

CAROLINE RICCE ESPADA

**Suscetibilidade à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*:
caracterização fenotípica e investigação das bases envolvidas na redução de
suscetibilidade ao fármaco**

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno- Hospedeiro

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

Versão Original

SÃO PAULO

2020

RESUMO

ESPADA, C. R. **Suscetibilidade à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*: caracterização fenotípica e investigação das bases envolvidas na redução de suscetibilidade ao fármaco.** 2020. 169 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar no Brasil, onde *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o principal agente etiológico da doença, é o antimoniato de meglumina, de uso parenteral e com eficácia tão baixa quanto 50% em algumas regiões do país. Com o objetivo de avaliar o potencial da miltefosina para o tratamento de leishmaniose tegumentar no Brasil, caracterizamos a suscetibilidade de 16 isolados clínicos brasileiros e duas cepas referência de *L. (V.) braziliensis* a este fármaco. Observamos variabilidade caracterizada por valores de EC_{50} 6 e 15 vezes maiores, em formas promastigota e amastigota, respectivamente, entre os isolados mais e menos suscetíveis ao fármaco. Buscamos entender as bases moleculares envolvidas nessas diferenças de suscetibilidade intrínseca através da caracterização, nesses isolados, de alguns dos mecanismos de resistência à miltefosina mais conhecidos em *Leishmania*. Para isso, elegemos os isolados com menor e maior EC_{50} em paralelo à cepa referência. Observamos diferenças na velocidade de entrada do fármaco e de sua acumulação entre os isolados, que se revelaram reduzidas nos isolados menos suscetíveis quando comparados com isolados mais suscetíveis e a cepa referência. Polimorfismos nos genes que codificam a maquinaria de transporte de miltefosina e diferenças nas taxas de efluxo/metabolismo, “fitness” e compartimentalização de fármacos não apresentaram um padrão que pudesse ser correlacionado à diferença de susceptibilidade ao fármaco. Com o objetivo de ampliar a busca por mecanismos de modulação da suscetibilidade à miltefosina nestes isolados, obtivemos o sequenciamento dos transcriptomas, que revelou a presença de 36 genes diferencialmente expressos entre os isolados polares. Dentre eles observamos um aumento na abundância do mensageiro que codifica a proteína Ros3 no isolado mais suscetível. Essa proteína compõe o complexo transportador MT-Ros3, considerado como a principal via de entrada de miltefosina em *Leishmania*. Portanto, as diferenças na suscetibilidade e absorção de miltefosina poderiam estar relacionadas à abundância de Ros3. Demonstramos que a abundância de mRNA *Ros3* e o número de cópias do gene eram maiores no isolado mais sensível. Para a validação funcional do papel da dosagem gênica de *Ros3* na diferença de suscetibilidade à miltefosina utilizamos duas abordagens, a superexpressão de *Ros3* no isolado menos sensível à miltefosina e em *L. (L.) major* e o nocaute parcial e completo deste gene em *L. (L.) major*. Observamos um aumento de pelo menos 40 vezes na abundância de mRNA de *Ros3* nos superexpressores. No entanto, não houve redução significativa na EC_{50} desses parasitas para miltefosina. A deleção parcial ou completa deste gene, por sua vez, resultou em um aumento significativo de 3 e 20 vezes, respectivamente, na EC_{50} de *L. (L.) major* para miltefosina, validando a participação da proteína Ros3 na expressão do fenótipo de suscetibilidade à miltefosina. Em conclusão, mostramos que variabilidade na suscetibilidade à miltefosina ocorre entre isolados clínicos de *L. (L.) braziliensis* independentemente de exposição prévia ao fármaco. Mostramos ainda que um dos fatores implicados nesse fenótipo é a modulação da abundância de Ros3 ao mesmo tempo que evidenciamos que essa proteína não é a única responsável pela suscetibilidade dos parasitas.

Palavras-chave: Leishmaniose. Tratamento. Miltefosina. Isolados de *L. (V.) braziliensis*. Suscetibilidade.

ABSTRACT

ESPADA, C. R. **Susceptibility to miltefosine in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates: phenotypic characterization and investigation of the basis involved in reduced susceptibility to the drug.** 2020. 169 p. Ph. D. thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The first choice drug for leishmaniasis treatment in Brazil, where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main etiological agent, is meglumine antimoniate, which is used by the parenteral route. Its efficacy can be as low as 50% in some Brazilian regions. Aiming to evaluate the potential of miltefosine for tegumentary leishmaniasis treatment in Brazil, we've characterized the susceptibility of 16 Brazilian clinical isolates and two reference strains of *L. (V.) braziliensis* to this drug. Susceptibility measured by EC₅₀ varied by 6 and 15-fold, in promastigotes and amastigotes, respectively. Aiming to understand the molecular bases involved in determining the intrinsic susceptibility in these isolates, we chose the isolates presenting the lowest and highest EC₅₀ for the characterization of some of the known mechanisms of resistance to miltefosine in *Leishmania*. We observed differences in the speed of drug uptake and accumulation between the isolates, which were reduced in the less susceptible when compared to more susceptible isolates and the reference strain. Polymorphisms in the genes coding for the miltefosine transport machinery and differences in the efflux/metabolism, fitness and drug compartmentalization rates did not show a pattern that could be correlated to the differences in drug susceptibility. In order to expand the search for mechanisms modulating susceptibility to miltefosine in these isolates, we looked at their sequenced transcriptome, which revealed the presence of 36 differentially expressed genes between the polar isolates. Among them, we observed an increase in the abundance of Ros3 encoding RNA in the most susceptible isolate. The Ros3 protein is a component of the MT-Ros3 transporter complex, considered as the main route of miltefosine entry in *Leishmania*. Therefore, the abundance of Ros3 could be related to differences in miltefosine uptake and susceptibility. We demonstrated that the abundance of Ros3 mRNA and gene copy number were increased in the most sensitive isolate. For the functional validation of the role of *Ros3* gene dosage in the differential susceptibility to miltefosine we used two approaches, the overexpression of Ros3 in the less sensitive isolate and in *L. (L.) major*, and the partial and complete knockout of this gene in *L. (L.) major*. The abundance of Ros3 mRNA was increased at least 40-fold in overexpressing clones. However, there was no significant reduction in the EC₅₀ for miltefosine in these parasites. The partial or complete deletion of *Ros3*, in turn, resulted in a significant increase of 3 and 20 times, respectively, in the EC₅₀ of miltefosine in mutant *L. (L.) major*, validating the participation of the Ros3 protein in the susceptibility phenotype to miltefosine. In conclusion, we showed that susceptibility to miltefosine varies among clinical isolates of *L. (V.) braziliensis* regardless of previous exposure to the drug. Our data indicate that Ros3 cannot be considered the only player modulating *Leishmania* susceptibility to miltefosine. Nonetheless, we unequivocally showed that the modulation of Ros3 abundance is one of the factors involved in this phenotype.

Keywords: Leishmaniasis. Treatment. Miltefosine. *L. (V.) braziliensis* isolates. Susceptibility.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leishmania*, o parasito.

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários flagelados, pertencentes à família Trypanosomatidae e a ordem Kinetoplastida (ESPINOSA *et al.*, 2018). Essa ordem abriga organismos que apresentam uma organela exclusiva chamada cinetoplasto, localizada na região anterior do parasito, próxima ao bolso flagelar. Essa organela, que dá nome à ordem, contém moléculas de DNA circulares (os maxicírculos e os minicírculos) que correspondem ao DNA mitocondrial nesses organismos (NEUBER, 2008).

Até o momento 53 espécies de *Leishmania* foram descritas e se dividem em 4 subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia* (ESPINOSA *et al.*, 2018).

1.1.1. Morfologia

As principais formas morfológicas deste parasita heteroxeno são promastigota e amastigota (Figura 1) (REY, 2008). Apesar das modificações de tamanho, forma e principalmente do comprimento do flagelo, a estrutura e composição celular do parasita não apresenta grandes variações ao longo do seu ciclo de vida (SUNTER; GULL, 2017).

As leishmânias apresentam um único núcleo, circundado pelo retículo endoplasmático. Uma mitocôndria única afilada se alonga da região anterior até a posterior pela lateral do núcleo, assim como um complexo de lisossomos chamado tubo multivesicular (Figura 1). Na porção mais anterior localiza-se o cinetoplasto e o complexo de Golgi, nas proximidades do bolso flagelar, de onde emerge o flagelo (BESTEIRO *et al.*, 2007) (Figura 1). É no bolso flagelar que ocorrem majoritariamente os processos de endocitose e exocitose (LACOMBLE *et al.*, 2009).

Com relação à morfologia, as promastigotas, no geral, apresentam corpo celular afilado e longo, com flagelo externalizado que se estende além do bolso flagelar e está envolvido na motilidade, adesão e percepção do ambiente. Já as amastigotas são menores, arredondadas e apresentam um curto flagelo com uma pequena ponta exposta para além do

bolso flagelar, envolvido em funções sensoriais, estando permanentemente em contato com a membrana do vacúolo parasitóforo no interior do macrófago (SUNTER; GULL, 2017).

