface antigen PSA 38S <i>L. amazonensis</i>	264665726	38526	4,4927	4470,4	12	18	28,5714	64,4019	2,4828
histone H4 <i>L. mexicana</i>	322490580	11371	10,9878	4381,117	9	9	54	0	0
tryparedoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	61619791	22002	7,6318	4352,137	17	17	45,2261	0	0
putative heat shock protein hsp70 <i>L. mexicana</i>	322493365	71196	5,1724	3601,027	28	49	38,3792	11,0272	0,7856
promastigote surface antigen PSA 31S <i>L. amazonensis</i>	264665722	32107	4,3843	2975,375	8	15	23,3766	0	0
nucleoside diphosphate kinase b <i>L. mexicana</i>	322494390	16663	7,1689	2452,312	11	12	64,9007	0	0
glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase glycosomal <i>L. mexicana</i>	322493686	39098	9,4336	1847,055	19	30	42,9363	51,4994	2,0148
H2b <i>L. infantum</i>	146092853	20016	11,2339	1457,168	5	18	28,7293	0,2721	0,0054
dehydrogenase <i>L. amazonensis</i>	155675712	29520	7,8252	1380,363	9	19	47,331	28,3086	0,8362
hypothetical protein unknown function <i>L. infantum</i>	321398990	31430	4,8164	1261,936	12	19	19,5804	0	0
enolase <i>L. mexicana</i>	322489720	46116	5,3452	1236,624	12	30	42,1911	24,013	1,1081

Leishmanolysin surface protease L. Major surface glycoprotein	51317309	63012	6,9229	1062,376	17	37	27,8057	111,0942	7,0048
heat shock protein 83 1 L. mexicana	322494527	80521	4,8486	989,9487	12	71	16,9757	0	0
elongation factor 1 alpha L. major	68125711	49085	9,2021	902,7849	9	38	19,3764	0	0
putative histone H2A L. infantum	321399402	13896	11,2427	831,1976	6	8	19,697	0	0
tryparedoxin L. donovani	157781821	16566	5,0259	656,2128	6	11	55,8621	42,3251	0,7016
beta subunit L. major	157870644	56313	4,9688	616,2858	12	32	29,9048	0	0
alpha subunit L. infantum	146076833	62509	9,9536	612,2791	12	40	21,777	0	0
putative citrate synthase L. mexicana	322490317	52227	7,4019	597,0692	15	33	27,8723	13,2401	0,6919
putative citrate synthase L. mexicana	322490318	50161	6,2637	596,8789	14	34	27,7533	0	0
peroxidoxin L. mexicana	322491865	25356	7,1675	459,7292	5	21	14,1593	19,001	0,4821
putative glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase L. major	321438489	58156	8,0039	393,7362	10	39	18,0952	0	0
protein homologue L. major	349484	22210	5,395	374,0181	3	18	16,5	7,0017	0,1556
triosephosphate isomerase L. major	68126666	27178	8,5605	308,7146	2	23	11,1554	0	0
putative microtubule associated protein L. infantum	134067083	165056	4,4414	285,4034	4	202	4,161	0,3226	0,0533
ribosomal protein L22 L. infantum	146103953	14993	10,3975	283,211	2	6	37,2093	0	0
metallo peptidase Clan MF Family M17 L. mexicana	322489262	56895	6,3325	251,5022	7	31	18,3178	13,4261	0,7644
putative vacuolar type proton translocating pyrophosphatase 1 L.mexicana	322493886	83668	5,1943	245,2645	10	40	14,4638	11,8591	0,9929
carrier protein 1 mitochondrial precursor L. infantum	146084362	35130	9,9521	222,8163	8	24	15,4574	0	0
putative 60S ribosomal protein L18 L.mexicana	322489486	22093	12,041	140,5824	4	11	15,1515	0	0

putative dihydrolipoamide dehydrogenase L. major	68128729	50545	6,4219	133,8353	7	34	19,5378	7,0093	0,3545
unnamed protein product L.donovani	322501046	47432	5,25	122,1423	1	25	12,4169	6,8676	0,326
paraflagellar rod protein 2C L.infantum	134068723	68859	5,2368	91,5773	16	46	28,3806	0	0
putative electron transfer flavoprotein L. mexicana	322492305	28253	9,085	90,3947	3	19	17,8295	8,0788	0,2284
conserved hypothetical protein L.major	68124189	16072	6,9624	78,8302	3	11	32,4324	15,2874	0,2459
unnamed protein product L.mexicana	322488004	63153	5,937	77,7268	6	22	15,0082	9,0293	0,5706
conserved hypothetical protein L.mexicana	322490817	52558	5,6411	74,176	3	27	18,6722	0,4464	0,0235
putative iron superoxide dismutase L. major	68128574	22965	7,7886	74,0626	3	16	15,3846	4,6634	0,1072
unnamed protein product L.donovani	322496140	30094	8,7261	69,912	3	16	26,3538	18,5249	0,5578
conserved hypothetical protein L.infantum	134074233	100497	5,4902	59,932	7	58	6,8743	0	0
factor like protein L. infantum	146093946	20010	5,5239	48,778	5	16	34,0782	0	0
conserved hypothetical protein L.mexicana	322493328	77433	9,2095	45,0099	2	49	9,0659	0,466	0,0361
metallo peptidase Clan MA E Family M1 L. mexicana	322488557	96410	5,4199	43,2079	2	56	5,7604	0,8758	0,0845
elongation factor 2 L. mexicana	322490597	93996	5,6836	43,1318	8	70	13,6095	13,6126	1,2804
putative protein kinase L. mexicana	322493452	98514	9,4995	35,5922	10	72	12,082	2,3625	0,2329
glycosomal membrane protein L.infantum	134073547	24782	8,666	34,6132	5	19	24	0	0
hypothetical protein unknown function L. infantum	134072280	172785	5,0596	33,431	19	177	17,1815	1,6518	0,2856

conserved hypothetical protein L.major	68130139	102389	10,0181	32,1593	12	82	12,6214	2,3396	0,2397
protein L. major	157869357	73651	6,3955	29,0006	2	57	7,5188	7,286	0,537
conserved hypothetical protein L.infantum	134073295	35654	4,9922	28,4229	3	28	20,5438	0	0
putative proteasome beta 5 subunit L. mexicana	322490747	33592	6,0791	26,2247	3	26	6,9536	4,7521	0,1597
conserved hypothetical protein L.major	323363862	193019	6,2065	24,812	4	110	6,6927	1,4646	0,2829

mW= massa molecular, PI= ponto isoelétrico, PLGS score= "Protein Lynk Global Server" score, peptides= n° de peptídeos identificados conforme o íon precursor, theoretical peptides= peptídeos teóricos (*in silico*). Padrão: ADH=25 fmol

5.4.3 Seleção de proteínas identificadas nos isolados do paciente infectado com *L. (L.) amazonensis* portador de LCD e do isolado de lesões de paciente infectado com *L. (V.) braziliensis* portador de LCM e seus respectivos controles por categorias funcionais para análise quantitativa.

Para a análise quantitativa das proteínas identificadas pelo software “ProteinLynx” foi utilizado o padrão álcool desidrogenase (ADH). Os valores em negrito indicam maior quantidade de proteína no isolado quando comparado com a proteína identificada no controle. No isolado de *L. (V.) braziliensis* as proteínas *putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor L. braziliensis* e *ATPase alpha subunit L. braziliensis* foram identificadas em maior quantidade (Tabela 11). Para o isolado de *L. (L.) amazonensis* a proteína *malate dehydrogenase Leishmania amazonensis* foi identificada em maior quantidade (Tabela 12).

Tabela 11 - Proteínas identificadas de *L.(V.) braziliensis* controle selecionadas para análise quantitativa.

Proteínas	em <i>L. braziliensis</i> (controle)	em <i>L. braziliensis</i> (isolado)
beta tubulin <i>L. braziliensis</i>	0	—
heat shock protein 83 1 <i>L. braziliensis</i>	83,7245	—
elongation factor 2 <i>L. braziliensis</i>	17,5193	—
putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor <i>L. braziliensis</i>	32,3849	65,3343
ATPase alpha subunit <i>L. braziliensis</i>	30,3553	166,2715
beta tubulin <i>L. major</i>	0,2609	—
heat shock protein 83 1 <i>L. mexicana</i>	0	—
tryparedoxin peroxidase <i>L. donovani</i>	112,698	—
tryparedoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	5,6841	—
tryparedoxin peroxidase <i>L. mexicana</i>	2,5879	—
tryparedoxin peroxidase <i>L. infantum</i>	0	—
putative transaldolase <i>L. major</i>	8,0062	—
elongation factor 2 <i>L. major</i>	0	—
activated protein kinase c receptor LACK <i>L. major</i>	0	—
chaperonin HSP60 mitochondrial precursor <i>L. infantum</i>	0	—
terbinafine resistance locus protein yip1 <i>L. major</i>	0	—

Padrão: alcohol dehydrogenase (ADH)= 25fmol.

Tabela 12 - Proteínas *L. (L.) amazonensis* controle selecionadas para análise quantitativa.