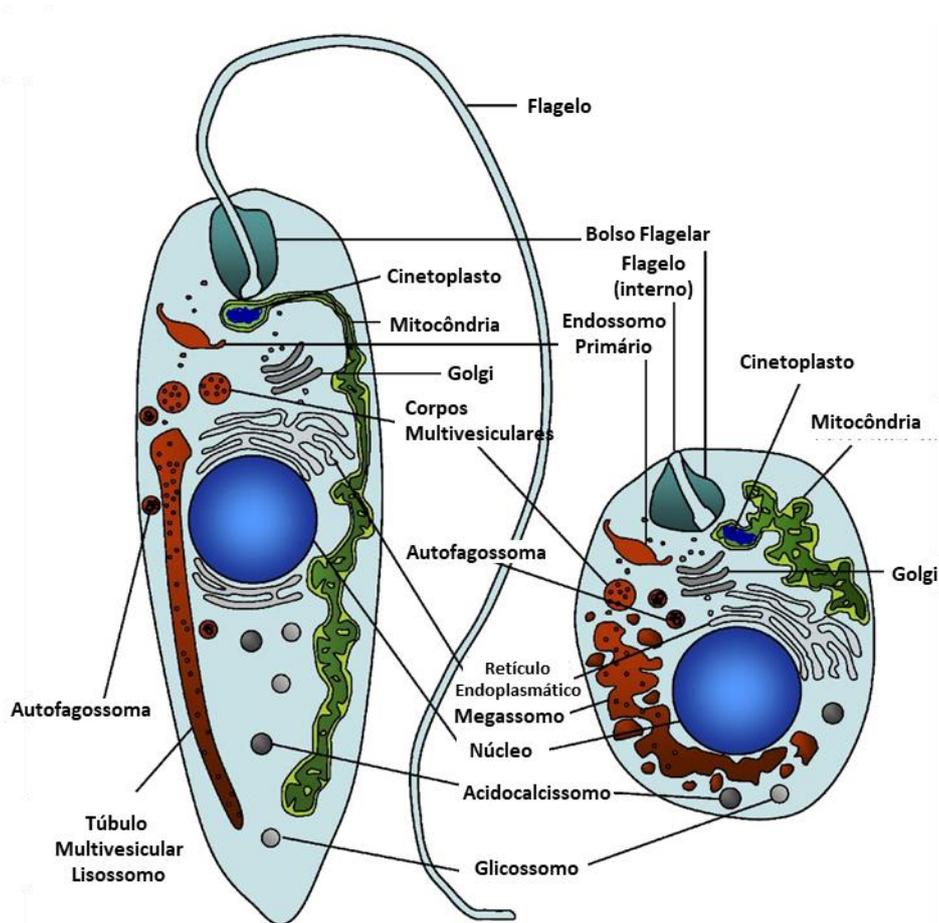


Figura 1 – Morfologia e componentes celulares nas principais formas do parasita *Leishmania*. À esquerda a forma promastigota e à direita a amastigota. Figura adaptada de BESTEIRO *et al.* (2007).

1.1.2. Genoma e expressão gênica

Os parasitas da família Trypanosomatidae apresentam peculiar organização genética entre os eucariotos. Seu genoma de aproximadamente 32 mega bases se organiza em 34-36 cromossomos que variam em ploidia entre espécies, e até mesmo entre cepas de uma mesma espécie (BEVERLEY, 1991; IVENS *et al.*, 2005; LYPACZEWSKI *et al.*, 2018; ROGERS *et al.*, 2011; TRYTRIPDB, 2019). Seus aproximadamente 9300 genes, em sua maioria, não possuem íntrons e nem promotores para RNA Polimerase II (RNA PolII), de modo que a regulação da expressão gênica nesses organismos ocorre por processos pós transcricionais ou como consequência de variações no número de genes causadas por eventos de duplicação

gênica ou cromossômica (IVENS *et al.*, 2005; MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2003; ROGERS *et al.*, 2011; TRYTRIPDB, 2019).

A transcrição é feita em unidades policistrônicas, de modo que vários genes, não necessariamente com funções relacionadas, são transcritos em um único policistron (CLAYTON, 2016). Modificações estruturais da cromatina em regiões de convergência ou divergência de transcrição nas duas fitas indicam os sítios de iniciação e terminação do processo (SIEGEL *et al.*). O processamento dos policistrons em RNAs mensageiros (mRNA) individuais se dá por “trans-splicing”. Nesse processo, uma sequência líder (SL) portadora da trimetil guanosina é adicionada à extremidade 5’ dos transcritos protegendo o mRNA contra degradação (CLAYTON, 2016). A adição dessa sequência sinaliza o sítio de poliadenilação na extremidade 3’ do gene imediatamente anterior. O mRNA maduro é então transportado para o citoplasma onde será traduzido em proteína (LEBOWITZ *et al.*, 1993; MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2003).

A falta de promotores individuais para início de transcrição pela RNA Pol II faz com que a regulação da expressão gênica aconteça principalmente de forma pós transcricional, podendo ocorrer através de regulação do processamento, estabilidade, transporte e taxa de tradução dos mRNAs maduros. Alguns desses mecanismos regulatórios são dependentes de motivos presentes em sequências das regiões não traduzidas (UTRs) desses transcritos (CLAYTON, 2019; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; REQUENA, 2011). Outros mecanismos de regulação gênica envolvem ainda as proteínas ligantes de RNA (RBP) e os RNA não codificantes de proteínas (ncRNAs) que interagem com os transcritos regulando, dentre outros, sua estabilidade e taxa de tradução (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; MICHAELI *et al.*, 2012).

1.1.3. Ciclo de vida

Durante seu ciclo de vida, o parasita digenético *Leishmania* sp. coloniza dois hospedeiros e passa por modificações morfológicas que são essenciais para sua sobrevivência nesses dois ambientes com características distintas. Os hospedeiros invertebrados são dípteros flebotomíneos pertencentes à família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Dos seis gêneros desta subfamília, dois, *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo, estão principalmente envolvidos na transmissão de leishmânia para o hospedeiro vertebrado

(AKHOUNDI *et al.*, 2016). Os hospedeiros vertebrados são os reservatórios do parasita e variam de acordo com a espécie de *Leishmania*, podendo ser répteis e pequenos ou grandes mamíferos, dentre eles o homem (BATES, 1994).

Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, flebotomíneos fêmea ingerem juntamente com o sangue, macrófagos contendo a forma amastigota de *Leishmania*. No interior do vetor, dentro da matriz peritrófica, as formas amastigotas intracelulares transformam-se em promastigotas procíclicas que possuem corpo celular alongado, flagelo externalizado e intensa atividade proliferativa (Figura 2). As promastigotas procíclicas transformam-se em promastigotas nectomonas e evadem a matriz peritrófica, antes que essa seja eliminada juntamente com as fezes, fixando-se pelo flagelo ao epitélio do intestino do vetor (BATES, 1994). As promastigotas nectomonas se desprendem desse epitélio e migram para a região anterior dos flebotomíneos transformando-se em promastigotas leptomonas. Ainda na região anterior, na válvula estomodeal, parte da população passa pelo processo de metacicloênese transformando-se em promastigotas metacíclicas e migrando para a probóscide do flebotomíneo. Os demais parasitas transformam-se em promastigotas haptomonas e aderem à válvula estomodeal. Nesse momento acontece também a produção do gel secretado por promastigotas (PSG), composto de proteofosfoglicanas, que juntamente com as promastigotas metacíclicas na probóscide, formam um plugue. Esse aglomerado de parasitas e PSG no aparelho bucal do flebotomíneo e na válvula estomodeal causa certa obstrução no momento do repasto sanguíneo provocando a regurgitação do material aspirado juntamente com as formas metacíclicas no local da lesão no hospedeiro vertebrado (ROGERS; BATES, 2007; ROGERS *et al.*, 2004) (Figura 2). As promastigotas metacíclicas, que são regurgitadas durante o repasto sanguíneo, apresentam corpo celular reduzido e flagelo alongado o que lhes confere maior motilidade, sendo essa a forma infectiva do parasita (BATES, 2007). Pensava-se que após a transformação em promastigotas metacíclicas, os parasitas não eram mais capazes de se multiplicar no hospedeiro invertebrado. No entanto, recentemente foi demonstrado por SERAFIM *et al.* (2018) e revisado por BATES (2018) que durante um novo repasto sanguíneo com sangue não infectado, as promastigotas metacíclicas que não são regurgitadas podem transformar-se de volta em uma forma similar às leptomonas, chamada retroleptomonas, voltando a multiplicar-se e produzir PSG, aumentando significativamente a carga parasitária transmitida ao hospedeiro vertebrado em repastos sanguíneos subsequentes (BATES, 2018; SERAFIM *et al.*, 2018).

Após a regurgitação no local da lesão, quando as promastigotas metacíclicas atingem a derme do hospedeiro vertebrado, são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, principalmente os macrófagos e neutrófilos (PETERS *et al.*, 2008). No hospedeiro vertebrado, os macrófagos são as células hospedeiras na qual as leishmânias se multiplicam. O parasita pode ser fagocitado diretamente por essas células ou ainda é capaz de invadir e sobreviver em neutrófilos. Alguns neutrófilos infectados têm sua apoptose retardada e os parasitas mantem-se vivos em seu interior (LASKAY; VAN ZANDBERGEN G FAU - SOLBACH; SOLBACH, 2003). Quando esses neutrófilos são fagocitados por macrófagos, isso ocorre de forma silenciosa, sem a ativação de mecanismos microbicidas, transferindo então os parasitas para o interior do macrófago. Esse fenômeno foi chamado “cavalo de Troia” e seria responsável por proteger o parasita e conduzi-lo para o interior da célula hospedeira (AGA *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2008). No interior dos macrófagos infectados, forma-se então um fagolisossomo denominado vacúolo parasitóforo, uma organela de pH ácido na qual é desencadeado o processo de transformação das formas promastigotas em amastigotas (Figura 2). Essa transformação é desencadeada pelo aumento de temperatura, redução de pH e captação de ferro, que leva à geração de espécies reativas de oxigênio, responsáveis também por desencadear essa transformação (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Essas formas sem flagelo externalizado, arredondadas, e de menor diâmetro (Figura 1) se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo e em certo momento ocorre o rompimento da célula hospedeira e liberação das amastigotas na corrente sanguínea possibilitando a infecção de novas células pelas amastigotas intracelulares e a colonização de células vizinhas, ou ainda sua ingestão por outros flebotomíneos durante o repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo (BATES; ROGERS, 2004) (Figura 2).

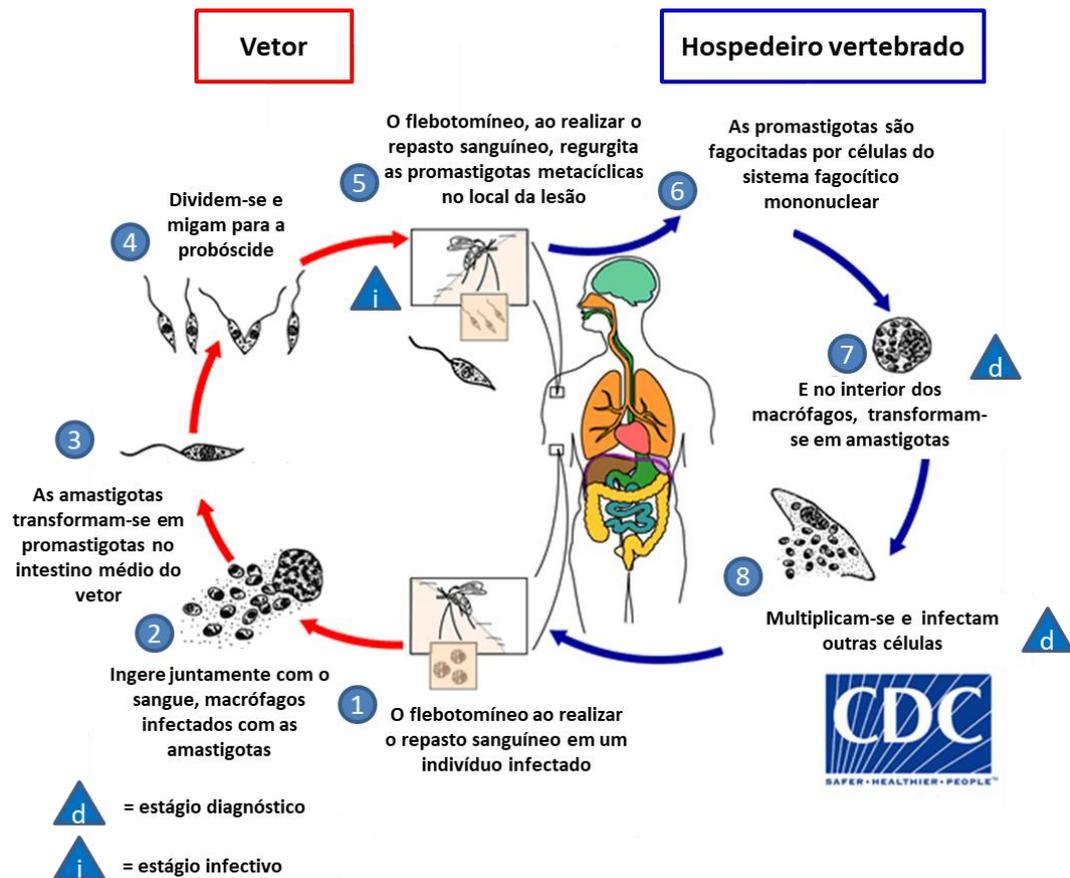


Figura 2 - Ciclo de vida simplificado do parasita *Leishmania*. (1) Durante o repasto sanguíneo o flebotomíneo (2) ingere juntamente com o sangue as formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos. (3) No intestino do vetor os macrófagos se rompem e liberam as formas amastigotas que se transformam em promastigotas procíclicas e multiplicam-se. (4) Posteriormente as promastigotas procíclicas migram para a região anterior do tubo digestivo do flebotomíneo onde passam pelo processo de metaciclogênese ao final do qual tornam-se a forma promastigota metacíclica, infectiva ao hospedeiro vertebrado. (5) Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita no local da lesão as promastigotas metacíclicas que são então (6) fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, e no interior do macrófago, no interior no vacúolo parasitóforo (7) transformam-se nas formas amastigotas (sem flagelo externalizado). As amastigotas multiplicam-se no interior dos macrófagos provocam o rompimento dessas células, infectando novos macrófagos (8), ou ainda são ingeridas pelo inseto vetor em um novo repasto sanguíneo (1). Figura adaptada de CDC (2019).

1.2. As leishmanioses

Após a entrada e proliferação da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, a infecção pode permanecer assintomática ou pode ainda resultar em uma variedade de manifestações clínicas. Isso vai depender, dentre outros fatores, da resposta imune do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* causadora da infecção (MURRAY *et al.*, 2005). Das 53 espécies de *Leishmania* descritas, 30 são parasitas de mamíferos sendo pelo menos 20 delas capazes de causar leishmaniose em seres humanos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; ESPINOSA *et al.*, 2018)

A leishmaniose ocorre em 98 países, com 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano e 350 milhões de pessoas sob risco de contrair a doença, que é responsável por 70 mil mortes ao ano (ALVAR *et al.*, 2012; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). As manifestações clínicas se dividem em dois grandes grupos: A leishmaniose visceral (Figura 3A) e a leishmaniose tegumentar (Figura 3B) (ASHFORD, 2000; REY, 2008).