Proteínas	em <i>L. amazonensis</i> (controle)	em <i>L. amazonensis</i> (isolado)
cytosolic tryparedoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	144,4391	—
malate dehydrogenase <i>L. amazonensis</i>	22,8797	40,8935
heat shock protein 70 <i>L. amazonensis</i>	14,3946	—
HSP70 Heat shock 70 kDa protein	14,3946	—
heat shock protein 70 <i>L. amazonensis</i>	7,1911	—
HSP83 Heat shock protein 83 Short HSP 83	22,9677	—
elongation factor 1 <i>L. amazonensis</i>	11,6844	—
heat shock protein 70 <i>L. amazonensis</i>	14,6925	—
LACK <i>L. amazonensis</i>	0	—
tryparedoxin peroxidase <i>L. donovani</i>	129,2389	—
tryparedoxin peroxidase <i>L. mexicana</i>	3,071	—
tryparedoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	0	—
heat shock protein 83 1 <i>L. mexicana</i>	0	—
putative heat shock protein hsp70 <i>L. mexicana</i>	0	—
putative ATPase alpha subunit <i>L. mexicana</i>	38,6017	—
elongation factor 1 alpha <i>L. mexicana</i>	0	—
putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor <i>L. mexicana</i>	18,15	—
putative small GTP binding protein Rab7 <i>L. infantum</i>	0	—
tryparedoxin <i>L. donovani</i>	19,7584	—
beta tubulin <i>L. major</i>	—	1,8567
tryparedoxin peroxidase <i>L. donovani</i>	—	93,5961
tryparedoxin peroxidase <i>L. amazonensis</i>	—	0
putative heat shock protein hsp70 <i>L. mexicana</i>	—	11,0272

heat shock protein 83 1 L. mexicana	_____	0
elongation factor 1 alpha L. major	_____	0
tryparedoxin L. donovani	_____	42,3251
beta subunit L. major	_____	0
elongation factor 2 L. mexicana	_____	13,6126
<hr/>		
Padrão: alcohol dehydrogenase (ADH)= 25fmol.		

6. DISCUSSÃO

Com o aumento nos últimos anos de casos refratários ao tratamento da leishmaniose, amplia-se o estudo da resistência *in vitro* voltado não somente a isolados de *Leishmania*, como também aos isolados originados das lesões de pacientes refratários à terapêutica. A grande maioria desses estudos foi realizada com *L.(L.) donovani*, parasito responsável pela leishmaniose visceral. (Torres 2009)

Vale ressaltar que falha terapêutica e resistência às drogas são dois fenômenos distintos e merecem uma análise cuidadosa. O primeiro está relacionado a uma resposta da interação parasito-hospedeiro-droga e o segundo à seleção de parasitos resistentes quando em contato com a droga. Ambos os fenômenos já foram encontrados na Índia e no Irã (Groggl et al. 1989; Groggl et al. 1992; Lira et al. 1999; Hadighi et al. 2006; Torres 2009).

A falha terapêutica é um evento complexo, já que existem vários fatores envolvidos nesse processo como: características do hospedeiro, a genética e a resposta imunológica; fatores farmacológicos, a qualidade da droga, o seu lote e a empresa que a produz; a duração do tratamento e a biologia do parasito, assim como a falta de sensibilidade intrínseca de uma determinada espécie ou cepa, e o fenótipo de resistência à droga (Groggl et al. 1989; Torres 2009).

Diferentes espécies de *Leishmania* são conhecidas por apresentar variabilidade intrínseca em relação à suscetibilidade ao antimônio. No Brasil foi constatada diferença na resposta terapêutica ao antimônio na LTA, dependendo do agente etiológico. Nos pacientes infectados com *L.(V.) braziliensis* houve uma taxa de cura de 50,8%, enquanto que nos infectados por *L.(V.) guyanensis* foi de 26,3%. Quanto à origem geográfica, também acredita-se que existam diferenças na resposta ao antimônio: pacientes portadores de *L.(V.) braziliensis* no Peru apresentaram uma taxa de cura de 69,6% (Allen & Neal 1989; Romero et al. 2001a; Arevalo et al. 2007).

O fenótipo de resistência às drogas em *Leishmania* pode ocorrer espontaneamente na natureza, sendo determinado geneticamente, e pode também ser induzido *in vitro* pela exposição do parasito à doses crescentes de uma droga. (Torres, 2009).

6.1 Relatos de casos

No presente trabalho, tentou-se relacionar o quadro clínico e a resposta terapêutica de dois pacientes com LCD e LCM que não responderam ao tratamento com as drogas convencionais para leishmaniose, com o comportamento das cepas isoladas de suas lesões comparando-as com cepas padrão das espécies de *Leishmania*.

6.1.1 Paciente portador de LCD

O paciente portador de LCD fez tratamento com as drogas gabromicina, pentamidina e antimoniato de meglumina. O referido paciente respondeu aos tratamentos com cura clínica, mas depois de um ano as lesões recidivaram. Sabe-se que a LCD se caracteriza pelo difícil tratamento e recaídas constantes pela falta de resposta imunológica do hospedeiro a *L.(L.) amazonensis*, portanto, fundamentado no que já se conhece desta doença acredita-se que a não resposta ao tratamento foi causada por falha terapêutica e não resistência às drogas (Barral & Barral-Neto 2009).

6.1.2 Paciente portador de LCM

Em função das freqüentes recidivas, esse paciente foi submetido a vários esquemas terapêuticos durante o período de 23 anos. O mesmo não aparentava ter comprometimento imunológico, já que tinha IDRМ positiva e testes sorológicos para doenças imunossupressoras negativos. Entretanto, apresentou alteração na determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com baixa produção. A produção de H_2O_2 está envolvida no mecanismo de destruição da *Leishmania* pelo monócito/macrófago depois da fagocitose. Esta alteração sugere que o paciente não produziu adequadamente substâncias leishmanicidas (Saldanha 2009)

O referido paciente não apresentou resposta ao tratamento com o antimoniato de meglumina, droga de primeira linha para tratamento da leishmaniose há mais de 50 anos. É sabido que esta droga pode falhar em 40% dos casos de LM (Koff & Rosen 1994).

O paciente também não respondeu à anfotericina B, droga de segunda escolha que também apresenta relato de falhas, assim como às demais drogas a que foi submetido (Sampaio & Marsden 1997).

Quando utilizou miltefosina, droga esta considerada eficaz e segura para o tratamento da LM, teve cura clínica com recidiva após 2 anos e meio (Soto & Toledo 2007; Saboia 2011).

Em uma análise clínica final, também parece aqui tratar-se de um paciente com forma mucosa grave refratária ao tratamento em que houve falha terapêutica e não resistência à droga.

6.2 Ensaios *in vitro* com as culturas dos isolados das lesões dos pacientes com LCD e LCM

O método colorimétrico MTT foi escolhido para a avaliação da atividade leishmanicida das drogas convencionais sobre *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD e controle. A escolha foi baseada em dados que confirmam a utilização desta metodologia como a mais adequada para a avaliação da atividade antiparasitária de drogas, em substituição à contagem manual.

Para determinar o número de parasitos viáveis, os métodos colorimétricos como a técnica do MTT, apresentam-se práticos, sensíveis e de baixo custo, e são amplamente utilizados para avaliação de citotoxicidade para formas promastigotas ou amastigotas (Sereno & Lemesre 1997b; Sereno et al. 1998; Dutta et al. 2005).

Neste estudo, a ação das drogas para avaliar a resistência de *Leishmania* foi realizada em teste *in vitro* em formas promastigotas e amastigotas axênicas.

Apesar dos comentários na literatura de que formas promastigotas de *Leishmania* são menos sensíveis ao antimônio pentavalente do que as formas amastigotas são comuns trabalhos que comparam a sensibilidade de isolados de *Leishmania* a esse fármaco utilizando essas formas do parasito (Zauli-Nascimento 2009).

É importante lembrar que ensaios com formas promastigotas apresentam algumas limitações como: a necessidade da droga (pré-droga) ser metabolizada pela célula do hospedeiro antes de atuar no parasito; drogas que precisam ser concentradas pelo macrófago podem demonstrar apenas uma pequena atividade nas formas promastigotas e a precisão do MTT pode não ser efetiva, uma vez que alguns grupos químicos podem interagir com a formação do formazan (Mosmann 1983; Denizot & Lang 1986; Sereno & Lemesre 1997; Silva 2008).

Para agentes leishmanicidas, as formas promastigotas são utilizadas comumente devido ao seu baixo custo de cultivo e manutenção. São realizados testes *in vitro* em diferentes concentrações, de diferentes drogas, onde a taxa de inibição do parasito é determinada após 48 e 72h de incubação (Fumarola,

Spinelli, Brandonísio 2004). Neste estudo deu-se preferência ao período de incubação de 48h.

Zauli-Nascimento (2009) observou que concentrações de 32,4 mg/mL de antimônio pentavalente, droga de primeira escolha para o tratamento da LTA, não foram suficientes para inibir o crescimento de formas promastigotas em 24h. Já Azeredo-Coutinho et al. (2007), apresentaram resultados de ação com valores entre 0,8 e 9,5 mg/mL de antimônio pentavalente em formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis*, após um período de 72h de incubação com a droga. E para outras espécies, como a *L (L.) amazonensis*, os valores variaram entre 10 e 60 mg/mL.

Este trabalho utilizou a diluição seriada de drogas partindo da concentração de 3000 µg/mL para formas promastigotas, com período de incubação de 48 horas. Porém, Zauli-Nascimento (2009), obteve melhor resultado quando aumentou o período de incubação da droga para 72h, assim como descrito por Azeredo-Coutinho et al. (2007), o que sugere que poderíamos obter melhores resultados se adotado o mesmo período de incubação das drogas em nossos ensaios.

O ciclo natural da forma promastigota se dá somente no hospedeiro invertebrado, que não é alvo para o tratamento da leishmaniose. Além disso, existem diferenças tanto na morfologia como na bioquímica entre as formas promastigotas e amastigotas. Nesse sentido, resultados obtidos com pesquisas utilizando as formas promastigotas nem sempre são relevantes. (Callahan et al. 1997; Sereno & Lemesre 1997; Sereno et al. 1998; Fumarola, Spinelli, Brandonísio 2004). Desta forma, acredita-se que estudos para os mecanismos de resistência às drogas na forma amastigota, devam mimetizar melhor o mecanismo de escape do parasito na infecção natural no homem (Ephros, Waldman, Zilberstein 1997; Ephros et al. 1999).

6.2.1 Determinação da curva de crescimento realizada com as culturas dos isolados das lesões dos pacientes com LCD e LCM

É conhecido que existem diferentes fases envolvidas no ciclo de vida da *Leishmania* spp e as formas promastigotas metacíclicas representam a fase mais importante. O estágio de promastigota metacíclica, que começa no final da fase logarítmica e início da fase estacionária é considerado com maior potencial infectante para o hospedeiro, onde as promastigotas se encontram em grande número e com maior viabilidade (Gossage, Roger, Bates 2003).

Nas curvas de crescimento realizadas anteriormente no Laboratório de Dermatologicologia da Unb, formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* apresentaram fase logarítmica de crescimento até o sexto dia e a partir deste iniciou-se a fase estacionária ou infectante. No caso das promastigotas de *L. braziliensis* observou-se que a fase logarítmica de crescimento foi até o quinto dia (Campos 2008).

Para *Leishmania* spp., a determinação da fase metacíclica é importante, uma vez que autores sugerem uma associação entre a fase de crescimento da cultura e o sucesso na obtenção e manutenção de amastigotas axênicas, formas utilizadas neste estudo para avaliar a ação leishmanicida das drogas sobre o isolado de *Leishmania* do paciente com LCD (Cysne-Finkelstein et al. 1998).

Não foram encontrados dados na literatura de experimentos semelhantes com os quais se pudesse correlacionar estes achados.

6.2.2 Capacidade fagocitária de macrófagos em relação à cepa isolada das lesões do paciente com LCD

O estudo da capacidade fagocitária foi realizada somente com cepas de *L.(L.) amazonensis* do isolado do paciente com LCD e do seu respectivo controle,

já que o crescimento das formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* do isolado do paciente com LCM não alcançou a quantidade de formas necessárias para realizar o experimento, como já citado acima. Na avaliação da cinética de infecção e determinação do tempo gasto na transformação de formas promastigotas em amastigotas, os resultados obtidos foram compatíveis com o descrito por Lobo et al. (2011), no qual as formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* controle foram prontamente reconhecidas por receptores para padrões moleculares de patógenos, e endocitadas. O mesmo não ocorreu com as formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* do isolado do paciente com LCD, pois houve retardo no reconhecimento, porém os macrófagos permaneceram por mais tempo infectados com maior carga parasitária.

Foi observado que os macrófagos infectados pelas formas promastigotas do isolado do paciente com LCD possuíam carga parasitária maior que os macrófagos infectados pelo controle, chegando à sua destruição total com o decorrer do tempo. Na cepa controle, os parasitos perdiam a viabilidade com o decorrer do tempo, o que permite sugerir uma maior virulência de *L.(L.) amazonensis* do isolado do paciente com LCD.

Em experimentos *in vitro* já realizados no Laboratório de Dermatocologia da Unb (Campos 2008), com a cepa de *L.(L.) amazonensis* isolada das lesões do paciente com LCD constatou-se um comportamento agressivo, com disseminação rápida das lesões no hamster, à semelhança do ocorrido no paciente.

6.2.3 Ação leishmanicida das diferentes drogas sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* controle e formas promastigotas e amastigotas axênicas do isolado do paciente infectado com *L.(L.) amazonensis* portador de LCD.

Para padronizar os ensaios com formas promastigotas foram utilizadas concentrações decrescentes das drogas a partir de 3000 µg/mL. Essas drogas

foram escolhidas por fazer parte do esquema terapêutico do paciente com LCM, já que a proposta inicial era estudar também a cepa de *L.(V.) braziliensis* isolada do mesmo, não sendo possível por não obter crescimento adequado da mesma (10^6 formas promastigotas).

Para os testes com formas amastigotas axênicas foram usadas concentrações decrescentes a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$. Esta opção está embasada em alguns estudos realizados em culturas axênicas de amastigotas que demonstraram que o IC_{50} para amastigotas axênicas varia de 3,2 a 100 μg de SbIII por mL dependendo da espécie de *Leishmania* (Ashutosh, Sundar, Goyal, 2007). As três drogas selecionadas para os ensaios com amastigotas axênicas foram antimoniato de meglumina, anfotericina B lipossomal e miltefosina por serem as drogas disponíveis naquele momento no laboratório.

6.2.4 Ação do antimoniato de meglumina sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* controle e do isolado do paciente portador de LCD.

Apesar de apresentar limitações quanto ao uso, o antimoniato de meglumina ainda é a droga de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, com destaque para a situação de resistência crescente. Por esse motivo, os testes *in vitro* incluem essa droga, mesmo com relatos contraditórios de eficácia ou não neste tipo de ensaio.

Na avaliação da ação do antimoniato de meglumina em formas promastigotas do isolado do paciente com LCD, foi observado que esta droga não teve ação leishmanicida. Este resultado já era esperado, pois relatos da literatura postulam que a concentração mínima necessária para atividade *in vitro* deste fármaco é de 4100 $\mu\text{g/mL}$, dose considerada muito elevada para este tipo de teste (Jaramillo et al. 2000).

Os resultados da ação antileishmania do antimoniato de meglumina em formas amastigotas axênicas, também como em formas promastigotas, não mostraram redução significativa do número de formas amastigotas em relação ao grupo controle. Porém, nas doses 1,56µg/mL e 3,16µg/mL parece ter havido certa suscetibilidade de *L.(L.) amazonensis* do isolado do paciente frente ao antimônio em amastigotas. Alguns estudos realizados em culturas axênicas de amastigotas demonstram suscetibilidade ao SbV, enquanto as formas promastigotas não o são, podendo sugerir que alguma redução possa ocorrer em um estágio específico do ciclo de vida do parasito e não em outro estágio (Ephros, Waldman, Zilberstein 1997, Ephros et al. 1999). Contudo, já existem estudos indo de encontro a esta hipótese, sugerindo que isto possa ocorrer por um segundo mecanismo onde o SbV seria convertido para SbIII dentro das células do hospedeiro (Burguera et al. 1993; Lugo de Yaburh et al. 1994; Sereno et al. 1998).

Os dados obtidos estão em consonância com a ausência de resposta clínica do paciente com LCD ao tratamento com essa droga.

6.2.5 Ação *in vitro* da anfotericina B lipossomal sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* controle e formas promastigotas e amastigotas axênicas do isolado do paciente infectado com *L. (L.) amazonensis* portador de LCD.

Tanto as formas promastigotas do isolado do paciente com LCD como o controle não apresentaram susceptibilidade alguma frente a anfotericina B lipossomal. Porém, as formas amastigotas axênicas foram menos suscetíveis à ação da anfotericina B lipossomal do que o grupo controle.

Para Decuypere et al. (2005), os mecanismos de resistência evidenciados *in vivo* seriam diferentes daqueles descritos para *in vitro*.

A anfotericina B lipossomal é uma droga que tem sido empregada com sucesso em vários casos de leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e

leishmaniose cutânea-difusa, principalmente em pacientes refratários ao antimonial pentavalente (Sampaio & Marsden 1997; Amato et al. 2000; Motta 2006). Porém, o resultado obtido neste ensaio não permitiu correlacionar com a resposta clínica-terapêutica do paciente, pois o mesmo não fez uso dessa droga.

6.2.6 Ação *in vitro* da pentoxifilina sobre formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* controle e formas promastigotas do isolado do paciente infectado com *L.(L.) amazonensis* portador de LCD.

A pentoxifilina, nas concentrações testadas, não apresentou redução significativa na lise de promastigotas ($p=0,33$). Segundo Almeida, Santos, Machado (2005) não há evidência de que a pentoxifilina destrua diretamente a *Leishmania in vitro* ou ative macrófago. Contudo, resultados positivos são obtidos quando a pentoxifilina é associada ao antimonial em pacientes com LTA. Este resultado também não pode ser correlacionado com a resposta clínica-terapêutica do paciente, por não ter sido utilizada no tratamento do mesmo.

6.2.7 Ação *in vitro* do itraconazol sobre formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* controle e formas promastigotas do isolado do paciente infectado com *L.(L.) amazonensis* portador de LCD.

As promastigotas do isolado, assim como do controle, também não se mostraram suscetíveis à ação do itraconazol. Esta droga já foi testada em vários ensaios para leishmaniose visceral e LC, apresentando resultados controversos. Estudos que utilizaram o itraconazol em pacientes com LC por *L. major* mostraram cura de 44,9% a 78% dos pacientes tratados (Al-Fouzan et al. 1991; Dogra 1992; Van den Enden et al. 1994). Como o paciente com LCD também não fez uso

desta medicação, não foi possível correlacionar este resultado com a resposta clínica-terapêutica do mesmo.

6.2.8 Comparação da ação *in vitro* do alopurinol sobre formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* controle e formas promastigotas do isolado do paciente infectado com *L.(L.) amazonensis* portador de LCD.

A droga alopurinol teve ação sobre às formas promastigotas do isolado do paciente com LCD, entretanto o referido paciente não foi tratado com essa droga. Estudo realizado por Martinez & Marr (1992) mostra resultados de 80% de cura em pacientes com *L. panamensis* nas doses de $20\text{mg.Kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ e 74% quando associado ao antimoniato, sendo uma alternativa de tratamento para LTA.

O alopurinol tem sido utilizado no tratamento da LC por ter efeito antileishmania pelo bloqueio da síntese do ergosterol e por se tratar de uma medicação de administração por via oral (Singh & Sivakumar 2004). Entretanto, há controvérsias sobre sua capacidade terapêutica, pois estudos realizados por Berman (1997), mostraram pouca eficiência no tratamento de LC na Colômbia.