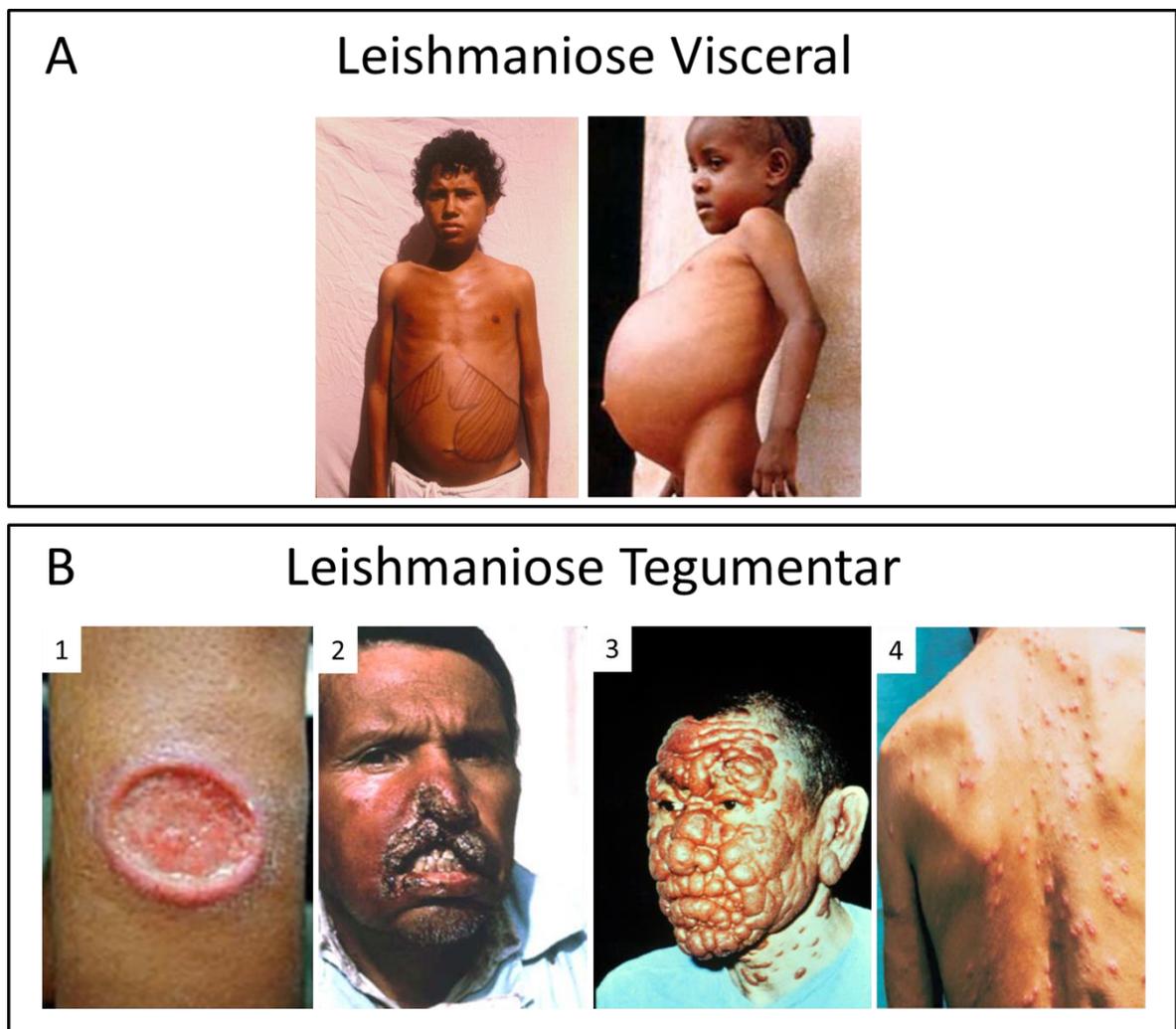


Figura 3 - Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmaniose visceral. (B) Espectro clínico da leishmaniose tegumentar: 1- leishmaniose cutânea localizada; 2- leishmaniose mucocutânea; 3- leishmaniose cutânea difusa e 4- leishmaniose cutânea disseminada.

1.2.1. Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença mundialmente distribuída com incidência estimada em 600 mil a 1 milhão de novos casos anuais. Desses, 95% ocorrem em

seis países, dentre eles o Brasil (WHO, 2019), onde a doença atinge uma média de 18-22 mil casos a cada ano (BRASIL, 2017a).

A LT ocorre quando o parasita coloniza células dos tecidos cutâneos e/ou mucocutâneos do hospedeiro, podendo a infecção, resultar em quatro diferentes manifestações clínicas, sendo elas: a leishmaniose cutânea ou cutânea localizada (LC ou LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea disseminada (LCDD) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (ASHFORD, 2000) (Figura 3B).

O quadro clínico da LCL caracteriza-se por uma pápula no local da picada do flebotomíneo. Essa pequena pápula evolui inicialmente para um nódulo progredindo posteriormente para lesões ulceradas de fundo granuloso e bordas elevadas (Figura 3B). Essas lesões podem em alguns casos evoluir para cura espontânea em 3-18 meses, mas as cicatrizes podem ser desfigurantes (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; HEPBURN, 2000). Aproximadamente 17 espécies de *Leishmania* foram evidenciadas como agentes etiológicos da LCL no mundo. No Brasil, os principais agentes etiológicos dessa doença são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989), no entanto ela também pode ser causada por *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi*, e *L. (L.) infantum*, que apesar de ser uma espécie relacionada majoritariamente com a forma visceral da doença, tem sido apontada, em estudos recentes, como agente etiológico também da forma tegumentar da doença (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018) (BRASIL, 2007).

Algumas espécies de *Leishmania* podem causar, além de LCL, formas mais severas da doença tegumentar. Apesar de não levar a óbito, o tratamento de LCL é recomendado, não somente para limitar o desenvolvimento da lesão, mas para minimizar o risco de uma manifestação clínica mais severa, uma vez que 2-5% dos casos de LCL podem progredir para a forma mucocutânea (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Essa forma da doença é mais comum nas Américas, onde é causada principalmente por *L. (V.) braziliensis*, a principal espécie causadora da leishmaniose no Brasil (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989). Outras espécies do subgênero *Viannia* também podem causar a forma mucocutânea da doença, que se caracteriza por um tropismo do parasita por tecidos mucocutâneos oral, nasal e faríngeo (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Nessa forma da doença, devido a uma resposta inflamatória exacerbada, a infecção por *Leishmania* leva à destruição do tecido mucoso podendo causar inclusive perda óssea do palato e destruição da região (NEUBER, 2008) (Figura 3B). A baixa carga parasitária no local das lesões mostra que a resposta montada pelo

sistema imune é capaz de controlar a proliferação parasitária, mas acaba por causar também a destruição do tecido (HEPBURN, 2000). A resposta ao tratamento desse quadro clínico não é boa e recidivas são observadas (BERMAN, 1996).

Outro quadro possível é a LCD, causada por *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) amazonensis* sendo a última de grande relevância no Brasil por ser a segunda principal espécie causadora de leishmaniose no país (AKHOUNDI *et al.*, 2016; GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989). Em indivíduos anérgicos a infecção por esses parasitas pode resultar em múltiplos nódulos espalhados por todo corpo, com alta carga parasitária em cada nódulo resultante da falta de controle da infecção (Figura 3B). Estas lesões são de difícil tratamento, uma vez que os pacientes apresentam uma resposta insatisfatória aos fármacos disponíveis e frequentemente apresentam exacerbação quando o tratamento é interrompido (HEPBURN, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A LCDD, por sua vez, é majoritariamente causada por *L. (V.) braziliensis*. Apesar das lesões estarem também presentes em várias regiões do corpo, como na LCD, nesse caso os indivíduos não são anérgicos e apresentam muitas lesões por todo o corpo, que podem ser ulceradas, papulosas, crostosas ou nodulares, com baixa carga parasitária por lesão e que podem vir a comprometer tecidos mucosos (SILVEIRA *et al.*, 2009) (Figura 3B).

Existe ainda a leishmaniose cutânea pós-kalazar associada a infecções por *L. (L.) donovani*, no velho mundo. Essa manifestação normalmente aparece após o tratamento da leishmaniose visceral causada por essa espécie do parasita, e consiste em múltiplas lesões nodulares. Há relatos de pacientes, no entanto, que nunca reportaram quadro clínico de leishmaniose visceral anterior à PKDL (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

1.2.2. Leishmaniose Visceral

Na leishmaniose visceral (LV) há um tropismo do parasita por órgãos como fígado, baço e medula óssea. Os pacientes apresentam quadro clínico de febre, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e perda de peso (Figura 3A). A doença é fatal em mais de 95% dos casos se não tratada. A co-infecção com o vírus HIV, que tem se tornado mais comum, provoca agravamento dos sintomas e da extensão da infecção e pior a resposta ao tratamento (BRASIL, 2014). A doença tem incidência estimada em 50.000 a

90.000 novos casos por ano e dez países, dentre eles o Brasil, apresentam 95% dos casos (WHO, 2019). No Brasil, no ano de 2017, aproximadamente 4 mil casos foram reportados, com uma taxa de letalidade de 8,8% (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE). A principal espécie causadora da leishmaniose visceral no Brasil é *L. (L.) infantum* (syn. *L. chagasi*) (BRASIL, 2017b).

1.3. Diagnóstico e caracterização molecular

O diagnóstico da doença baseia-se principalmente em exames parasitológicos e imunológicos. Os exames parasitológicos são feitos por busca do parasito em material biológico de lesão, medula óssea e baço ou ainda por cultivo e isolamento do parasito em meios de cultura (BRASIL, 2007). Já os métodos imunológicos utilizados são o teste intradérmico de Montenegro, que consiste na injeção intradérmica de antígeno de *Leishmania* sp. de modo a se avaliar uma resposta de hipersensibilidade tardia; e os testes sorológicos, que baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos pacientes por meio de ensaio imunoenzimático, imunocromatográfico ou de imunofluorescência indireta (BRASIL, 2007).

O diagnóstico molecular das leishmanioses baseia-se no uso das técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) tendo como alvos o DNA genômico ou o kDNA do parasita. Esse método é mais comumente usado em pesquisas científicas do que na rotina de áreas endêmicas, no entanto, se aplicado pode fortalecer o diagnóstico parasitológico e imunológico e ainda identificar inclusive a espécie causadora da doença no paciente, o que auxilia nos estudos de monitoramento epidemiológico, no entendimento da manifestação clínica da doença e em possíveis previsões do sucesso ou falha no tratamento (BANULS; HIDE; TIBAYRENC, 2002).