6.2.9 Comparação da ação *in vitro* do miltefosine sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L.(L.) amazonensis* controle e formas promastigotas e amastigotas axênicas do isolado do paciente infectado com *L.(L.) amazonensis* portador de LCD.

Tanto as formas promastigotas quanto as formas amastigotas axênicas do isolado do paciente com LCD mostraram-se suscetíveis à a ação do miltefosina. Lembrando que nem todas as espécies de *Leishmania* têm a mesma sensibilidade frente à miltefosina, o estudo realizado por Campos (2008) corrobora com esse

dado. Em um ensaio com formas promastigotas de *Leishmania*, *L.(L.) amazonensis* foi a cepa mais sensível frente a miltefosina, seguida pela *L.(V.) braziliensis* (Campos 2008).

Há relatos da baixa sensibilidade de *L.(V.) braziliensis* e *L.(V.) guyanensis*, no Peru, a miltefosina, e respostas diferentes aos antimoniais entre *L. braziliensis* e *L.(V.) guyanensis* no Brasil. Porém, a farmacocinética e a resposta intrínseca às drogas pode variar entre as espécies de *Leishmania* e talvez entre subespécies de uma mesma espécie. Promastigotas e amastigotas de *L.(L.) donovani*, *L.(L.) major*, *L.(L.) tropica*, *L.(L.) aethiopica*, *L.(L.) mexicana* e *L.(V.) panamensis* apresentaram sensibilidades diferentes à miltefosina, sendo que *L.(L.) donovani* foi mais sensível, mesmo quando resistente aos antimoniais (Romero et al. 2001a; Amato, De Andrade, Duarte 2003; Yardley et al. 2005; Croft et al. 2006).

Yardley et al. (2005) pesquisaram a sensibilidade do miltefosina em formas amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea e observaram uma grande variação nas concentrações de miltefosina necessárias para destruir 50% das formas amastigotas dessas diferentes espécies. Isso demonstra uma notável diferença na sensibilidade intrínseca *in vitro* das espécies de *Leishmania* a miltefosina.

Teixeira et al. (2007) em estudos *in vitro*, também observaram a ação da miltefosina em culturas de macrófagos peritoniais de camundongos Balb/c infectados com *L.(L.) chagasi*, *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis* e *L.(V.) guyanensis* e concluíram que a droga foi ativa contra todas as espécies.

A discussão acerca da ação da droga miltefosina vem reforçar que esta droga seria uma opção de tratamento para os casos com LCD, pois Zerpa et al. (2007) demonstraram uma boa eficácia da droga, com poucos efeitos colaterais, onde os pacientes apresentaram melhora clínica e diminuição da carga parasitária em 15 dias após início do tratamento. Entretanto, ocorreram níveis de recidiva, com o aparecimento de novas lesões após a suspensão do tratamento.

6.3 Identificação e caracterização de proteínas extraídas dos isolados dos paciente com *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* e seus respectivos controles.

O aumento da incidência de falha terapêutica nos últimos 15 anos vem se tornando uma grande ameaça. A principal razão desse fato é devido ao mau uso das drogas, promovendo a seleção de pequenas populações resistentes (Croft, Seifert, Yardley 2006). Os métodos atuais para monitorar a resistência de isolados individuais baseiam-se no modelo *in vitro* macrófago-amastigota, uma técnica exigente e demorada. Portanto, há uma necessidade urgente pela busca de marcadores moleculares, como as proteínas relacionadas à resistência às drogas (Natera et al. 2007; Torres 2009).

Um dos objetivos deste trabalho foi identificar e caracterizar proteínas de *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* dos isolados de dois pacientes (LCD e LCM) que não responderam satisfatoriamente ou não tiveram cura clínica definitiva após o uso de várias drogas.

A extração das proteínas foi realizada em formas promastigotas. Embora a forma amastigota seja responsável pela infecção no hospedeiro mamífero, a identificação de proteínas em extrações de formas promastigotas é útil, já que aproximadamente 90% do proteoma permanece qualitativamente inalterada durante todo o ciclo de vida do parasito (Bente et al. 2003; Cuervo et al. 2006).

As técnicas de identificação de proteínas mais utilizadas são: eletroforese bi-dimensional, MALDI-TOF/TOF, ESI, MALDI MS/MS, entre outras (Forgber et al. 2006; Cuervo et al. 2006). Essas técnicas podem ser muito demoradas e trabalhosas. No presente estudo foi aplicada a técnica LC-MS^E que é eficiente na identificação de proteínas de amostras biológicas complexas (Kwon et al. 2010).

Devido à similaridade entre as espécies de *Leishmania*, juntamente com os avanços em tecnologias de espectrometria de massa e programas de identificação de proteínas foi possível a identificação de proteínas de *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* dos isolados dos pacientes com LTA aqui estudados, de forma eficiente.

Os espectros de massa resultantes foram usados para pesquisar a identidade de proteínas no banco de dados obtido do NCBI e essa estratégia permitiu verificar que o *software* utilizado realizou designações corretas das proteínas por homologia das cepas avaliadas com outras espécies de *Leishmania*, chegando até 100% de similaridade entre as espécies.

Para realizar a análise quantitativa das proteínas foram selecionadas as proteínas *Heat shock proteins 70*, *Chaperonin Hsp 60*, *Heat shock protein 83-1*, *putative GTP-binding protein*, *putative Calpain-like cysteine peptidase*, *tryparodexin peroxidase*, *Beta tubulin*, *Activated protein kinase C receptor LACK* e *elongation factor 1* (Quadro 5) por apresentarem dados na literatura de associação com a imunomodulação, sobrevivência intracelular, fator de virulência, resistência e fator de disseminação do parasito (Launois et al. 1997; Edvonin et al. 2006; Campos et al. 2008; Cuervo et al. 2009).

Quadro 5 - Classificação das proteínas identificadas em categorias por processos biológicos

Categorias	
proteínas de desdobramento/chaperonas	Heat shock proteins 70 e relacionadas Chaperonin Hsp 60 Heat shock protein 83-1
Síntese de proteínas	GTP-binding protein, putative
Proteólise	Calpain-like cysteine peptidase, putative
Antioxidante/desintoxicante	Tryparodexin peroxidase
Associado ao citoesqueleto	Beta tubulin
Apoptose	Activated protein kinase C receptor LACK

Adaptado de Cuervo et al. (2007; 2009)

As formas promastigotas de *Leishmania* são capazes de secretar/liberar proteínas com funções na imunomodulação, transdução de sinal e sobrevivência

intracelular, tais como, a *Hsp 70*, *activated protein kinase C receptor (LACK)*, *elongation factor 1 β* e *tryparedoxin peroxidase* (Cuervo et al. 2009)

Um estudo proteômico realizado por Vergnes et al. (2007) identificou um número de proteínas diferentemente expressas em isolados clínicos resistentes de *L.(L.) donovani*, envolvidas no programa de morte celular. Duas proteínas em particular estavam intimamente envolvidas no programa mencionado: a Hsp83, aumentando a resistência às drogas e reduzindo a ativação do processo de morte celular, e a pequena proteína de Kinetoplastida relacionada à calpaína (SKCRP14.1), promotora do processo de morte celular induzido por antimônio.

Outros genes relacionados ao estresse, HSP70 e HSC70, já foram sugeridos 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).

Já 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).

O *elongation factor 1- β* desempenha papel na síntese de proteínas. O complexo *elongation factor 1- β* está implicado em outros processos celulares, tais como transdução de sinal e apoptose, bem como a sobrevivência de amastigotas em macrófagos. Recentemente foi relatado que o complexo *elongation factor 1- β* tem atividade de tripanotiona S-transferase e de tripanotiona peroxidase, bem como em fatores potenciais envolvidos na disseminação do parasito (Ejiri et al. 2002; Nandan et al. 2002; Vickers et al. 2004; Cuervo et al. 2007).

Para a *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD a proteína que apresentou maior quantidade foi a *malate dehydrogenase Leishmania amazonensis*, e para *L.(V.) braziliensis* isolada do paciente com LCM, as proteínas que obtiveram maior quantificação na análise foram a *ATPase alpha subunit Leishmania braziliensis* e a *putative heat shock protein hsp70 Leishmania braziliensis*. 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 parasito.

Os resultados obtidos neste estudo apesar de preliminares, são relevantes, pois fornecem indícios do envolvimento dessas proteínas na resposta clínica da LTA frente à terapêutica além de coincidirem com os achados de Cuervo et al. (2006); Leifso et al. (2007) e Cuervo et al. (2009).

A técnica utilizada aqui para identificar e quantificar proteínas em *Leishmania* é eficiente. Porém, para avaliar se uma determinada proteína pode ser utilizada como alvo de drogas é importante primeiro compreender a natureza dos polimorfismos encontrados em populações de parasitos, uma vez que um dos grandes motivos do surgimento de resistência às drogas é devido a mutações pontuais em proteínas alvo (Arav-Boger & Shapiro 2005).

Estes achados são o início de um vasto campo a ser explorado no laboratório de Dermatocologia da Unb pelo grupo do estudo da epidemiologia, diagnóstico e tratamento das leishmanioses. Os testes *in vitro* devem ser expandidos para o isolado de lesões do paciente portador de LCM. Deve ainda ser determinado o IC₅₀ das drogas utilizadas para o tratamento da LTA na tentativa de correlacioná-las com a manifestação clínico-patológica da doença. Também devem ser realizados experimentos utilizando formas amastigotas em macrófagos peritoneais de camundongos.

Dar continuidade à identificação de proteínas e analisar o perfil de proteínas expressas nas duas espécies sensíveis utilizadas neste trabalho, para selecionar aquelas envolvidas nos mecanismos de resistência a drogas pela indução da resistência *in vitro* utilizando concentrações crescentes de drogas.

7. CONCLUSÕES

Foram estudados dois casos de pacientes portadores de formas graves de LTA (LCD e LCM) causadas por *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis*, ambos sem resposta adequada ao tratamento específico, sugerindo falha terapêutica.

A curva de crescimento do isolado de *L.(L.) amazonensis* com LCD corroborou com a grave manifestação clínica, pois as formas promastigotas chegaram à fase infectante em grande número e com maior viabilidade, enquanto que em *L.(V.) braziliensis* a resposta da curva de crescimento foi discordante da gravidade da manifestação clínica, não alcançando o crescimento das formas promastigotas até a fase metacíclica.

A cinética de infecção para *L.(L.) amazonensis* também reforçou a agressividade da manifestação clínica apresentada pelo paciente, pois infectou maior quantidade de macrófagos e por um período maior de tempo.

No caso da LCD houve concordância entre a falta de resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina e a falha da ação desta droga no ensaio *in vitro*, tanto nas formas promastigotas como nas formas amastigotas.

A cepa de *L.(L.) amazonensis* isolada do paciente com LCD foi menos sensível à ação da maioria das drogas testadas neste trabalho, permitindo questionar se a espécie de *Leishmania* causadora da doença não estaria também envolvida na resposta terapêutica.

A técnica LC-MS^E utilizada para detecção de proteínas de *Leishmania* foi eficiente, porém não foi possível concluir que as proteínas *putative heat shock 70 related protein 1 mitochondrial precursor L. braziliensis*, *ATPase alpha subunit L.*

braziliensis e *malate dehydrogenase* *Leishmania amazonensis* estejam associadas com a evolução da LCD e LCM.

REFERÊNCIAS

- Abdelnur PV. A espectrometria de massas e as bio-moléculas: Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos. [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química; 2010.
- Abdo MG, Elamin WM, Khalil EA, Mukhtar MM. Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and in vitro correlation. *East Mediterr Health J.* 2003; 9(4): 837-43.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003; 422, 198-207.
- Akopyants NS, Matlib RS, Bukanova EN, Smeds MR, Brownstein BH, Stormo GD, et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004; 136: 71–86.
- Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 2003; v. 17, n. 1, 1-18.
- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999; 112 Pt 18 : 2993-3002.
- Al-Fouzan AS, Al Saleh QA, Najem NM, Rostom AI. Cutaneous leishmaniasis in Kuwait. Clinical experience with itraconazole. *Int J Dermatol.* 1991; 30:519-21.

- Allen S, Neal RA. The in vitro susceptibility of macrophages infected with amastigotes of *Leishmania* spp. to pentavalent antimonial drugs and other compounds with special relevance to cutaneous isolates. In: Hart DT, ed. *Leishmaniasis*. New York: Plenum Press, 1989; 711–20.

- Almeida OLS, Santos JB. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *An.Bras. Dermatol.* [online]. 2011; vol.86,n.3.

- Almeida R, Santos JB, Machado P. Imunoterapia de Leishmaniose Tegumentar Americana. *Gaz. méd. Bahia*. 2005; 75(1),83.

- Alrajhi AA, Ibrahim EAJ, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazol for the treatment of Cutaneous Leishmaniasis caused by *leishmania major*. *N Engl J Med*. 2002; v. 346, p. 891- 895.

- Aly R, Argaman M, Halman S, Shapira M. A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic acids research*. 1994; 22(15): 2922-2929.

- 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*. 2006; 11:161–171.

- Amato VS, De Andrade HF, Duarte MI. Mucosal Leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*. 2003; 85(1), pp: 39-49.

- Amato VS. Utilização do isotionato de pentamidina para o tratamento da leishmaniose mucosa. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(6):529-30.

- Amato VS, Nicodemo AC, Amato JG et al. Mucocutaneous Leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with Liposomal Amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000; v. 46, p. 341-342.

- Andersen EM, Cruz-Saldarriaga M, Llanos-Cuentas A, Luz-Cjuno M, Echevarria J, Miranda-Verastegui C, et al. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous Leishmaniasis. *Amer J Trop Med Hyg*. 2005; 72: 133-137.

- Arav-Boger R, Shapiro TA. Molecular mechanisms of resistance in anti-malarial chemotherapy: the unmet challenge. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45: 565–85.

- Arevalo J, Ramirez L, Adui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007; 195(12): 1846-51.

- Ashcroft, AE. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. *Natural Product Reports*. 2003; v.20, n.2, p.202-215.

- Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol*. 2007; 56(Pt 2): 143-53.

- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, Portal AC, 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*. 2007; 93(3): 688-93.

- Bailey MS, Lockwood DNJ 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 25: 203-211.

- Banúls AL, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol.* 1999; 29(8): 1137-47.

- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology.* 2007; 64: 1-109.

- Barral A, Barral-Netto M. Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) *Gaz. méd. Bahia.* 2009;79 (Supl.3):35-39.

- Barral A, Sampaio DP, Grimaldi JRG, Momem H, Pratt DMM, Jesus AR, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil. Evidence that *leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical diseases. *Amer J Trop Med Hyg.* 1991; 44: 536-546.

- Belliard AM, Leroy C, Banide H, Farinotti R, Lacour B. Decrease of intestinal p glycoprotein activity by 2n-propylquinoline, a new oral treatment for visceral Leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2003; 103: 51–56.

- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics.* 2003;3:1811–29.

- Berman JD. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 1997; v. 24, n. 4, p. 684-703.

- Bermúdez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, et al. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006; 100(7): 591-600.

- Bittencourt AL, Barral A, Costa JML, Saldanha ACR, Badaró R, Barral-Neto M, et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. *Int J Derm.* 1992; 31: 568-570.

- Bittencourt AL, Guimarães N. Imunopatologia da leishmaniose tegumentar difusa. *Med Cutan Ibero Lat Am.* 1968; 2:395-402.

- Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, 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.* 1997;186:1315

- Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, 1999; v.17, n.3, p.121-127,

- Bogdan C, Rollinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitology Today.* 1990; v. 6, n. 6, p.183-187.

- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, et al. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'- untranslated region element. *J Biol Chem.* 2002; 277(22): 19511-19520.

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

- Brendle JJ, Outlaw A, Kumar A, Boykin DW, Patrick DA, Tidwell RR, et al. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 797- 807.

- Brener, Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas [tese de livre-docência]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1961.

- Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*. 1998; 222: 107-117.

- 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*. *Cell Stress Chaperones*. 2004; 9(3): 294-303.

- Bryceson ADM. Therapy in man. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in biology and medicine*, vol. 2, Academic Press, London. 1987; p. 847-907.

- Burguera JL, Burguera M, Petit de Pena Y, Lugo A, Anez N. Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimonate. *J Trace Elem Med Biol*. 1993; 10: 66–70.

- Cahill DJ, Nordhoff E, O'Brien J, Klose J, Eickhoff H, Lehrach H. Bridging genomics and proteomics. In: Penningto SR, Dunn MJ. *Proteomics from protein sequence to function*. BIOS Scientific Publishers Limited. 2001; p.1 22.

- Calderano SG, de Melo Godoy PD, da Cunha JP, Elias MC. Trypanosome prereplication machinery: a potential new target for an old problem. *Enzyme Res*. 2011; 2011:518258.

- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(4): 818-22.

- Campos RM, Nascimento M, Ferraz JC, Pereira MM, Rocha PO, Thompson GM, et al. Distinct mitochondrial HSP70 homologues conserved in various *Leishmania* species suggest novel biological functions. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;160:157–62.
- Campos, JF de F. Avaliação *in vitro* da ação leishmanicida da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental [dissertação]. Brasília: Universidade Federal de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde; 2008.
- Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Braz J Pharm Sci.* 2000; 36: 69–96.
- Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of Miltefosine in the treatment of cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):255-60.
- Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci.* 2002; 115: 2303–2316.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for Leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006; v. 123, p. 399-410.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1): 111-26.

- Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des.* 2002; v. 8, n. 4, p. 319-342.

- Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonça-Lima L, González LJ, Betancourt L, et al. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasitol.* 2007;154:6–21.

- Cuervo P, Sabóia-Vahia L, Costa Silva-Filho F, Fernandes O, Cupolillo E, DE Jesus JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Parasitol.* 2006;132:177–85.

- Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonca-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotas. *J. of Proteomics.* 2009; 73 (1), pp. 79-92.

- Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72(2): 132-41.

- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997; 91(6): 617-26.

- Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol.* 1998; v. 89, n.1, p. 58-62.

- Da Silva EC, Rayol CD, Moura PMMF, Andrade PP. Partial purification, immunogenicity and putative new localization of a native *Leishmania* heat shock protein 70. *Parasitol Latinoam.* 2008; 63: 4 - 11.

- Davidson RN, Croft SL, Scott A, Maini M, Moody AH, Bryceson ADM. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral Leishmaniasis. *The Lancet*. 1991; 337:1061-1062.

- De Paula CD, Sampaio JH, Cardoso DR, Sampaio RN. A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(3):365-71.

- Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De Doncker S, Laurent T, Khanal B, et al. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4616–4621.

- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. of immunological methods*. 1986; v. 89, n. 2, p. 271-277,.

- Desjeux P, Piot B, O'Neill K, Meert JP. Co-Infections of Leishmania/HIV in South Europe. *Med Trop (mars)*. 2001; 61(2):187-93.

- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; v.27, n.5, p.305-318.

- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001; 95: 239–243.

- Dogra J. Cutaneous leishmaniasis in India: evaluation of oral drugs (dapsone versus itraconazole). *Eur J Dermatol*. 1992; 8:568-9.

- Donkor IO, Assefa H, Rattendi D, Lanne S, Vargas M, Goldberg B, et al. Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidine. *Eur J Med Chem.* 2001; 36: 531-538.

- Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified mtt assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral Leishmaniasis. *Parasitol. Int.*, 2005; v. 54, p. 119-122.

- Ejiri S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc-finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotech Biochem.* 2002;66:1–21.

- Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 278–282.

- Ephros M, Waldman E, Zilberstein D. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 1064–1068.

- Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SI. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica.* 2002; v. 81, n. 2, p. 151-7.

- Forgber M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, et al. Mapping the Antigenicity of the Parasites in *Leishmania donovani* Infection by Proteome Serology. *PLoS ONE.* 2006; 1(1): e40.

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

- Funasa. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; 2000.

- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana- artigo de atualização. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36(1): 71-80.

- Gossage SM, Rogers ME, Bates, PA. Two separate growth phases during the development of leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol. 2003; v. 33, p. 1027–1034.

- Griffin TJ, Goodlett DR, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. Curr Opin Biotechnol. 2001; v.12, n.6, p.607-612.

- Grimaldi G Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 41: 687-725.

- Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ, Ishkawa EAY; Carvalho-Pinto CJ, Eger-Mangrich I, et al.. Characterization of *Leishmania* sp strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous Leishmaniasis in Santa Catarina State, Southern Brazil. Acta Trop. 2000; 74 (1): 89-93.

- Grogl M, Oduola AM, Cordero LD, Kyle DE. *Leishmania* spp.: Development of pentostamresistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. Exp Parasitol. 1989; 69: 78–90.

- Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am J Trop Med Hyg. 1992; 47: 117–26.

- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002; v.2, n. 8, p. 494-501.

- Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 2006; 3(5):e162.

- Haile S, Papadopoulou, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10: 569-577.

- Hashim FA, Khalil EAG, Ismail A, El Hassan AM. Apparently successful treatment of two cases of kala-azar dermal Leishmaniasis with amphotericin B. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995; 89:440.

- Henriques C, De Souza W. Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *Leishmania amazonensis*-containing parasitophorous vacuole. *Parasitol Res.* 2000; 86: 215-225.

- Hepburn NC. Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000; v. 25, n. 5, p. 363-70.

- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999; v. 354, n. 9185, p. 1191-1199.

- Hiemenz W, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin Infect Dis.* 1996; 22(2): s133- 144.

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

- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005; 309(5733): 436-442.
- Ivens AC, Blackwell JM. The *Leishmania* genome comes of Age. *Parasitol Today*. 1999; v.15, p. 225-31,.
- Jaramillo C, Arango GJ, Gonzalez MC, Robledo S, Velez ID. Citotoxic and antiparasitic activity from fruit skin of *annona muricata*. *J Fitot*. 2000; 71:183-186.
- Katakura K. Structural and functional analysis of the *la-mdr1* multidrug resistance gene in *L. amazonensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 255: 289- 294.
- Kazemi, B . Genomic Organization of *Leishmania* Species. *Iranian J Parasitol*. 2011; Vol. 6, No.3, , pp.1-18.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1974; v. 68, n. 4, p. 269.
- Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on leishmania parasitized raw 264.7 cells. *Phytochemistry*. 2005.
- Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Milonakis ME, Leontides L, Palizoupoulou Z, Bellinis L, et al. Randomised, blinded, placebo control clinical trial with allopourinol in canine Leishmaniasis. *Vet Parasit*. 2001; v. 98, p. 247-261.
- Kwon J, Park S H, Park C, Kwon S, Choi J S. Analysis of Membrane Proteome by Data-dependent LC-MS/MS Combined with Data-independent LC-MSE Technique *Journal of Analytical Science & Technology*. 2010; 1 (1), 78 – 85.

- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis- the Neotropical leishmânia species. In: Feg Cox, JP Kreier & D Wakelin (eds). Microb and Microbial Infec. 1998; Oxford university press, New York. Pp. 215.

- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. The Leishmaniasis in biology and medicine. 1987; In: Peters, W.; Killick- Kendrick, R. Florida: Adademic, 1: 1-20.

- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis and Leishmanias of the New World, with particular reference to Brazil. Bull Panam Heal Org, 1973; 7 (4): 1-19.

- Lainson R, Shaw JJ. The leishmaniasis. Volume I. Copyright Academic Press Inc. 1987; (London) 1-837.

- Lang T, Lecoeur H, Prina E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. Trends Parasitol. 2009; v.25, p.464-473.

- Launois P, Louis JA, Milon G. The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. Parasitol. 1997;115:S25–32.

- Leifso K, Cohen-Freue G, Murray A, Dogra N, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. Mol Biochem Parasitol. 2007;152:35–46.

- 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. 1999; 180: 564–567.

- Llanos-Cuentas EAL; Marsden PD, Lago EL, Barreto AC, Cuba CC, Johnson W D. Human Mucocutaneous Leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil. An area of *Leishmania brasiliensis* transmission. Cutaneous disease. Presentation and evolution. Rev Soc Bras Med Trop. 1984; 17:169-77.

- Lobo FF, da Silva SFA, Ferreira RS, Xavier e Silva LT, Aquino DS, Leite LM, et al. Avaliação da fagocitose das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* por macrófagos peritoneais de camundongos. Anais da 15ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. 2011; p.187.

- Lugo de Yarbuh A, Añez N, Petit de Peña Y, Burguera JL, Burguera M. Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with *Leishmania garnhami* and treated with meglumine antimoniate. Ann Trop Med Parasitol. 1994; 88: 37–41.

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

- Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(12):e912.

- Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. Clin Infect Dis. 2007;44(6):788-93.

- Magalhães HMTV, Costa JML, Costa RM, França F, Vale KC, Marsden P, et al. Mudança no comportamento cognitivo da atitude de uma população de região endêmica do sul da Bahia diante da Leishmaniose Tegumentar. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1990; 23 (1): 49-52.

- Martinez S, Marr JJ. Allopurinol in the treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *N Engl J Med.* 1992; 326:741-744.

- Molyneux D, Killick-Kendrick R. Morphology ultrastructure and life cycles. In "The leishmaniasis in biology and medicine". W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.). Academic Press, London.1987; 941 pp.

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

- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983; v. 65, p. 55-63.

- Motta JOC. Estudo comparativo da resposta imunológica e clínica entre a anfotericina B lipossomal e o N-metil glucamina em pacientes com a forma localizada da leishmaniose tegumentar americana (LTA) [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde; 2006.

- Muniz-Junqueira MI, de Paula-Coelho VN. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(12): 1633-8.

- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005; 366(9496): 1561-77.

- Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis (kal-azar): a decade of progress and future approach. *Int. J.infec. Dis.* 2000; v.4, n.3, p.158-177.

- Murray HW, Delph-Etienne S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocoline (miltefosine) in mice deficient in T cells and activates macrophage microbicidas mechanisms. *J of Infec Dis.* 2000; v.181, p. 795 799.

- Name RQ, Borges KT, Nogueira LSC, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. *An Bras de Der.* 2005; v. 80, n. 3, p. 249-254,.

- Nandan D, Yi T, Lopez M, Lai C, Reiner NE. Leishmania EF-1_ activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophages deactivation. *J Biol Chem.* 2002; 277:50190–7.

- Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, Ponte-Sucre A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29(6): 637-42.

- Nesaty VJ, Suter MJF. Analysis of environmental stress response on the proteome level. *Mass spectrometry Reviews.* 2008; v.27, p.556-574.

- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. AAA: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complex. *Genome Research.* 1999; 9(1): 27-43.

- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Costa SC, Pirmez C. Intralesional therapy of american cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil - an area of *Leishmania (V) braziliensis* transmission. Inter J of Der. 1997; v.36, n. 6, p. 463-468,.

- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive followup studies (up to 10 years). Am J Trop Med Hyg. 1997; 57: 651–655.

- Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. Lancet Infect Dis. 2005; 5(12):763-74.

- Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT. 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. 2001; 64: 187–93.

- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genome. Nature. 2000; v.405, n.6788, p. 837-46.

- Pasa S, Toz S, Voyvoda H, Ozbel Y. Clinical and serological followup in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconato. Vet Paras. 2005; v. 128, p. 243-249.

- Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degraive W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant specie infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Trop. 1999; 72 (3): 251-258.

- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007; 39: 839–847.

- Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(8):2397-403.

- Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel p-type phospholipid translocase from leishmânia involved in drug resistance. *J Biol Chem.* 2003; 278(50): 49965-71.

- Ponte, CB. Avaliação do efeito da miltefosine sobre a viabilidade e as funções de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde; 2011.

- Ramos CS, Franco FA, Smith DF, Uliana SR. Characterisation of a new *Leishmania* Meta gene and genomic analysis of the Meta cluster. *Fems Microbiology Letters.* 2004; Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 213–219.

- Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet.* 2007; v. 7, n.9, p. 581-596.

- Reithinger R. Protective saliva: sandfly spit delivers. *Trends Parasitol.* 2001; 17: 513.

- 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.* 1998; 66: 347–52.

- Rijal S, Yardley V, Chappuis F, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Boelaert M, et al. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome? *Microbes Infect.* 2007; 9(4): 529-35.

- Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol.* 1999; 85(2): 360-6.

- Rodrigues AM, Hueb M, Rodrigues-dos-Santos TAR, Fontes CJF. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(2): 139-145.

- Rodrigues JCF, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, Souza W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a 24(25) – sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 ; v.46, n.2, p. 487-499.

- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human *Leishmania (Viannia)* Infection. *J Infect Dis.* 2006; 193(10): 1375-83.

- Romero GA, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO. 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.* 2001a; 65: 456 -465.

- Saboia, J F. Ensaio Clínico do Miltefosine no Tratamento de Pacientes com Leishmaniose Mucosa [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências Médicas; 2011.

- Saldanha, R R de. 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.