A caracterização molecular da espécie utilizando “polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição” (RLFP) baseia-se na amplificação de uma região do genoma que apresente regiões conservadas entre as espécies, permitindo assim sua amplificação por PCR utilizando os mesmos iniciadores, mas que apresente também regiões polimórficas, que após digestão com enzimas de restrição resultem em diferentes perfis de fragmentos na avaliação por eletroforese, ou que ainda possam ser discriminadas por sequenciamento (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Diferentes alvos moleculares já foram testados para utilização em diagnóstico de leishmaniose, dentre eles, os minicírculos do kDNA (SPITHILL; GRUMONT, 1984), o espaçador transcrito interno do DNA ribossômico (ITS) (CUPOLILLO *et al.*, 1995), os genes que codificam as proteínas META2 (ZAULI-NASCIMENTO *et al.*, 2010), glucose 6-fosfato desidrogenase (CASTILHO; SHAW; FLOETER-WINTER, 2003), “Heat Shock Protein 70” (hsp70) (MONTALVO *et al.*, 2012), gene que codifica o mini-exon (MARFURT *et al.*, 2003), dentre outros.

1.4. Tratamento

Não existem, até o momento, vacinas eficazes para a prevenção das leishmanioses em seres humanos.

No Brasil, o tratamento de leishmaniose se baseia no uso de três fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B (na forma de deoxicolato ou lipossomal) e a pentamidina. Esses fármacos apresentam uma série de limitações como elevada toxicidade, alto custo, administração parenteral obrigatória e baixa eficácia em algumas regiões do país.

1.4.1. Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de N-metilglucamina) são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose em alguns países, dentre eles o Brasil. Dentre os efeitos colaterais descritos estão: anorexia, pancreatite, toxicidade hepática e renal, mialgia e arritmias cardíacas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, esse medicamento não é indicado para gestantes, lactantes, crianças muito jovens, condições crônicas pré-existent e pacientes com hipersensibilidade ao fármaco (BALANA-FOUCE *et al.*, 1998; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). Devido à sua administração parenteral, muitos pacientes optam por abandonar o tratamento, o que pode favorecer o aparecimento de casos de resistência adquirida pelo parasito. De fato, os antimoniais pentavalentes já não são mais utilizados em regiões da Índia, onde, já na década de 1970, havia sido detectado o surgimento de parasitas resistentes, de modo que no início dos anos 2000 apenas 35% dos casos de leishmaniose visceral eram responsivos ao

tratamento com os antimoniais (CROFT; COOMBS, 2003; SUNDAR, 2001). Além disso, testes clínicos no Brasil mostram uma redução da eficácia deste fármaco no país, sendo a taxa de cura por volta de 50%-60% para leishmaniose cutânea (CHRUSCIAK-TALHARI *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2010).

1.4.2. Anfotericina B

A anfotericina B é o fármaco de segunda escolha para o tratamento de leishmaniose no Brasil. Assim como os antimoniais, o fármaco também requer administração parenteral e seus efeitos colaterais podem levar à falência renal. A formulação lipossomal do fármaco (AmBisome[®]) reduz o tempo de tratamento e a dose, sendo menos tóxica e melhor tolerada (DAVIDSON *et al.*, 1996). Esse fármaco tem apresentado os melhores resultados no tratamento de leishmaniose, no entanto possui um elevado custo sendo sua utilização inviável em áreas endêmicas. No Brasil, esse fármaco é prescrito apenas para crianças, idosos e outros grupos de risco (BRASIL, 2014; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005).

1.4.3. Pentamidina

A pentamidina é utilizada nos casos refratários ao tratamento com antimônio ou anfotericina B, ou ainda nos casos de infecção por *L. (V.) guyanensis*. No entanto, o fármaco apresenta as mesmas limitações dos demais, sendo ainda mais tóxico que os antimoniais e a anfotericina B, e também requerendo administração parenteral (CROFT; COOMBS, 2003; MURRAY *et al.*, 2005).

1.4.4. Miltefosina, o fármaco oral.

Apenas um fármaco em uso para o tratamento de leishmaniose pode ser administrado por via oral. A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é uma alquilfosfocolina, inicialmente sintetizada para tratamento de câncer, e que após demonstrar atividade contra *Leishmania* passou a ser largamente utilizada no programa de eliminação da leishmaniose visceral na

Índia, em substituição aos antimoniais pentavalentes, que apresentavam eficácia reduzida (JHA *et al.*, 1999; SUNDAR *et al.*, 2002).

Os efeitos colaterais da miltefosina são principalmente gastrointestinais, como náuseas, vômitos, diarreia, e desconforto abdominal. Além disso, o fármaco possui efeito teratogênico, o que impede sua utilização em gestantes e requer o uso de anticoncepcionais por mulheres em idade reprodutiva (DORLO *et al.*, 2012). Devido aos efeitos colaterais mais brandos, comparado às demais opções terapêuticas, menor custo comparado à anfotericina B lipossomal e à administração oral, que reduz a necessidade de hospitalização, diminuindo ainda mais os gastos do tratamento, a miltefosina tornou-se um fármaco promissor para o tratamento de leishmaniose.

Taxas de cura iniciais de 94% fizeram com que o fármaco fosse implementado na região do Bihar, na Índia, como monoterapia para o tratamento de LV em 2005. No entanto, uma década depois, observou-se um aumento nas taxas de recidiva, doze meses após o final do tratamento, em 10% e 20% na Índia e no Nepal, respectivamente (RIJAL *et al.*, 2013; SUNDAR *et al.*, 2012). Os parasitas recuperados de pacientes que apresentaram falha terapêutica, no entanto, não apresentaram diferenças na suscetibilidade *in vitro* à miltefosina quando comparados aos parasitas isolados de pacientes curados (RIJAL *et al.*, 2013) sendo a falha terapêutica relacionada principalmente a fatores do hospedeiro (RIJAL *et al.*, 2013; SEIFERT *et al.*, 2003). Em 2016, um isolado de *L. (L.) infantum* recuperado após tratamento com miltefosina, de paciente co-infectado com o vírus HIV, apresentou suscetibilidade *in vitro* reduzida quando comparada ao isolado recuperado do mesmo paciente antes do tratamento (MONDELAERS *et al.*, 2016). Outros dois isolados de *L. (L.) donovani* recuperados de pacientes com LV no subcontinente indiano em 2017 apresentaram redução da suscetibilidade *in vitro* quando comparados à cepa referência desta espécie. Foi observada também redução na suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *L. (L.) infantum* recuperados de pacientes que não responderam ao tratamento com miltefosina em comparação aos recuperados de pacientes curados (CARNIELLI *et al.*, 2019). Essas evidências chamaram a atenção para a possibilidade da falha terapêutica não estar relacionada apenas às características do hospedeiro, mas também do parasita.

Em relação à aplicação de miltefosina para o tratamento de leishmaniose tegumentar, a situação é mais complexa. Em 2004, a miltefosina foi aprovada na Colômbia para o tratamento da leishmaniose tegumentar após demonstrar eficácia semelhante aos antimoniais pentavalentes (SOTO *et al.*, 2004). Entretanto, a taxa de cura encontrada para infecções por *L.*

(*V.*) *braziliensis* tratadas com miltefosina mostrou-se variável em diferentes regiões geográficas, sendo de 33% na Guatemala (SOTO; BERMAN, 2006) e 70% na Colômbia (VELEZ *et al.*, 2010). Além da variabilidade geográfica intraespecífica, observa-se também uma variação na taxa de cura em uma mesma região geográfica (SOTO; BERMAN, 2006) o que pode estar relacionado com a alta variabilidade genética desta espécie (CUPOLILLO *et al.*, 2003; KUHLS *et al.*, 2013).

1.4.4.1. A miltefosina no Brasil

No Brasil dois estudos foram realizados para avaliar a eficácia de miltefosina no tratamento de leishmaniose cutânea. Um desses estudos foi realizado na Bahia em área de ocorrência de *L. (V.) braziliensis* e a eficácia observada foi de 70% (MACHADO *et al.*, 2010). Outro estudo, realizado em Manaus, mostrou eficácia de 71,4% no tratamento de infecções por *L. (V.) guyanensis* (CHRUSCIAK-TALHARI *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2010). Em ambos os estudos a miltefosina demonstrou taxa de cura superior aos antimoniais pentavalentes no Brasil, que apresentaram preocupantes 50% de sucesso. A miltefosina foi recomendada pelo Ministério da Saúde para uso em LT no Brasil em 2018 (BRASIL, 2018). No entanto, até o momento não se encontra disponíveis nas unidades do Sistema Único de Saúde.

Já para o tratamento da LV, apenas um teste clínico foi feito para avaliar o potencial da miltefosina. Baixas taxas de cura de aproximadamente 60%, muito inferiores aos 90% observados na Índia levaram à não aprovação do fármaco para o tratamento de LV no país (CARNIELLI *et al.*, 2019).

1.4.4.2. Mecanismo de ação da miltefosina

O mecanismo de ação mais aceito para a miltefosina está relacionado à interferência na biossíntese e metabolismo de lipídios interferindo na composição da membrana e nas vias de sinalização mediadas por essas moléculas. O tratamento com miltefosina leva à diminuição da síntese de fosfatidilcolina (PC) por interferir na atividade da CTP:fosfocolina citidiltransferase. Além disso, resulta em um aumento de fosfatidiletalona (PE) por

estimular a atividade da CTP:fosfoetanolamina citidiltransferase e/ou inibição da atividade da PE-N-metiltransferase (RAKOTOMANGA *et al.*, 2007). Outros estudos sugerem ainda que essa mudança no perfil dos fosfolipídios possa estar relacionada a uma inibição do transporte de colina exógena para dentro do parasita (ZUFFEREY; MAMOUN, 2002). Outra hipótese de mecanismo sugere que a miltefosina provoque uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial devido à inibição da citocromo-c oxidase, componente da cadeia de transporte de elétrons (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007). Além disso, o fármaco parece ter a capacidade de romper membranas intracelulares atuando como um detergente, podendo desencadear o processo de apoptose por ambas as vias (CROFT; SEIFERT; DUCHENE, 2003). Alguns trabalhos sugerem ainda uma ação imunomodulatória da miltefosina por se ligar aos receptores de IFN- γ aumentando a resposta a esta citocina e restaurando o equilíbrio Th1/Th2 por meio do estímulo da resposta Th1 mediada por IL-12, contribuindo para a morte do parasita intracelular (WADHONE *et al.*, 2009).

1.4.4.3. Mecanismos de resistência à miltefosina em *Leishmania*

Estudos sobre os possíveis mecanismos de resistência à miltefosina em *Leishmania* disponíveis na literatura baseiam-se principalmente no uso de parasitas selecionados *in vitro* na presença da miltefosina como ferramenta para obter linhagens resistentes. Neste modelo, o principal mecanismo de resistência envolve mutações em um translocador de membrana ATP-dependente responsável pelo transporte de fosfolipídios. Essa proteína da família das P4 ATPases, foi apontada como a principal via de entrada da miltefosina no parasita (PEREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003b). A inativação do gene que codifica o transportador de miltefosina (MT) em *Leishmania* por deleção gênica ou por mutações pontuais leva a um fenótipo de resistência ao fármaco (COELHO *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2014; PEREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003a; PEREZ-VICTORIA, F. J. *et al.*, 2006).

Para que o complexo MT seja inserido na membrana do parasita e funcione corretamente, é necessária a presença de outra proteína associada ao MT, denominada Ros3 (PEREZ-VICTORIA, F. J. *et al.*, 2006). A Ros3 é uma proteína pertencente à família Lem3p/CDC50. Essa família de proteínas demonstrou papel no transporte de fosfolipídios (HANSON *et al.*, 2003; SAITO *et al.*, 2004) e na suscetibilidade à edelfosina e miltefosina

em leveduras (HANSON *et al.*, 2003). Posteriormente, o papel desta proteína na suscetibilidade à miltefosina em *Leishmania* foi avaliado por PEREZ-VICTORIA, F. J. *et al.* (2006) que mostrou que o MT na ausência de Ros3 não é capaz de transportar o fármaco para o interior do parasita.

Um trabalho recente envolvendo isolados de *L. infantum* resistentes à miltefosina sugere que mutações ou deleções na Ros3 levam à inativação deste complexo, resultando também em um fenótipo de resistência à miltefosina (MONDELAERS *et al.*, 2016). Foi observado um também menor acúmulo do fármaco no interior de *L. donovani* resistente à miltefosina como resultado de um defeito na maquinaria de translocação de miltefosina para o ambiente intracelular através do complexo MT-Ros3 (PEREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003a; b; PEREZ-VICTORIA, F. J. *et al.*, 2006). Além disso, a superexpressão tanto do MT como da Ros3 parece resultar em um aumento do acúmulo intracelular de miltefosina e, portanto, da sensibilidade ao fármaco (SANCHEZ-CANETE *et al.*, 2009).

Em espécies do subgênero *Leishmania*, o gene *MT* está presente em cópia única, enquanto espécies do subgênero *Viannia* apresentam uma duplicação gênica nessa região. Em *L. (V.) braziliensis*, o gene *MT* (*LbrM13.1380*) e seu parálogo (*LbrM13.1400*) codificam proteínas com 98% de identidade na sequência de aminoácidos e localizam-se no cromossomo 13. Já o gene que codifica a subunidade Ros3 (*LbrM32.0580*) está localizado em cópia única no cromossomo 32 desta espécie. Os dados disponíveis na literatura permitem formular a hipótese de que polimorfismos nos genes *MT* e *Ros3* possam estar relacionados com as diferenças de suscetibilidade à miltefosina observadas em *L. (V.) braziliensis* (ESCOBAR *et al.*, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2014; OBONAGA *et al.*, 2014; SANCHEZ-CANETE *et al.*, 2009; YARDLEY *et al.*, 2005).

Em parasitas selecionados *in vitro* na presença do fármaco, é bem descrita a perda da capacidade de transportar miltefosina para o interior da célula via transportador de miltefosina. No entanto, parasitas resistentes a concentrações intermediárias de miltefosina (40 μ M) são mortos quando expostos a concentrações mais elevadas do fármaco (100 μ M), indicando que a atividade do fármaco se mantém mesmo em parasitas que possuem o transportador de miltefosina não funcional, sugerindo que possa haver outras vias de entrada do fármaco em *Leishmania* (PARIS *et al.*, 2004).

A miltefosina como um análogo de fosfolípídeo é capaz de se inserir em membranas lipídicas, sendo essa inserção facilitada em membranas mais fluidas (RAKOTOMANGA;

LOISEAU; SAINT-PIERRE-CHAZALET, 2004; RAKOTOMANGA; SAINT-PIERRE-CHAZALET; LOISEAU, 2005). Estudos comparativos entre cepas de *L.(L.) donovani* sensíveis e resistentes à miltefosina (selecionadas em pressão de droga) encontraram diferenças na composição de membrana destes parasitas. Parasitas refratários à miltefosina apresentaram conteúdo de cadeias alquila insaturadas reduzidas e uma menor fluidez de membrana dificultando assim a inserção do fármaco na membrana do parasita. Em relação aos esteróis, que representam 30% dos lipídios totais de *Leishmania*, parasitas resistentes à miltefosina apresentaram uma redução nos níveis de esteróis totais acilados no carbono 24, quando comparados a parasitas selvagens (RAKOTOMANGA; SAINT-PIERRE-CHAZALET; LOISEAU, 2005; ZHANG; BEVERLEY, 2010). Além disso, foi demonstrado também que existe uma variação no conteúdo de esteróis e fosfolipídios de membrana entre as diferentes espécies de *Leishmania*, o que poderia explicar a diferença de suscetibilidade à miltefosina encontrada entre as diferentes espécies (BEACH; HOLZ; ANEKWE, 1979; ESCOBAR *et al.*, 2002; GOAD; HOLZ; BEACH, 1984).

Alguns outros parâmetros como distribuição intracelular e metabolismo da miltefosina permanecem não elucidados. O único estudo envolvendo o metabolismo de miltefosina em *Leishmania* mostrou que este ocorre muito lentamente (PEREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003b). No entanto, o tempo máximo analisado foi de 6 horas sendo que em células tumorais, após 6 horas de tratamento apenas 5% da miltefosina havia sido metabolizada, e somente após 24 horas observou-se 64% de metabolização do fármaco (BROCHEZ *et al.*, 1999).

Outro mecanismo de resistência proposto para a miltefosina em *Leishmania* envolve o efluxo do fármaco mediado por transportadores de membrana pertencentes à família ABC. Esses transportadores ATP-dependentes atuam como “floppases” transportando a miltefosina do interior do parasita para o meio externo. Dois mecanismos envolvendo efluxo foram reportados em *Leishmania*: os transportadores ABCA1 e ABCA2 em *L. infantum* mostraram-se capazes de transportar fosfolipídios fluorescentes para o exterior do parasita; e a superexpressão do transportador MDR1, uma proteína de membrana semelhante às glicoproteínas P, resultou em um fenótipo de perda de sensibilidade à miltefosina e à edelfosina. Além disso, inibidores de glicoproteína P e outros inibidores que são capazes de se ligar a diferentes domínios da proteína MDR1 são capazes de recuperar o fenótipo de sensibilidade à miltefosina por inibir o efluxo do fármaco (PEREZ-VICTORIA, J. M. *et al.*, 2006; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2002).

4.5. Conclusões

Neste trabalho evidenciamos a existência de diferenças na suscetibilidade à miltefosina em isolados clínicos brasileiros de *L. (V.) braziliensis*, que nunca haviam sido expostos a este fármaco. A variabilidade observada levou a questionamentos acerca do mecanismo responsável pela maior tolerância à miltefosina apresentada por alguns isolados.

Variabilidade no acúmulo do fármaco por esses parasitas também foi demonstrada, mostrando-se inversamente correlacionado com suscetibilidade, sendo a quantidade de miltefosina no interior do parasita fator limitante para sua ação. Observamos também diferenças entre os isolados quanto ao acúmulo de fosfocolina, molécula à qual a miltefosina é análoga e que compartilha a mesma via de transporte, o complexo MT-Ros3. Isso sugeriu que a diferença de suscetibilidade e acúmulo nestes parasitas fosse resultado de diferenças nesta maquinaria de transporte.

Não foram observadas diferenças na compartimentalização do fármaco no interior dos isolados ou nas taxas de efluxo e/ou metabolismo de miltefosina. Não foram também encontradas modificações nas sequências dos genes que codificam as proteínas Ros3 e MT que estivessem correlacionadas com a diferença de suscetibilidade e acúmulo, evidenciando que o principal mecanismo de resistência à miltefosina observado em parasitas selecionados *in vitro* por pressão do fármaco não é responsável pela variabilidade observada entre os isolados.

O sequenciamento do transcriptoma destes isolados evidenciou 36 genes possivelmente implicados na diferença de suscetibilidade dos mesmos à miltefosina. Dentre eles, o gene que codifica a proteína Ros3, que compõe a principal via de transporte de miltefosina, apresentou maior abundância de transcritos no isolado mais sensível em comparação com os isolados menos sensíveis, sugerindo que as diferenças na abundância de Ros3 poderiam ser a causa das diferenças de suscetibilidade e acúmulo nesses isolados. A análise do número de cópias deste gene no genoma dos isolados polares revelou ainda que o isolado mais sensível apresenta maior número de cópias do gene *Ros3* em comparação aos demais.

Duas abordagens foram utilizadas para avaliar se o aumento no número de cópias de *Ros3* poderia influenciar a suscetibilidade à miltefosina. A superexpressão de *Ros3* no isolado mais tolerante, no entanto, não foi capaz de aumentar sua suscetibilidade, sugerindo que

outros mecanismos possam estar envolvidos na tolerância intrínseca desse isolado para miltefosina. Já a remoção de um alelo de *Ros3* em *L. (L.) major* resultou em diminuição da suscetibilidade e acúmulo de miltefosina e a remoção dos dois alelos praticamente impediu seu acúmulo e reduziu fortemente a suscetibilidade ao fármaco. Dessa maneira, confirmamos que a dosagem gênica de *Ros3* possui papel importante na suscetibilidade à miltefosina, ainda que o aumento isolado da abundância de mRNA *Ros3* não seja suficiente alterar esse fenótipo.

Os dados obtidos neste trabalho chamam a atenção para a dependência do mecanismo de transporte MT-*Ros3* para a suscetibilidade de *Leishmania* à miltefosina, mesmo em isolados clínicos nunca antes expostos ao fármaco e reforçam a necessidade de busca de moléculas alternativas, ou ainda de vias de entrega da miltefosina alternativas, que possam carrear o medicamento para o interior do parasita utilizando uma via independente, já que uma vez no interior no parasita, esse fármaco é efetivo.

Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos *in vitro* e é importante ter em mente que outros fatores além da suscetibilidade do parasita estão envolvidos no sucesso do tratamento. No entanto, estudos como esse devem servir de guia para o desenho de futuros testes clínicos. Tendo em vista a grande variabilidade na suscetibilidade de *L. (V.) braziliensis* para miltefosina, e sendo esta a principal espécie causadora da doença no Brasil, deve-se repensar, por exemplo, seu uso como monoterapia no tratamento de LT. A combinação da miltefosina com fármacos que possam potencializar seu efeito ou ainda facilitar seu transporte seria uma opção neste caso.

Os resultados da avaliação de suscetibilidade em *L. (V.) braziliensis* nos levaram a questionar se outras espécies de *Leishmania* de ocorrência no Brasil também apresentam variabilidade na suscetibilidade ao fármaco. Até o momento, apenas um teste clínico avaliando o potencial da miltefosina para o tratamento de LV foi feito e teve que ser interrompido devido às baixas taxas de cura obtidas, o que levantou o questionamento sobre a suscetibilidade de isolados clínicos brasileiros de *L. (L.) chagasi* à miltefosina. Essa avaliação foi feita por nós em colaboração com o DNDi (descrita no item 4.6.2) e evidenciou que nesta espécie a suscetibilidade à miltefosina é menos variável.

Em conclusão, o conhecimento sobre a suscetibilidade à miltefosina de isolados clínicos de pacientes com leishmanioses é uma ferramenta útil para a racionalização de testes clínicos o que aliado ao conhecimento sobre mecanismos de ação e resistência pode ainda ser

uma ferramenta importante para a seleção de associação de fármacos, ou ainda para modificação de vias de entrega, ou mesmo da estrutura do fármaco.

REFERÊNCIAS

- AGA, E.; KATSCHINSKI, D. M.; VAN ZANDBERGEN, G.; LAUFS, H. *et al.* Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J Immunol**, 169, n. 2, p. 898-905, Jul 15 2002.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTYPKA, J. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 3, p. e0004349, Mar 2016.
- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, 30, n. 12-13, p. 1269-1281, Nov 2000.
- BALANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen Pharmacol**, 30, n. 4, p. 435-443, Apr 1998.
- BANULS, A. L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 96 Suppl 1, p. S9-13, Apr 2002.
- BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp Parasitol**, 79, n. 2, p. 215-218, Sep 1994.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, 37, n. 10, p. 1097-1106, Aug 2007.
- BATES, P. A. Revising *Leishmania's* life cycle. **Nat Microbiol**, 3, n. 5, p. 529-530, May 2018.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med**, 4, n. 6, p. 601-609, Sep 2004.
- BEACH, D. H.; HOLZ, G. G., Jr.; ANEKWE, G. E. Lipids of *Leishmania* promastigotes. **J Parasitol**, 65, n. 2, p. 201-216, Apr 1979.
- BERMAN, J. D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Clin Dermatol**, 14, n. 5, p. 519-522, Sep-Oct 1996.
- BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int J Parasitol**, 37, n. 10, p. 1063-1075, Aug 2007.
- BEVERLEY, S. M. Gene amplification in *Leishmania*. **Annu Rev Microbiol**, 45, p. 417-444, 1991.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia no SUS. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**. 2018. Disponível em:

file:///C:/Users/carol/Downloads/Conitec_Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde, Sistema de informação de agravos de notificação, SINAN. **Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados 2017a**. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/Ita/bases/Itabrnet.def>. Acesso em: 20 Fev.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde, Sistema de informação de agravos de notificação, SINAN. **Leishmaniose Visceral - Casos confirmados 2017b**. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/Ita/bases/Itabrnet.def>. Acesso em: 20 Fev.

BRASIL, M. d. S. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília, 2007. Disponível em: http://www.crmv-mt.org.br/images/bt-arise/Artigos/manual_Ita_2ed.pdf. Acesso em: 23 ago. 2014.

BRASIL, M. d. S. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2014. Disponível em:

http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf. Acesso em: 22 Fev.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral#tratamento>. Acesso em: 15th June 2019.

BROCHEZ, V.; VAN HEUVERSWYN, D.; DINIZ, J. A.; DE POTTER, C. R. *et al*. Cellular uptake and retention measurements of alkylphosphocholines in the SK-BR-3 breast cancer and Molt-4 leukemia cell line using capillary gas chromatography. **Lipids**, 34, n. 5, p. 511-516, May 1999.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, 392, n. 10151, p. 951-970, Sep 15 2018.

CARNIELLI, J. B. T.; MONTI-ROCHA, R.; COSTA, D. L.; MOLINA SESANA, A. *et al*. Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 101, n. 4, p. 789-794, Oct 2019.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J Clin Microbiol**, 41, n. 2, p. 540-546, Feb 2003.

CDC. **Parasites - Leishmaniasis - Biology**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 27 Fev.

CHRUSCIAK-TALHARI, A.; DIETZE, R.; CHRUSCIAK TALHARI, C.; DA SILVA, R. M. *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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 84, n. 2, p. 255-260, Feb 2011.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open Biol**, 9, n. 6, p. 190072, Jun 28 2019.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, 156, n. 2, p. 93-101, Dec 2007.

CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Curr Opin Microbiol**, 32, p. 46-51, Aug 2016.

COELHO, A. C.; BOISVERT, S.; MUKHERJEE, A.; LEPROHON, P. *et al.* Multiple Mutations in Heterogeneous Miltefosine-Resistant *Leishmania major* Population as Determined by Whole Genome Sequencing. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 2, p. e1512, Feb 2012.

COELHO, A. C.; TRINCONI, C. T.; COSTA, C. H.; ULIANA, S. R. *In Vitro* and *In Vivo* Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 7, p. e2999, Jul 2014.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends Parasitol**, 21, n. 11, p. 508-512, Nov 2005.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, 19, n. 11, p. 502-508, Nov 2003.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHENE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 126, n. 2, p. 165-172, Feb 2003.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P. *et al.* Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. **J Clin Microbiol**, 41, n. 7, p. 3126-3132, Jul 2003.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S. M. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, 73, n. 1-2, p. 145-155, Jul 1995.

DAVIDSON, R. N.; DI MARTINO, L.; GRADONI, L.; GIACCHINO, R. *et al.* Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). **Clin Infect Dis**, 22, n. 6, p. 938-943, Jun 1996.

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 67, n. 11, p. 2576-2597, Nov 2012.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica** 81, n. 2, p. 151-157, Feb 2002.

ESPINOSA, O. A.; SERRANO, M. G.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, 145, n. 4, p. 430-442, Apr 2018.

FERNANDEZ, O. L.; DIAZ-TORO, Y.; OVALLE, C.; VALDERRAMA, L. *et al.* Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 5, p. e2871, May 2014.

GOAD, L. J.; HOLZ, G. G., Jr.; BEACH, D. H. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. **Mol Biochem Parasitol**, 10, n. 2, p. 161-170, Feb 1984.

GRIMALDI, G., Jr.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, 41, n. 6, p. 687-725, Dec 1989.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr Opin Microbiol**, 10, n. 6, p. 569-577, Dec 2007.

HANSON, P. K.; MALONE, L.; BIRCHMORE, J. L.; NICHOLS, J. W. Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. **J Biol Chem**, 278, n. 38, p. 36041-36050, Sep 19 2003.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, 25, n. 5, p. 363-370, Jul 2000.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, 309, n. 5733, p. 436-442, Jul 15 2005.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P. *et al.* Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, 341, n. 24, p. 1795-1800, Dec 9 1999.

KUHLS, K.; CUPOLILLO, E.; SILVA, S. O.; SCHWEYNOCH, C. *et al.* Population structure and evidence for both clonality and recombination among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania (Viannia)*. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 10, p. e2490, 2013.

LACOMBLE, S.; VAUGHAN, S.; GADELHA, C.; MORPHEW, M. K. *et al.* Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. **J Cell Sci**, 122, n. Pt 8, p. 1081-1090, Apr 15 2009.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN G FAU - SOLBACH, W.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? n. 0966-842X (Print), 2003.

LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Dev**, 7, n. 6, p. 996-1007, Jun 1993.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, 51, n. 4, p. 1327-1332, Apr 2007.

LYPACZEWSKI, P.; HOSHIZAKI, J.; ZHANG, W. W.; MCCALL, L. I. *et al.* A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence. 8, n. 1, p. 16549, Nov 8 2018.

MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARAES, L. H.; VILLASBOAS, L. *et al.* Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4, n. 12, p. e912, 2010.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C. L. *et al.* Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol**, 41, n. 7, p. 3147-3153, Jul 2003.

MARTINEZ-CALVILLO, S.; YAN, S.; NGUYEN, D.; FOX, M. *et al.* Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Mol Cell**, 11, n. 5, p. 1291-1299, May 2003.

MICHAELI, S.; DONIGER, T.; GUPTA, S. K.; WURTZEL, O. *et al.* RNA-seq analysis of small RNPs in *Trypanosoma brucei* reveals a rich repertoire of non-coding RNAs. **Nucleic Acids Res**, 40, n. 3, p. 1282-1298, Feb 2012.

MONDELAERS, A.; SANCHEZ-CANETE, M. P.; HENDRICKX, S.; EBERHARDT, E. *et al.* Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. **PLoS One**, 11, n. 4, p. e0154101, 2016.

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MAES, I.; DUJARDIN, J. C. *et al.* Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. **European Journal of Clinical Microbiology**, 31, n. 7, p. 1453-1461, Jul 2012.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, 366, n. 9496, p. 1561-1577, Oct 29-Nov 4 2005.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges**, 6, n. 9, p. 754-765, Sep 2008.

OBONAGA, R.; FERNANDEZ, O. L.; VALDERRAMA, L.; RUBIANO, L. C. *et al.* Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species. **Antimicrob Agents Chemother**, 58, n. 1, p. 144-152, 2014.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Trop**, 118, n. 2, p. 87-96, May 2011.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BREARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, 48, n. 3, p. 852-859, Mar 2004.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47, n. 8, p. 2397-2403, Aug 2003a.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrob Agents Chemother**, 47, n. 8, p. 2397-2403, Aug 2003b.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; SANCHEZ-CANETE, M. P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **J Biol Chem**, 281, n. 33, p. 23766-23775, Aug 18 2006.

PEREZ-VICTORIA, J. M.; CORTES-SELVA, F.; PARODI-TALICE, A.; BAVCHVAROV, B. I. *et al.* Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux. **Antimicrob Agents Chemother**, 50, n. 9, p. 3102-3110, Sep 2006.

PEREZ-VICTORIA, J. M.; DI PIETRO, A.; BARRON, D.; RAVELO, A. G. *et al.* Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. **Curr Drug Targets**, 3, n. 4, p. 311-333, Aug 2002.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 321, n. 5891, p. 970-974, Aug 15 2008.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol**, 10, n. 1, p. 111-129, 2015.

RAKOTOMANGA, M.; BLANC, S.; GAUDIN, K.; CHAMINADE, P. *et al.* Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, 51, n. 4, p. 1425-1430, Apr 2007.

RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P. M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. **Biochim Biophys Acta**, 1661, n. 2, p. 212-218, Mar 9 2004.

RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. **Antimicrob Agents Chemother**, 49, n. 7, p. 2677-2686, Jul 2005.

REQUENA, J. M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 16, p. 2069-2085, Jun 1 2011.

REY, L. *Leishmania* e Leishmaníases: Os Parasitos. In: **Parasitologia**. 4ª ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 359-371.

RIJAL, S.; OSTYN, B.; URANW, S.; RAI, K. *et al.* Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clin Infect Dis**, 56, n. 11, p. 1530-1538, Jun 2013.

ROGERS, M. B.; HILLEY, J. D.; DICKENS, N. J.; WILKES, J. *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res**, 21, n. 12, p. 2129-2142, Dec 2011.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathog**, 3, n. 6, p. e91, Jun 2007.

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A. *et al.* Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, 430, n. 6998, p. 463-467, Jul 22 2004.

SAITO, K.; FUJIMURA-KAMADA, K.; FURUTA, N.; KATO, U. *et al.* Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, 15, n. 7, p. 3418-3432, Jul 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ-CANETE, M. P.; CARVALHO, L.; PEREZ-VICTORIA, F. J.; GAMARRO, F. *et al.* Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 53, n. 4, p. 1305-1313, Apr 2009.

SEIFERT, K.; MATU, S.; JAVIER PEREZ-VICTORIA, F.; CASTANYS, S. *et al.* Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int J Antimicrob Agents**, 22, n. 4, p. 380-387, Oct 2003.

SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU, I. V.; OLIVEIRA, F.; MENESES, C. *et al.* Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nat Microbiol**, 3, n. 5, p. 548-555, May 2018.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA DR FAU - KEMP, L. E.; KEMP LE FAU - FIGUEIREDO, L. M.; FIGUEIREDO LM FAU - LOWELL, J. E. *et al.* Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. n. 1549-5477 (Electronic), 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, 31, n. 8, p. 423-431, Aug 2009.

SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N. *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, 38, n. 9, p. 1266-1272, May 1 2004.

SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, 100 Suppl 1, p. S34-40, Dec 2006.

SPITHILL, T. W.; GRUMONT, R. J. Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. **Mol Biochem Parasitol**, 12, n. 2, p. 217-236, Jun 1984.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, 6, n. 11, p. 849-854, Nov 2001.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J. *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, 347, n. 22, p. 1739-1746, Nov 28 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K. *et al.* Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clin Infect Dis**, 55, n. 4, p. 543-550, Aug 2012.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biol**, 7, n. 9, Sep 2017.

TRYTRIPDB. **Organism: *Leishmania major* strain Friedlin**. 2019. Disponível em: https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/organism/NCBITAXON_347515. Acesso em: 30Dez.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, 145, n. 4, p. 464-480, Apr 2018.

VELEZ, I.; LOPEZ, L.; SANCHEZ, X.; MESTRA, L. *et al.* Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 83, n. 2, p. 351-356, Aug 2010.

WADHONE, P.; MAITI, M.; AGARWAL, R.; KAMAT, V. *et al.* Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. **J Immunol**, 182, n. 11, p. 7146-7154, Jun 1 2009.

WHO. **Leishmaniasis**. 2019. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 22 nov.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C. *et al.* The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 73, n. 2, p. 272-275, Aug 2005.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; PEREIRA, L. I. *et al.* *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania*

(Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine & International Health**, 15, n. 1, p. 68-76, Jan 2010.

ZHANG, K.; BEVERLEY, S. M. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, 170, n. 2, p. 55-64, Apr 2010.

ZUFFEREY, R.; MAMOUN, C. B. Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. **Mol Biochem Parasitol**, 125, n. 1-2, p. 127-134, Nov-Dec 2002.