- Sampaio RNR, Marchán EM, Venexat A, Tristão RJ, Marsden PD. Combined antimonial alluporinol therapy in mucosal leishmaniasis. Mem Instit Osw Cruz. 1990; 85:373 -374.

- Sampaio RNR, de Paula CD, Sampaio JH, Furtado ReS, Leal PP, Rosa TT, et al. The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(6):457-63.

- Sampaio RNR, Marsden PD. Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucantime, with liposomal amphotericin B. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(2):125-8.

- Sampaio RNR, Marsden PD, Furtado T, Sampaio JHD. Avaliação do tratamento da Leishmaniose Cutâneo-mucosa com três esquemas diferentes de antimoniais pentavalentes. An Bras Dermatol. 1989; 64:201-5.

- Sampaio RNR, Marsden PD, Furtado T, Sampaio JHD. Evaluation of the treatment with antimonials in American mucocutaneous Leishmaniasis. An Bras Dermatol. 1989;64(3):189-92.

- Sampaio RNR, Porto C, Motta J. Estudo comparativo entre o tratamento com anfotericina B lipossomal e n-metil-glucaminana forma cutânea de leishmaniose. Ver Soc Bras Med Trop. 2003; 37 (1): 223.

- Sampaio RNR, Soares SKP, Rosa AC, Netto EM, Magalhães EV, Marsden PD. Tratamento com pentamidina de seis casos de forma mucosa de leishmaniose tegumentar. An Bras Dermat. 1988; 63:439-442.

- Sampaio SAP, Castro RM, Dillon NL, Martins JEC. Treatment of cutaneous leishmaniasis with amphotericin b. A report of 70 cases. Int J Dermatol. 1991;10: 179 -181.

- Sampaio RNR, Marsden PD. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B lipossomal. Rev Soc Bras Med Trop. 1997; v. 30, n. 2, p. 125-128.

- Sampaio RNR, Lucas IC, Takami HL. Estudo da associação da miltefosina tópica com n-metil-glucamina no tratamento da leishmaniose causada por *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 37 (1): 223.

- Seifert K, Croft SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50 (1): 73–79.

- Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F, et al. Inactivation of the miltefosine transporter, Idmt, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(3):229-35.

- Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaiissi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42: 3097 -3102.

- Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; v. 41, n. 5, p. 972- 6.

- Sereno D, Lemesre JL. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol Res.* 1997; v. 83, n.4, p. 401-3.

- Shaw JJ, Lainson R, Ward R. Leishmaniasis in Brazil: VII. Further observations on the feeding habitats of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) with particular reference to its biting habits at different heights. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972; 66: 718-723.

- Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1975; 69:323-35.

- Silva D. Leishmaniose Anérgica hansenóide. *An Bras Derm.* 1978.53:161-168,

- Silva D. Leishmaniose tegumentar queloidiana com lesões ósseas. *An Bras Derm Sif.* 1958, 33: 3-7.

- Silva DG. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas [dissertação]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.

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

- Simpson L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. *Ann Rev Microbiol*. 1987; 41: 363-380.

- Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemot*. 2004; 10: 307–315.

- Slemmon, JR, Hughes, CM, Campbel, GA, Flood, DG. Increased levels of hemoglobin-derived and other peptides in Alzheimer's disease cerebellum. *J. Neurosc*. 1994; 4 (4), 2225-35.

- Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 1173–1186.

- Smith M, Blanchette M, Papadopoulou B. Improving the prediction of mRNA extremities in the parasitic protozoan *Leishmania*. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9: 158.

- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, et al. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 1266–72.

- Soto J, Rea J, Valderrama M, Toledo J, Valda L, Ardiles J, et al. Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 81(3):387-9.

- Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea I, Parra R, et al. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis*. 2007;44(3):350-6.

- Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J. Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72:421–2.

- Soto J, Valda-Rodriguez L, Toledo J, Vera-Navarro L, Luz M, Monasterios-Torrico H, et al. Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71(5): 577-81.

- Soto J, Toledo JT. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; v.7, n.1, p.7-7.

- Spath GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 9258-9263.

- Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004; v.5, n.9, p. 699-711.

- Sundar S, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai M, Murray HW. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin infect dis*. 2004; 38: 377-383.

- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 1104–7.

- Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001; 6:849–54.

- Sussulini, A. Avaliação das alterações proteicas e metaloproteicas em soja apos o processo de modificação genética [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química; 2007.

- Teixeira AC, Paes MG, Guerra J de O, Prata A, Silva-Vergara ML. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008; 50(3): 157-60.

- Teixeira EM, Galuppo MK, Rabelo A, et al. Miltefosina *in vitro* é ativa sobre as espécies de *Leishmania* spp. de importância nosológica no Brasil. In:XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses. 2007; p. 52.

- Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Kumar N, Kumar P, Hassan SM, et al. Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998; 92(5): 561-9.

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

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

- Torres-Cisneros J, Villanueva JL, Kindelan JM, Jurado R, Sanchez-Guijo P. Successful treatment of antimony – resistant leishmaniasis with liposomal amphotericin b in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1993; 17:625-627.

- Tripathi A, Gupta CM. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in Leishmania promastigotes. Mol Biochem Parasitol. 2003; 128: 1-9.

- Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MI, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. Clin immunol. 2008; 128(3), pp: 442-6.

- Van den Enden E, Van Gompel A, Stevens A, Vandeghinste N, Le Ray D, Gigase P, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with oral itraconazole. Int J Dermatol. 1994;33:285-6.

- Vergnes B, Gourbal B, Girard I, et al. A proteomic screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in Leishmania donovani clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. Mol Cell Proteomics. 2007; 6:88–101.

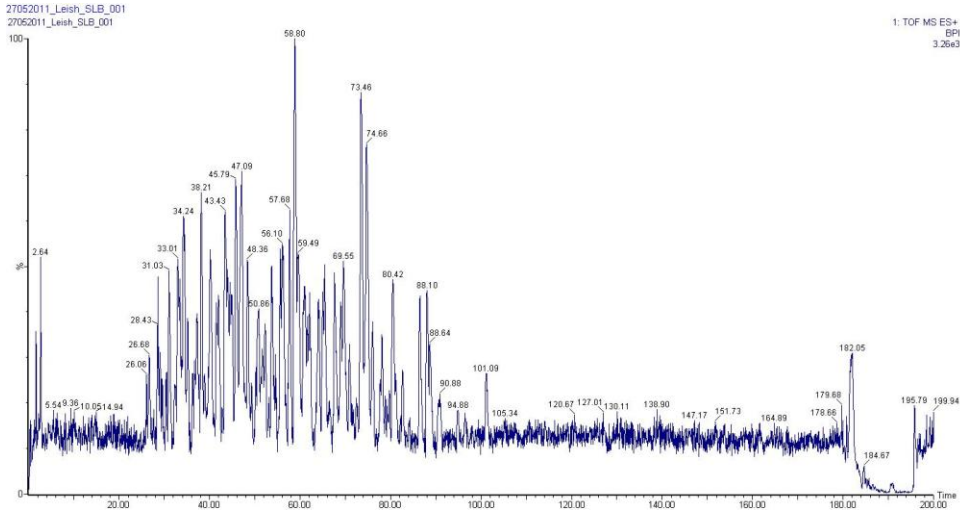
- Vianna, G. Comunicação à Sociedade Brasileira de Dermatologia. Arq. Bras. Med. 1912; v. 2, p. 426.

- Vickers TJ, Wylie SH, Fairlamb AH. *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. J Biol Chem. 2004; 279:49003–9.

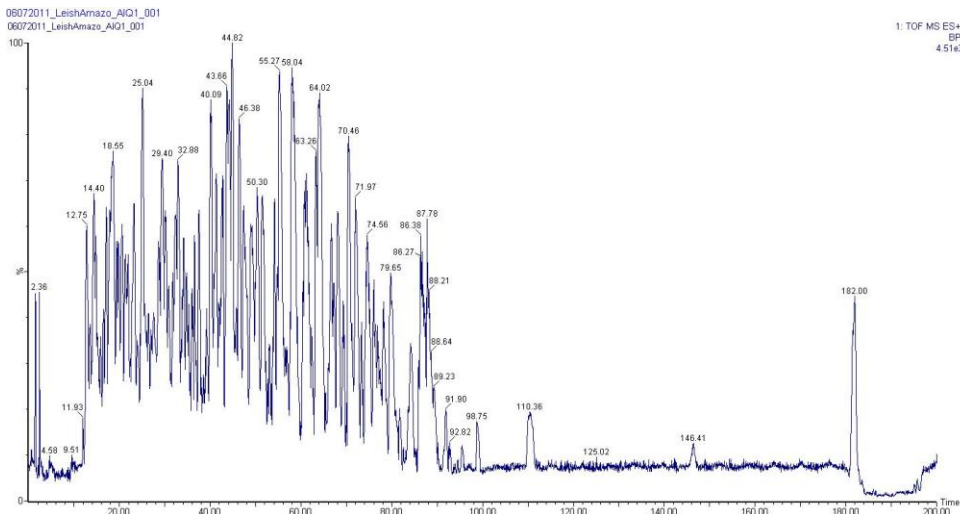
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnonology*. 1996; v.14, n.1, p.61-65.
- Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pagès M, Jauffret Y, Dedet JP, et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24: 1688-1694.
- Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, et al. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 73(2): 272-5.
- Zauli-Nascimento RC. 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.
- Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, Matos N, et al. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol*. 2007; 156(6):1328-35.

APÊNDICE A

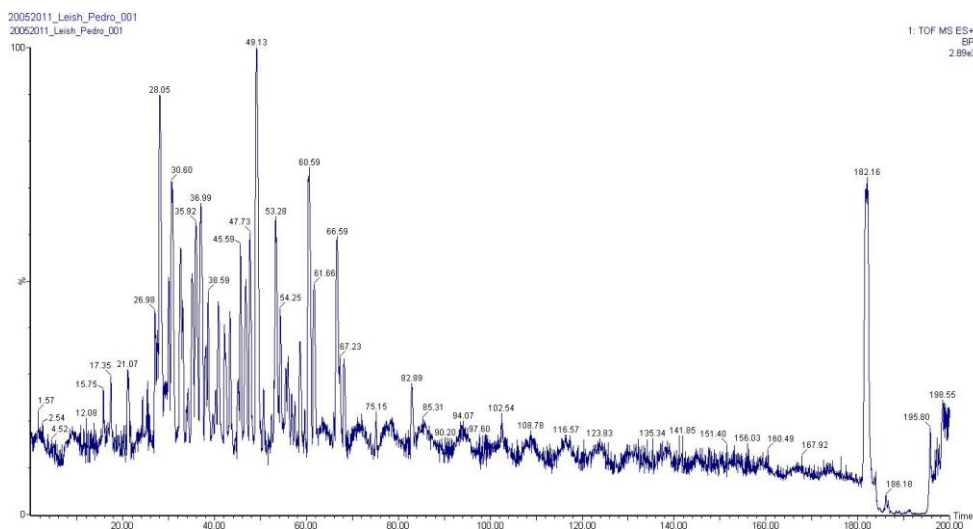
Cromatograma de proteínas totais de *L.(L.) amazonensis* do isolado do paciente portador de LCD.



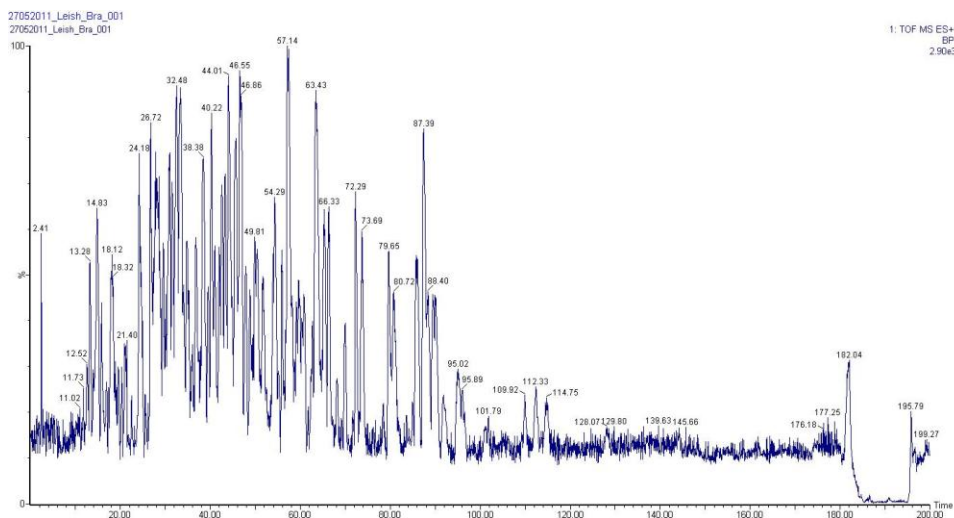
Cromatograma de proteínas totais de *L.(L.) amazonensis* padrão.



Cromatograma de proteínas totais de *L.(V.) braziliensis* do isolado do paciente portador de LCM.



Cromatograma de proteínas totais de *L.(V.) braziliensis* padrão.



Quantificação de formas prosmastigotas por absorvância– Teste MTT

- *L.(L.) amazonensis* padrão

Concentração	Glucantime	Pentoxifilina	Miltefosine	Ambisome	Itraconazol	Alopurinol
	Média	Média	Média	Média	Média	Média
0	0,487	0,428	0,195	0,220	0,301	0,370
6	0,571	0,466	0,191	0,205	0,302	0,200
12	0,425	0,650	0,179	0,160	0,292	0,229
23	0,401	0,721	0,157	0,166	0,312	0,246
47	0,617	0,544	0,175	0,168	0,321	0,222
94	0,512	0,624	0,179	0,168	0,254	0,186
188	0,445	0,509	0,258	0,181	0,307	0,191
375	0,465	0,543	0,283	0,225	0,308	0,156
750	0,530	0,422	0,385	0,199	0,506	0,142
1500	0,389	0,306	0,472	0,215	0,753	0,165
3000	0,420	0,287	0,296	0,160	0,500	0,124

- *L.(L.) amazonensis* isolado paciente

	Glucantime	Pentoxifilina	Miltefosine	Ambisome	Itraconazol	Alopurinol
	Média	Média	Média	Média	Média	Média
0	0,719	0,760	0,444	0,498	0,534	0,967
6	0,452	1,065	0,269	0,534	0,667	0,462
12	0,689	0,764	0,290	0,560	0,480	0,472
23	0,841	1,000	0,288	0,280	0,667	0,827
47	0,723	0,830	0,372	0,348	0,627	0,811
94	0,889	1,202	0,416	0,305	0,615	0,545
188	0,867	0,827	0,552	0,392	0,901	0,474
375	0,728	0,963	0,620	0,453	0,770	0,414
750	0,766	0,705	0,777	0,476	0,529	0,306
1500	0,465	0,558	1,005	0,400	1,000	0,223
3000	0,448	0,580	0,856	0,325	1,120	0,248

Quantificação de formas amastigotas axênicas por absorbância– Teste MTT

amastigota axênica - *L. amazonensis* padrão MTT

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,119	0,186	0,141	0,167	0,140	0,205	0,204	0,240	0,165	0,202	0,267	0,053
B	0,069	0,147	0,100	0,137	0,144	0,177	0,164	0,166	0,248	0,229	0,172	0,073
C	0,103	0,095	0,084	0,130	0,144	0,155	0,199	0,145	0,119	0,175	0,200	0,078
D	0,050	0,153	0,067	0,148	0,153	0,159	0,143	0,168	0,135	0,166	0,179	0,118
E	0,102	0,124	0,151	0,131	0,123	0,169	0,152	0,163	0,141	0,168	0,211	0,091
F	0,051	0,100	0,100	0,157	0,138	0,160	0,129	0,149	0,152	0,165	0,180	0,121
G	0,294	0,247	0,182	0,211	0,226	0,207	0,196	0,230	0,229	0,222	0,198	0,148
H	-0,012	0,000	0,012	0,133	0,113	0,160	0,141	0,151	0,156	0,164	0,288	0,178

amastigota axênica - *L. amazonensis* isolado paciente

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,673	0,637	0,715	0,658	0,625	0,626	0,728	0,699	0,527	0,622	0,501	0,043
B	0,542	0,613	0,871	0,596	0,661	0,634	0,697	0,757	0,745	0,719	0,649	0,051
C	0,707	0,823	0,701	0,886	0,888	0,707	0,788	0,871	0,803	0,821	0,771	0,032
D	0,699	0,693	0,599	0,625	0,510	0,647	0,649	0,735	0,340	0,630	0,508	0,079
E	0,668	0,704	0,711	0,644	0,702	0,707	0,733	0,706	0,700	0,722	0,709	0,077
F	0,631	0,677	0,607	0,670	0,696	0,659	0,648	0,734	0,528	0,632	0,616	0,090
G	0,578	0,578	0,609	0,628	0,646	0,603	0,641	0,630	0,634	0,633	0,518	0,007
H	-0,021	0,015	0,006	0,586	0,491	0,556	0,620	0,621	0,529	0,573	0,443	0,116

Cinética de Infecção

pH8	Paciente	pH8	Paciente	pH8	Paciente	pH8	Paciente
% mac c/ leish	% mac c/ leish	% mac c/ leish	% mac c/ leish	% mac c/ leish	% mac c/ leish	% mac c/ leish	% mac c/ leish
1h	1h	3h	3h	5h	5h	8h	8h
5,0	0,5	0,5	75,0	4,0	65,0	8,0	70,0
3,5	0,5	38,5	65,0	33,0	61,5	24,5	90,0
3,0	5,0	9,5	80,0	15,5	62,5	27,0	63,0
6,5	75,0	6,0	60,5	12,0	72,5	32,0	57,5
2,0		16,0		15,5		29,5	
9,5		43,0		34,0		18,0	
		10,5		14,5			
				26,5			

pH8	Paciente	pH8	Paciente	pH8	Paciente	pH8	Paciente
Média fagocitose	Média fagocitose	Média fagocitose	Média fagocitose	Média fagocitose	Média fagocitose	Média fagocitose	Média fagocitose
1h	1h	3h	3h	5h	5h	8h	8h
1,10	1,00	1,00	0,30	1,00	0,37	2,38	1,39
2,29	1,00	4,40	0,35	4,20	0,46	2,71	1,11
1,17	2,00	1,53	0,25	2,29	0,46	2,09	2,11
1,69	0,27	3,33	0,41	4,88	1,33	2,39	2,05
1,25		1,31		3,52		4,25	
3,11		2,66		4,66		3,47	
		3,43		2,62			
				5,17			

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

Mean	0,5700	0,3200	0,9033	0,8500	1,600	2,350	2,617	3,850	3,980	4,310	5,183	3,950	3,900	3,780
SD	0,3360	0,0200	0,2815	0,02000	0,5766	0,1400	0,5516	0,1600	0,5456	0,1600	1,255	0,1400	0,5268	0,1800

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes

Curva de crescimento de *L. (V.) braziliensis*

Mean	0,8933	0,1367	1,633	0,1967	2,647	0,2367	4,750	0,4467	5,980	0,5000	4,070	0,6967	2,847	1,010
SD	0,3580	0,01528	0,8312	0,005774	1,479	0,01528	1,895	0,005773	2,324	0,01429	0,02517	1,448	0,01000	

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes