



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

VIVIANE NOLL LOUZADA FLORES

**Caracterização do perfil de transcrição de genes envolvidos na
resistência à miltefosina em cepas de *Leishmania infantum* isoladas de
cães naturalmente infectados**

FLORIANÓPOLIS, 2021

Viviane Noll Louzada Flores

Caracterização do perfil de transcrição de genes envolvidos na resistência à miltefosina em cepas de *Leishmania infantum* isoladas de cães naturalmente infectados

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Flávia Quaresma

Florianópolis, 2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Flores, Viviane Noll Louzada

Caracterização do perfil de transcrição de genes envolvidos na resistência à miltefosina em cepas de *Leishmania infantum* isoladas de cães naturalmente infectados / Viviane Noll Louzada Flores ; orientador, Edmundo Carlos Grisard, coorientador, Patrícia Flávia Quaresma, 2021.

93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Quaresma, Patrícia Flávia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Viviane Noll Louzada Flores

Caracterização do perfil de transcrição de genes envolvidos na resistência à miltefosina em cepas de *Leishmania infantum* isoladas de cães naturalmente infectados

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Álvaro Menin
Universidade de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Ferreira Gontijo
Fiocruz/MG

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Orientador

Florianópolis, 20 de outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard e Prof^a. Dr^a Patrícia Flávia Quaresma por terem permitido que eu realizasse um trabalho em que dediquei minha total competência, tendo, assim, me apaixonado pela área da leishmaniose em cães e ter decidido seguir esse estudo no doutorado.

Agradeço também ao meu namorado Lucas e a minha mãe que foram incansáveis estando ao meu lado durante todas as etapas do meu mestrado, sendo grandes bases e alicerces para o meu crescimento não somente pessoal como profissional.

Agradeço às fiéis companheiras de laboratório Amábilli e Bibiana, pois sem elas eu não teria conseguido atingir nem metade de onde cheguei.

Agradeço às amigas Nicolle e Laura que, há mais de 15 anos, são as pessoas que mais me compreendem e nunca deixaram de estar ao meu lado, independente da situação.

Agradeço a todos os animais que fizeram parte dessa etapa de mestrado, desde os meus filhos coelhos Nilo e Picolito, que foram apoio emocional em dias onde as coisas pareciam não dar certo, até os cães diagnosticados com LVC que acompanhei o tratamento e tiveram suas amostras adicionadas ao trabalho.

Agradeço aos colegas e professores de Laboratório de Protozoologia da UFSC por dedicarem tanto de seus tempos ao desenvolvimento de projetos de grande importância social e sanitária.

Agradeço a professores de laboratórios parceiros do MIP/CCB/UFSC, principalmente ao Prof. Dr. Rafael da Rosa e à Prof^a Gislaïne Fongaro por terem gentilmente concedido reagentes, equipamentos e promovido a discussão científica e instigando o espírito investigativo.

Agradeço ao LAMEB (UFSC) pela concessão de equipamentos e facilitação de análises científicas.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro durante a execução do projeto.

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e está entre as 17 doenças mais negligenciadas no mundo. No Brasil, está em franca expansão e tem os cães domésticos como principais reservatórios do parasito no contexto urbano de transmissão. Assim, o parasito pode acometer cães causando a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e, atualmente, existe no Brasil apenas um medicamento aprovado para o tratamento desses animais, a miltefosina. Existem relatos na literatura sobre alguns genes relacionados ao fenótipo de resistência do parasito à miltefosina, tais como: *LiMT*, *LiRos3*, *LiABCG4*, *LiABCG6* e *AQP1*. Para avaliar a susceptibilidade e o perfil de expressão desses genes em *L. infantum*, o presente estudo contou com sete isolados de *L. infantum*, sendo cinco provenientes do município de Florianópolis (SC) e dois provenientes do estado de Minas Gerais (MG). Um total de cinco isolados são provenientes de cães que passaram por tratamento com a miltefosina após diagnóstico de LVC, e três outros são de cães soropositivos que foram submetidos à eutanásia e posterior necrópsia. Todas as cepas tiveram a taxa de infecção individual, a susceptibilidade *in vitro* à miltefosina e os respectivos valores de IC₅₀ determinados. Além disso, as taxas de expressão relativa ao gene referência *SSU* foram determinadas para os cinco genes em ensaios de RT-qPCR. Os dados de IC₅₀ aliados com as taxas de infecção, bem como a taxa de amastigotas por macrófago e a taxa de expressão dos genes de interesse mostraram que as cepas provenientes de MG são sensíveis à miltefosina. Em contrapartida, alguns isolados de *L. infantum* provenientes de cães de Florianópolis (SC) apresentaram perfil de resistência à miltefosina, fato que foi corroborado por análises realizadas após o tratamento dos animais. A quantificação relativa de transcritos dos genes *LiMT*, *LiRos3* e *AQP1* apresentou melhor concordância e associação com o fenótipo de resistência observado nos ensaios *in vitro* de susceptibilidade, seguida pela transcrição do gene *LiABCG4*. Em contrapartida, a quantificação da expressão do gene *LiABCG6* não pôde ser considerada um bom marcador de resistência ou susceptibilidade do parasito. Em suma, os resultados deste estudo chamam a atenção para a importância da avaliação da resistência de populações de *L. infantum* à miltefosina utilizando-se a RT-qPCR dirigida a genes envolvidos na resistência, permitindo o monitoramento da infecção de cães submetidos ao tratamento para LVC com miltefosina.

Palavras-chave: *Leishmania*. Leishmaniose visceral canina. Resistência. Miltefosina.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an infectious, non-contagious disease caused by the protozoan *Leishmania infantum* and is among the 17 most neglected diseases in the world. In Brazil, it is booming and has domestic dogs as the main reservoirs of the parasite in the urban context of transmission. Thus, the parasite can affect dogs causing Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) and, currently, there is only one drug approved in Brazil for the treatment of these animals, miltefosine. There are reports in the literature about some genes related to the parasite resistance phenotype to miltefosine, such as: *LiMT*, *LiRos3*, *LiABCG4*, *LiABCG6* and *AQP1*. To assess the susceptibility and expression profile of these genes in *L. infantum*, the present study included seven isolates of *L. infantum*, five from the municipality of Florianópolis (SC) and two from the state of Minas Gerais (MG). A total of five isolates come from dogs that underwent treatment with miltefosine after being diagnosed with CVL, and two others are from seropositive dogs that underwent euthanasia and subsequent necropsy. All strains had their individual infection rate, in vitro susceptibility to miltefosine and their IC₅₀ values determined. In addition, expression rates relative to the *SSU* reference gene were determined for the five genes in RT-qPCR assays. IC₅₀ data combined with infection rates, as well as amastigotes per macrophage rate and the expression rate of genes of interest showed that strains from MG are sensitive to miltefosine. On the other hand, some isolates of *L. infantum* from dogs in Florianópolis (SC) showed a profile of resistance to miltefosine, a fact that was corroborated by analyzes carried out after the treatment of the animals. The relative quantification of transcripts from the *LiMT*, *LiRos3* and *AQP1* genes showed better agreement and association with the resistance phenotype observed in the in vitro susceptibility assays, followed by transcription of the *LiABCG4* gene. On the other hand, the quantification of *LiABCG6* gene expression could not be considered a good marker of resistance or susceptibility of the parasite. In short, the results of this study draw attention to the importance of evaluating the resistance of *L. infantum* populations to miltefosine using RT-qPCR directed to genes involved in resistance, allowing the monitoring of infection in dogs undergoing treatment for LVC with miltefosine.

Keywords: *Leishmania*. Canine visceral leishmaniasis. Resistance. Miltefosine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representações esquemáticas e microfotografias descrevendo as distintas morfologias celulares de <i>Leishmania</i> sp. (A) e (B) Formas promastigotas e (C) e (D) formas amastigotas. Nas imagens, estão indicadas as estruturas do parasito. Fonte: Mans <i>et al.</i> , 2017.....	2
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. (Adaptado de Anversa <i>et al.</i> , 2018).....	3
Figura 3: Mapa de distribuição de casos importados e de novos casos de leishmaniose visceral no mundo no ano de 2018 (WHO, 2018).....	4
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 2,0%, onde A) fragmentos de amplificação para o gene <i>Hsp70</i> , e B) posterior digestão com a enzima de restrição <i>HaeIII</i> , corados pelo brometo de etídeo revelando os produtos de PCR-RFLP das diferentes espécies de tripanosomatídeos e isolados abordados no estudo.....	22
Figura 5: Taxas de infecção para as amostras do estudo calculadas a partir do número de macrófagos THP-1 parasitados por formas amastigotas de <i>L. infantum</i> após infecção experimental <i>in vitro</i> , onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. (A): Cão 01; (B): Cão 02; (C): Cão 03 e (D): Cão 04.....	26
Figura 6: Taxas de infecção para as amostras do estudo calculadas a partir do número de macrófagos THP-1 parasitados por formas amastigotas de <i>L. infantum</i> após infecção experimental <i>in vitro</i> , onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. (A): Cão 05; (B): Cão 06; (C): Cão 07 e (D): Cepa referência PP75.....	27
Figura 7: Taxas de infecção para as amostras do estudo a partir do número de macrófagos THP-1 parasitados por formas amastigotas de <i>L. infantum</i> após infecção experimental <i>in vitro</i> , tratado com 1,9 μM de miltefosina <i>in vitro</i> (barra vermelha) e não tratado (barra azul), onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$	28
Figura 8: Relação de amastigotas por macrófago infectado para as amostras do estudo com concentrações de 0,5, 1,9, 5 e 15 μM de miltefosina <i>in vitro</i> , onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$	30
Figura 9: Índice de infecção obtido para as cepas abordadas no trabalho na presença e ausência de miltefosina <i>in vitro</i> nas diferentes condições de tratamento <i>in vivo</i> . T0: antes do tratamento; T1: 31 dias após o início do tratamento; T2: 6 meses pós-tratamento; NT: não tratado.....	30
Figura 10: Dados da padronização da qPCR para o gene <i>LiMT</i> , onde (A): Curva padrão ($R^2 = 0,9887$); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação.....	32

Figura 11: Dados da padronização da qPCR para o gene <i>LiRos3</i> , onde (A): Curva padrão (R^2 : 0,98); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação (T_m : 85 °C).....	32
Figura 12: Dados da padronização da qPCR para o gene <i>AQPI</i> , onde (A): Curva padrão (R^2 : 0,990); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação.....	33
Figura 13: Dados da padronização da qPCR para o gene <i>LiABCG4</i> , onde (A): Curva padrão (R^2 : 0,993); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação (T_m : 83,5 °C).....	33
Figura 14: Dados da padronização da qPCR para o gene <i>LiABCG6</i> onde (A): Curva padrão (R^2 : 0,995); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação (T_m : 84,7 °C).....	34
Figura 15: Perfil de transcrição do gene <i>LiMT</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na presença ou ausência de miltefosina.....	37
Figura 16: Perfil de transcrição do gene <i>LiMT</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na ausência (A) ou presença de miltefosina (B).....	37
Figura 17: Perfil de transcrição do gene <i>LiRos3</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na presença ou ausência de miltefosina.....	39
Figura 18: Perfil de transcrição do gene <i>LiROS3</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa da transcrição deste gene nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e também após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na ausência (A) ou presença de miltefosina (B).....	39
Figura 19: Perfil de transcrição do gene <i>AQPI</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos dos cães 01 (A), 02 (B), 03 (C) e 04 (D), antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na ausência ou presença de miltefosina.....	40
Figura 20: Perfis de transcrição do gene <i>AQPI</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC,	

antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na presença ou ausência de miltefosina. (A) Cão 5; (B): Cão 06; (C): Cão 07.....	41
Figura 21: Perfil de transcrição do gene <i>LiABCG4</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na presença ou ausência de miltefosina.....	42
Figura 22: Perfil de transcrição do gene <i>LiABCG4</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos dos cães 05 (A), 06 (B) e 07 (C), antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na ausência ou presença de miltefosina.....	43
Figura 23: Perfil de transcrição do gene <i>LiABCG6</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na presença ou ausência de miltefosina.....	44
Figura 24: Perfil de transcrição do gene <i>LiABCG6</i> obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de <i>L. infantum</i> oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas <i>in vitro</i> na ausência (A) ou presença de miltefosina (B).....	45
Figura 25: Quadro resumo dos resultados obtidos para os diferentes ensaios em relação às cepas do estudo.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem, presença/ausência de tratamento e tempos de coleta das amostras de cada um dos cães abordados no presente estudo. T0: coleta de aspirado de linfonodo antes do tratamento com miltefosina; T1: coleta de aspirado de linfonodo 31 dias após o início do tratamento com miltefosina; T2: coleta de aspirado de medula óssea 6 meses após o início do tratamento com miltefosina.....	14
Tabela 2: Sequência de iniciadores utilizados no estudo.....	20
Tabela 3: Taxas médias de amastigotas por macrófago e porcentagem de células infectadas relativas a cada proporção de amastigotas por macrófago.....	23
Tabela 4: IC ₅₀ <i>in vitro</i> dos isolados incluídos no estudo a partir de testes com concentrações de 0,5 µM, 1,9 µM, 5 µM e 15 µM, sendo T0: antes do tratamento; T1: 31 dias após o início do tratamento; T2: 6 meses pós-tratamento; NT: não tratado.....	24
Tabela 5: Valores médios da taxa de infecção de macrófagos diferenciados THP-1 por formas amastigotas de <i>L. infantum</i> isoladas de cães portadores de LV em diferentes tempos do tratamento <i>in vivo</i> (antes e após tratamento) e na presença de 1,9 µM ou ausência de miltefosina em experimentos <i>in vitro</i> , além da cepa referência PP75 T0: antes do tratamento; T1: 31 dias após o início do tratamento; T2: 6 meses pós-tratamento; NT: não tratado.....	25
Tabela 6: Expressão relativa dos genes <i>LiMT</i> e <i>LiRos3</i> em relação às diferentes condições de tempo e de tratamento <i>in vivo</i> assim como ausência/presença de miltefosina nos ensaios <i>in vitro</i>	35
Tabela 7: Expressão relativa dos genes <i>LiABCG6</i> , <i>LiABCG4</i> e <i>AQP1</i> em relação às diferentes condições de tempo de tratamento <i>in vivo</i> assim como ausência/presença de miltefosina nos ensaios <i>in vitro</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LVC - Leishmaniose Visceral Canina
MT - do inglês, *Miltefosine Transporter*
IC - do inglês, *Inhibitory Concentration*
RT-qPCR - do inglês, *Real Time - Quantitative Polymerase Chain Reaction*
Cq - *Quantification Cycle*
OMS - Organização Mundial da Saúde
WHO - do inglês, *World Health Organization*
DNA - do inglês, *Deoxyribonucleic acid*
RNA - do inglês, *Ribonucleic acid*
cDNA - DNA complementar
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
LCD - Leishmaniose Cutâneo-Difusa
LMC - Leishmaniose Mucocutânea
LV - Leishmaniose Visceral
LVH - Leishmaniose Visceral Humana
PCR - do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
CCZ - Centro de Controle de Zoonoses
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
GEL - Grupo de Estudos em Leishmanioses
MOI - do inglês, *Multiplicity Of Infection*
SBF - Soro Bovino Fetal
RPMI - do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*
PMA - do inglês, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*
x g—força gravitacional
PBS - do inglês, *Phosphate Buffered Saline*
EDTA - do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*
dNTP - desoxirribonucleotídeos tri-fosfatados
pb - pares de bases
ANOVA - do inglês, *Analysis of Variance*
Li – *L. infantum*
SSU rRNA- Subunidade menor do ácido ribonucleico ribossomal
AQP1 – aquaporina-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Leishmania</i> spp. e leishmaniose	1
1.2 Transmissão, vetores e reservatórios	1
1.3 Formas clínicas da leishmaniose	3
1.4 <i>Leishmania (L.) infantum</i>	4
1.5 A Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	5
1.6 Diagnóstico, tratamento e controle da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	7
1.7 Quimioterapia das leishmanioses e resistência aos fármacos leishmanicidas	8
1.8 Relação do tratamento com miltefosina e análises gênicas	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. HIPÓTESE	12
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo geral	
4.2 Objetivos específicos	
5. METODOLOGIA	13
5.1 Procedimentos éticos e obtenção dos isolados de <i>L. infantum</i>	14
5.2 Cultivo de formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	15
5.3 PCR-RFLP de <i>Hsp70</i> para identificação das espécies de <i>Leishmania</i>	15
5.4 Cultivo e manutenção da linhagem celular THP-1	16
5.5 Diferenciação de células THP-1 em macrófagos aderentes	16
5.6 Determinação da multiplicidade de infecção (MOI) e infecção das células THP-1 com <i>L. infantum</i>	17
5.7 Incubação das células infectadas com miltefosina	17
5.8 Determinação da IC ₅₀ relativa à droga miltefosina nos diferentes isolados de <i>L. infantum</i>	18
5.9 Avaliação da expressão de genes de resistência a drogas anti- <i>Leishmania</i>	32
5.9.1 Extração de RNA total	18
5.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)	18
5.9.3 Padronização e otimização das reações de PCR em tempo real (RT-qPCR)	19

5.9.4 Cálculo dos valores de expressão relativa	21
5.10 Análises estatísticas	21
6. RESULTADOS	22
6.1 Identificação específica dos isolados de cães utilizados no presente estudo	22
6.2 Determinação da multiplicidade de infecção (MOI)	
6.3 Determinação da IC ₅₀ dos diferentes isolados de <i>L. infantum</i> provenientes de cães portadores de LVC	23
6.4 Taxas de infecção dos isolados de <i>L. infantum</i> em macrófagos THP-1	24
6.5 Número de amastigotas por macrófago e índice de infecção	28
6.6 Padronização das reações de qPCR	31
6.7 Expressão gênica relativa dos genes relacionados à resistência à miltefosina nos isolados de <i>L. infantum</i>	34
6.7.1 Transportador de miltefosina de <i>L. infantum</i> (<i>LiMT</i>)	36
6.7.2 <i>LiRos3</i>	38
6.7.3 <i>AQP1</i>	40
6.7.4 <i>LiABCG4</i>	42
6.7.5 <i>LiABCG6</i>	44
7. DISCUSSÃO	46
8. CONCLUSÕES	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* spp. e leishmaniose

O gênero *Leishmania* spp. (Kinetoplastea:Trypanosomatidae) é composto por diferentes espécies que determinam doenças em humanos e animais com manifestações clínicas variadas, denominadas leishmanioses. Esse termo, foi concebido pelo médico britânico W. B. Leishman em 1901, quando descreveu parasitos de *Leishmania donovani* no baço de um soldado indiano acometido por calazar (LEISHMAN, 1904). Desde então, cerca de 20 espécies de *Leishmania* foram identificadas (GONÇALVES *et al.*, 2019).

As leishmanioses são definidas como doenças infecciosas não contagiosas cuja transmissão ocorre através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas. Existem cerca de 30 diferentes espécies de flebotomíneos que podem atuar como vetores de *Leishmania* spp. (ASHFORD, 1997; DESJEUX, 1996). Além da transmissão vetorial, o parasito pode ser transmitido entre humanos a partir de seringas contaminadas ou transfusão sanguínea (MONTEIRO *et al.*, 2019). Anualmente, cerca de 30.000 pessoas morrem pela doença, havendo cerca de 15 milhões de indivíduos infectados em mais de 80 países da África, Ásia, Sul da Europa e América do Sul e Central, e cerca de 350 milhões de pessoas habitando em áreas de risco (CROFT; OLLIARO, 2011). Além disso, a doença ocorre com mais frequência em países com condições socioeconômicas precárias, onde a saúde primária e nutrição são escassas (KUMAR; ENGWERDA, 2014). A doença, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda figura como uma das 17 doenças mais negligenciadas do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

1.2 Transmissão, vetores e reservatórios

A *Leishmania* spp. é um parasito digenético que apresenta morfologia distinta quando se encontra no hospedeiro mamífero e no vetor flebotomíneo (CHANG, 1979). Possuindo duas formas evolutivas principais em seu ciclo de vida, a *Leishmania* sp. é encontrada na forma promastigota no vetor, enquanto é encontrada na forma amastigota no hospedeiro mamífero (Figura 1). A forma promastigota flagelada apresenta entre 10-20 µm de comprimento e progride em vários estágios morfologicamente distintos de diferenciação até se tornar a forma promastigota metacíclica, que é a forma infectiva para mamíferos, sendo inoculada durante o repasto alimentar da fêmea de flebotomíneos. Já a forma amastigota intracelular é observada no interior de fagócitos mononucleados de mamíferos infectados, não apresentando flagelo exteriorizado (BRAGA, 2011, KAYE, 2011).

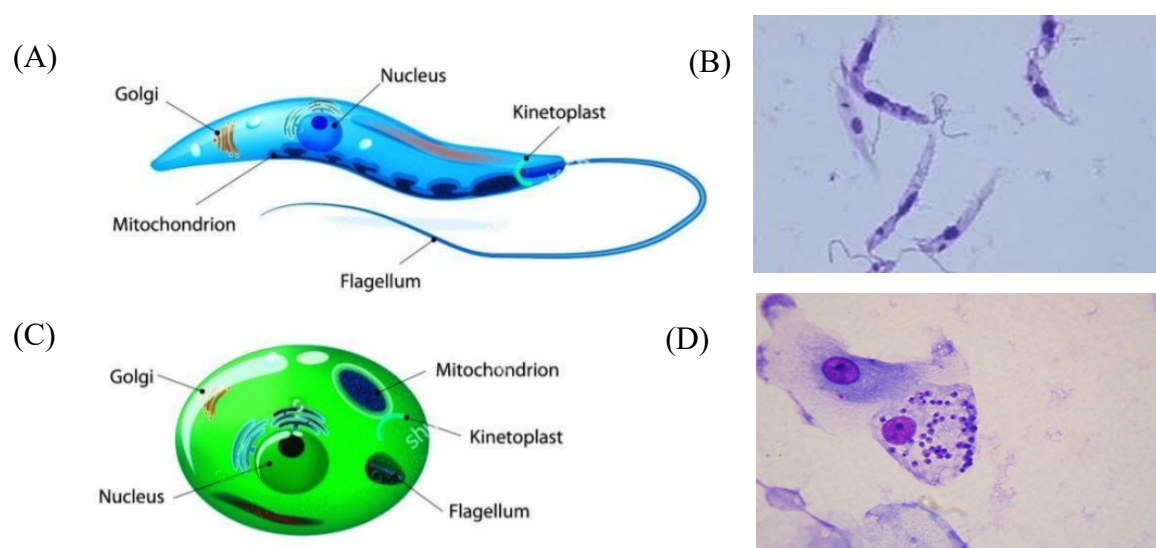


Figura 1: Representações esquemáticas e microfotografias descrevendo as distintas morfologias celulares de *Leishmania* sp., onde (A) e (B) Formas promastigotas e (C) e (D) formas amastigotas. Fonte: Mans *et al.*, 2017.

O ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Figura 2) inicia quando um flebotomíneo parasitado inocula formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro mamífero durante o repasto alimentar juntamente com vários componentes salivares como vasodilatadores e anticoagulantes (KAYE, 2011). No hospedeiro mamífero, as formas promastigotas são inicialmente encontradas no interior de neutrófilos, sendo desencadeado um processo de apoptose destas células, quando os parasitos são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, notoriamente macrófagos. Dessa forma, sinais anti-inflamatórios promovidos por outras células de defesa induzem no macrófago a transformação da forma promastigota na forma amastigota (PETERS *et al.*, 2008), a partir da divisão e multiplicação por fissão binária até o rompimento da célula - causando a infecção dos fagócitos vizinhos e a continuação do ciclo no hospedeiro (BARD, 1989; PALTRINIERI *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da *Leishmania* spp. no trato digestivo de dípteros flebotomíneos, cujas fêmeas são hematófagas, é iniciado quando ocorre a ingestão de macrófagos infectados com amastigotas durante o repasto alimentar em mamíferos infectados (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Assim, no intestino do inseto, ocorre a ruptura dos macrófagos infectados e as amastigotas liberadas iniciam a diferenciação para formas promastigotas. A partir da total transformação em formas promastigotas, ocorre a

multiplicação dos parasitos no intestino do flebotomíneo para que, gradualmente, essas formas promastigotas procíclicas se transformem em formas maduras, móveis e finalmente em promastigotas metacíclicas infectivas. Estas, por sua vez, migram para a válvula estomodeal do inseto e serão depositadas, juntamente com a saliva e componentes vasodilatadores e anticoagulantes, no local da picada em um próximo repasto alimentar. Foi demonstrado recentemente por Serafim e cols. (2018) que alimentações sanguíneas sequenciais realizadas pelos insetos vetores, mesmo que em hospedeiros não infectados, promovem a replicação de *Leishmania* e reverte a metaciclogênese, aumentando a infectividade do vetor. O processo completo no intestino do parasito demora cerca de 4 a 25 dias (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SERAFIM et al., 2018).

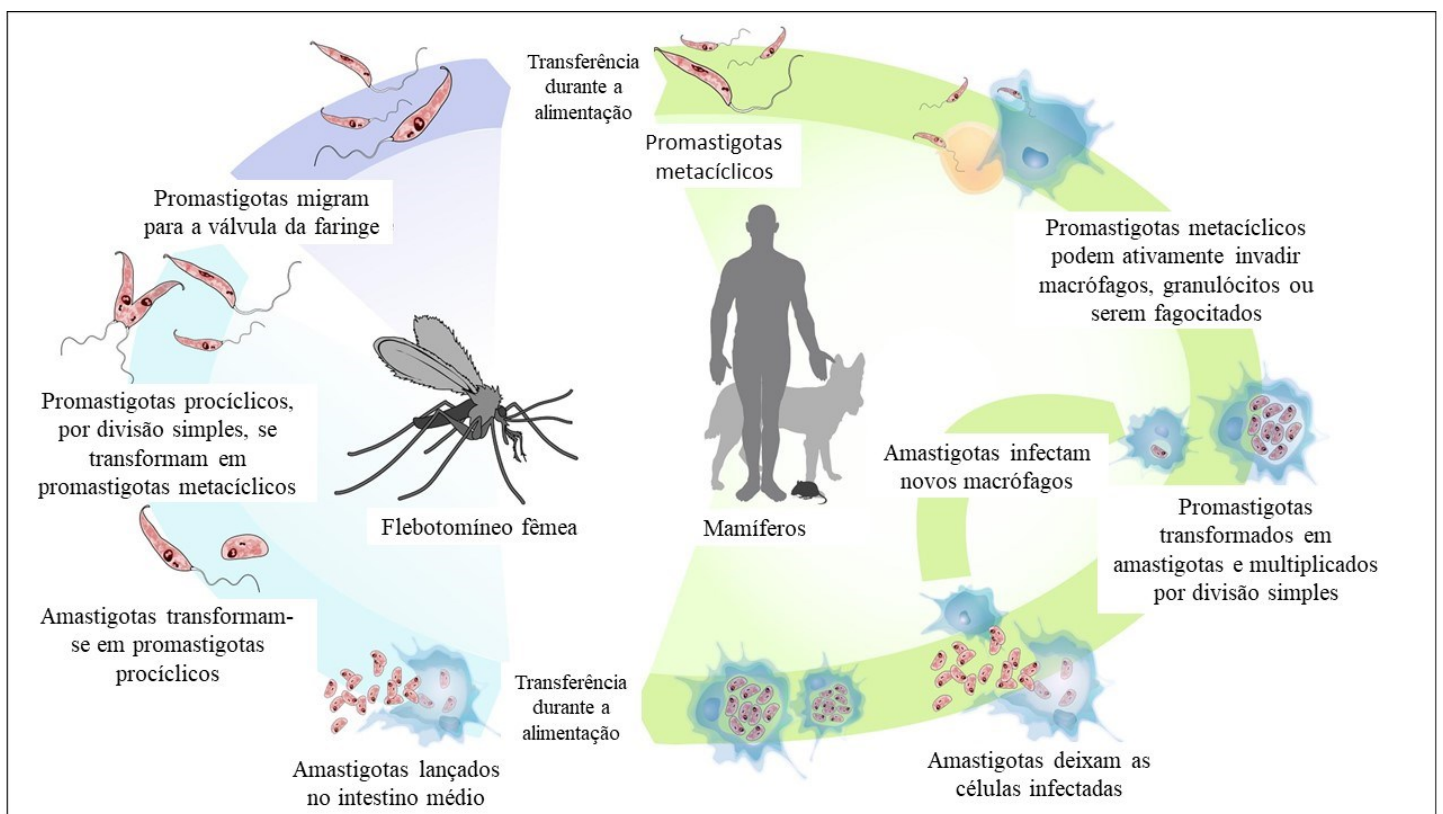


Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Adaptado de Anversa *et al.*, 2018).

1.3 Formas clínicas da leishmaniose

De acordo com a OMS, as manifestações clínicas da leishmaniose no novo mundo podem ser classificadas em duas formas básicas, a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV) (WHO, 2018). A Leishmaniose Tegumentar Americana

(LTA) pode-se apresentar nas seguintes formas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose disseminada (LD). A forma clínica que o hospedeiro desenvolverá deve-se não somente à espécie de *Leishmania* que o infectou, como também à sua própria resposta imune (KAYE, 2011).

A LV é a forma mais grave da doença que, diferentemente das demais, apresenta elevada mortalidade quando não tratada, sendo o seu prognóstico determinado pela interação de fatores, como as características do parasito, a biologia do vetor e fatores inerentes ao hospedeiro como a resposta imunológica. O quadro visceral da leishmaniose pode ser causado pela *Leishmania donovani* Ross, 1903 na Ásia e África, e por *Leishmania infantum* Nicole, 1908 no mediterrâneo, no leste central da Europa, Ásia central, América do Sul e América Central (Figura 3). Ocorre uma invasão das células fagocíticas do baço, fígado, medula óssea e linfonodos por esses parasitos na forma clínica visceral, causando perda de peso, febre irregular e de longa duração, fraqueza, aumento do fígado e baço e anemia (CHAPPUIS *et al.*, 2007; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

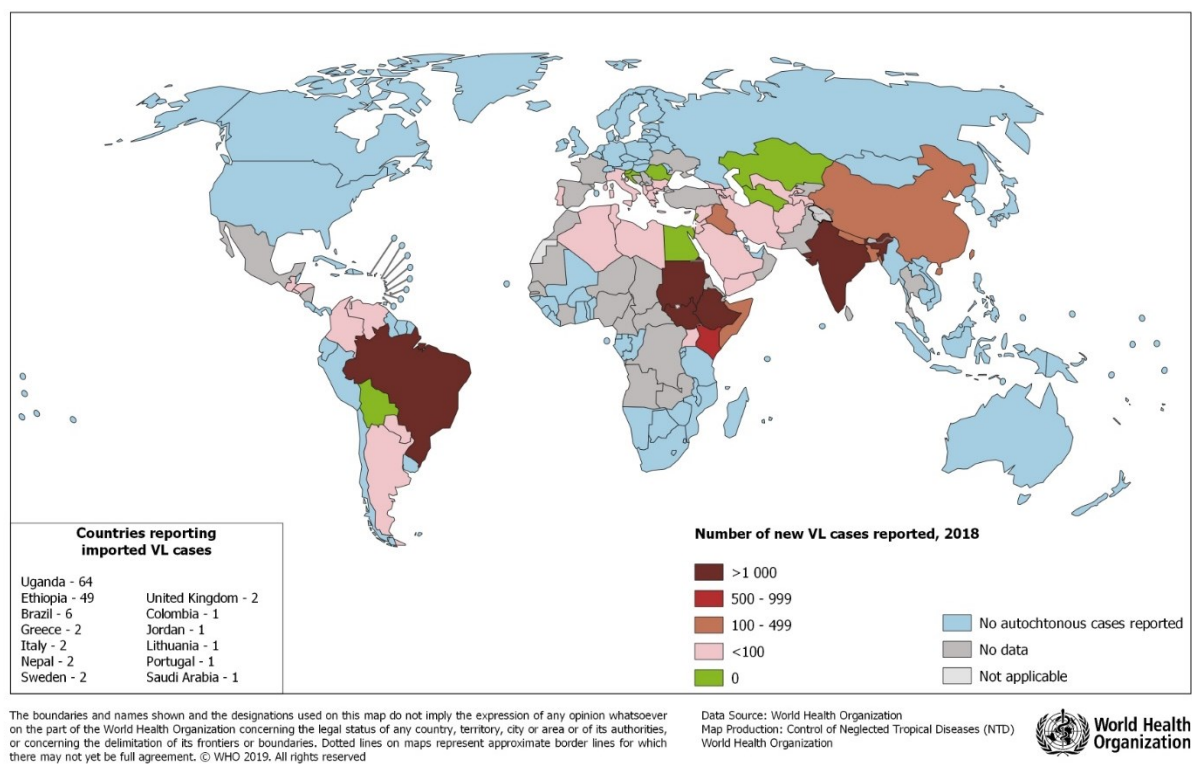


Figura 3: Mapa de distribuição de casos importados e de novos casos de leishmaniose visceral no mundo no ano de 2018 (WHO, 2018).

1.4 *Leishmania (Leishmania) infantum*

A *Leishmania (L.) infantum* é o agente etiológico da LV nas Américas e acredita-se que essa espécie foi introduzida no continente americano durante a colonização europeia, sendo as cepas importadas majoritariamente transportadas por humanos assintomáticos, cães e outros hospedeiros mamíferos (SCHWABL *et al.*, 2021). Ainda que se observe condições ecológicas parecidas em relação à transmissão no Novo e no Velho mundo - incluindo a presença do reservatório comum urbano *Canis familiaris* - há diferenças significativas entre os genomas dos parasitos. Apesar disso, ainda que *L. infantum* e *L. chagasi* tenham nomes diferentes, dados moleculares sugerem que são uma mesma espécie (LUKES *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2019; BOITÉ *et al.*, 2019)

A leishmaniose visceral humana (LVH) é caracterizada por apresentar evolução lenta, com quadros inicialmente assintomáticos subclínicos com febre alta e irregular. Conforme a evolução clínica, alguns sinais clínicos são observados, sendo eles a perda de peso, aumento de tamanho do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia), linfadenopatia e anemia. O tempo de evolução da LVH e a gravidade da doença dependem, dentre outros fatores, da resposta imunológica do hospedeiro (SRIVASTAVA *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2018; MOHEBALI *et al.*, 2018; PAIZ *et al.*, 2018). Nos últimos anos, casos de LVH foram reportados em 76 países e, em 2017, 95% dos novos casos ocorreram em sete regiões: o Brasil, a Etiópia, a Índia, o Quênia, a Somália, o Sul do Sudão e o Sudão. Atualmente, o Brasil responde por cerca de 96% do número total de casos de LVH na América Latina (GONÇALVES *et al.*, 2019).

1.5 A Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Diversos fatores podem estar relacionados à dispersão da LV no Brasil, cujos altos índices de LVH parecem estar vinculados à presença de cães, uma vez que são considerados os principais reservatórios do parasito em áreas urbanas (NOGUEIRA *et al.*, 2021). De maneira geral, o registro de casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) precede a ocorrência de casos de LVH em áreas endêmicas, uma vez que não há relato de casos da doença em humanos na ausência de cães infectados (GONTIJO & MELO, 2004; STEINDEL *et al.*, 2013). Assim, tendo em vista a gravidade da doença em humanos e animais, e considerando o papel central dos cães como reservatórios de *L. infantum* em função de seu parasitismo cutâneo, estudos reiteram que o aumento da prevalência da LVC em centros urbanos está diretamente relacionado à participação dos cães no ciclo de transmissão da doença (BRAGA, 2011; NEIDERUD, 2015; LEITE *et al.*, 2018). Dessa forma, esses animais, por serem mais susceptíveis à infecção e apresentarem proximidade

física com os humanos, tornam facilitada a transmissão no ambiente peridomiciliar (CAMPOS *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018).

A LVC é igualmente causada por *L. infantum*. Ainda que transmissões não-vetoriais tais como transplacentária, transfusional ou venérea já tenham sido reportadas, o parasito é geralmente transmitido durante o repasto alimentar do flebotomíneo fêmea (KAYE, 2011). Ainda assim, a distribuição geográfica e prevalência da doença dependem da presença e abundância de vetores competentes (PALTRINIERI *et al.*, 2016). Porém, apesar da existência de outros reservatórios mamíferos, o cão doméstico é considerado o mais importante reservatório de *L. infantum* devido à sua proximidade com o ser humano. Estudos que empregaram a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostraram infecções assintomáticas em cerca de 80% dos cães em áreas endêmicas (BURZA, 2018). Nesses animais, a LV é igualmente assintomática em sua fase aguda e a ausência de sinais clínicos pode perdurar por longos períodos, dificultando o diagnóstico eficiente e podendo levar o animal à morte se não for tratado (RIBEIRO *et al.*, 2018). Entretanto, os medicamentos disponíveis para tratamento da LVC podem apresentar inúmeras desvantagens como toxicidade, resistência à droga, e o fato de que os animais, mesmo tratados, podem ser reservatórios do parasito, uma vez que a cura parasitológica nunca foi demonstrada em cães após o tratamento (TRAVI, 2014).

Dentre os sinais clínicos característicos da LVC, pode-se citar alopecia, caquexia, onicogribose, hepato/esplenomegalia e linfadenopatias (TRAVI *et al.*, 2018). Os cães também apresentam um parasitismo cutâneo por *L. infantum*, fato que contribui para serem considerados importantes hospedeiros reservatórios, mesmo quando assintomáticos. Alguns estudos relatam que os órgãos com a maior quantidade de parasitos são o baço e a pele, sendo essa última o local em que ocorre o primeiro contato entre o parasito e o hospedeiro (REIS *et al.*, 2006, MOHEBALI *et al.*, 2018).

Em estudos de campo, a presença de ácidos nucleicos de *L. infantum* pôde ser detectada na medula óssea de cães através de PCR a partir de seis meses do repasto infectante do vetor no animal. Porém, em parte de cães testados com resultado positivo para a presença de *L. infantum* na medula óssea, a carga parasitária pode se tornar negativa nos meses seguintes sem que houvesse nenhum tratamento. Não é sabido se nesses animais a carga parasitária apresenta valor abaixo do limite de detecção da PCR, se as formas amastigotas persistem em outros órgãos, ou se a infecção foi efetivamente erradicada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (PALTRINIERI *et al.*, 2016).

A eutanásia de cães com diagnóstico sorológico positivo para *Leishmania* spp. é recomendada como medida de controle pela Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda que não haja consenso de que essa ação contribua de forma efetiva para a redução do número de casos de LV (FONSECA JUNIOR *et al.*, 2021). Apesar das informações disponíveis e dos esforços investidos, o controle da transmissão da doença (incluindo a eutanásia de animais comprovadamente infectados) não tem alcançado os resultados desejados e é observada uma progressão de casos da doença em cães e humanos.

1.6 Diagnóstico, tratamento e controle da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

No Brasil, o tratamento de cães comprovadamente diagnosticados com a infecção por *L. infantum*, apresentando ou não sinais clínicos compatíveis com a doença, é permitido contanto que sejam utilizados fármacos de uso veterinário registrados para esse fim junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Assim, o fármaco atualmente autenticado e permitido pelo MAPA é a miltefosina (MilteforanTM) (VIRBAC BRASIL, 2018; MAPA, 2016). Entretanto, assim como outros fármacos, a miltefosina tem apresentado problemas em relação à resistência em cepas de *Leishmania* spp. (COELHO *et al.*, 2012).

A miltefosina é uma hexadecilfosfocolina inicialmente desenvolvida como um fármaco contra o câncer, sendo implementada na Índia como terapia leishmanicida pela primeira vez na década de 1980 para o tratamento da LV (CARNIELLI *et al.*, 2019; DAGA; ROHATGI; MISHRA, 2021). Enquanto a miltefosina foi capaz de produzir uma cura clínica de 94% de LV por *L. donovani* quando primariamente implementada na Índia, uma fase dois de teste no Brasil mostrou que a dose de cura foi muito menor, sendo cerca de 60%. A razão pela baixa taxa de cura ainda é desconhecida, mas pode ser associada a uma resistência natural à miltefosina por parte da população de *L. infantum* no Brasil (CARNIELLI *et al.*, 2018). Apesar disso, a miltefosina é atualmente a única droga oral disponível para o tratamento da LVC, sendo comumente utilizada em combinação com outras drogas na busca por uma melhoria de sua eficácia (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

O tratamento de cães infectados por *L. infantum* se faz de acordo com alguns protocolos relativos ao uso da miltefosina e outros fármacos. Para tanto, em protocolo sugerido por Solano-Gallego e colaboradores (2011), os estádios clínicos podem ser subdivididos em I (sem doença), II (sem doença/doença leve), III (doença moderada), IV (doença grave) e V (doença muito grave). Para tanto, em I, a terapia indicada para os animais é a imunoterapia e a imunomodulação, enquanto em II pode-se conciliar também

com o alopurinol e a miltefosina. Nos demais três estádios, recomenda-se seguir as diretrizes para manejo da nefropatite e controle da pressão sistêmica sanguínea. Além disso, em cães soronegativos ou com níveis de anticorpos baixos ou médios, a infecção deve ser confirmada por meio de citologia, histologia, imuno-histoquímica e/ou PCR. Níveis altos de anticorpos (aumento de 3-4 vezes acima do ponto de corte) são conclusivos para o diagnóstico da LVC.

1.7 Quimioterapia das leishmanioses e resistência aos fármacos leishmanicidas

O tratamento para a LVH é baseado no uso de fármacos administrados via parenteral, os quais causam, na maior parte das vezes, diversos efeitos colaterais. O arsenal terapêutico contra a LV, além de escasso, apresenta diversos problemas como a resistência, levando frequentemente à ineficiência e, até mesmo, à descontinuidade do plano de tratamento contra a leishmaniose. Além disso, a ausência de vacinas eficazes para controlar a disseminação do agente etiológico faz do uso de ativos químicos a única alternativa para o tratamento das diversas formas da leishmaniose (TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016). Os fármacos administrados no combate à leishmaniose compreendem os antimoniais pentavelentes, bem como a anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina e a paromomicina (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017).

Os antimoniais são conhecidos por serem os medicamentos mais utilizados contra a leishmaniose, incluindo o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, cujo uso data de mais de meio século atrás. O mecanismo de ação desse fármaco consiste na possível inibição de mecanismos enzimáticos de *Leishmania* spp., onde também causa uma depleção dos níveis de ATP intracelular. Devido à descontinuidade de tratamentos, bem como baixas dosagens em pacientes, desde o início do século (RATH *et al.*, 2003) datam casos de possível aquisição de resistência por *Leishmania*, sendo essa situação observada no subcontinente indiano, onde foi registrado que cerca de 65% dos pacientes portadores de LV apresentavam resistência aos antimoniais (MOHOPATRA, 2014; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). A anfotericina B, por sua vez, que atua através da formação de canais de íons com o objetivo de desestabilizar a permeabilidade da membrana plasmática celular, é muito utilizada na Índia devido à alta taxa de detecção de isolados resistentes (DAGA; ROHATGI; MISHRA, 2021).

A miltefosina é considerada o único fármaco administrado por via oral capaz de combater as formas visceral e cutânea da leishmaniose. Esse composto é reconhecido por atuar através de três diferentes mecanismos: interferência sobre rotas de sinalização

celular, levando à apoptose dos parasitos, efeitos imunomoduladores sobre macrófagos e inibição da síntese da membrana celular dos parasitos (TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016). Como descrito anteriormente, a resistência aos fármacos é uma problemática cada vez mais frequente e muitas vezes é remetida a um processo natural. A resistência à miltefosina mediada por mutações no complexo MT/Ros3, por exemplo, foi identificada em isolados considerados na literatura como totalmente resistentes à miltefosina (BULTÉ *et al.*, 2021; SRIVASTA *et al.*, 2017).

Com o objetivo de aumentar a efetividade do tratamento, utilizam-se terapias combinadas que consistem no uso de mais de um fármaco com atividades sinérgicas ou aditivas a fim de potencializar o espectro de atividade e a eficácia terapêutica (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017). Além disso, diversos estudos relatam a possibilidade de combinar a quimioterapia com a imunoterapia no combate à leishmaniose (SHAKYA *et al.*, 2012; KHALILI *et al.*, 2011). O uso de citocinas aliado à quimioterapia muitas vezes foi capaz de reduzir as doses do fármaco administrado e encurtar o período de tratamento (TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016).

1.8 Relação do tratamento com miltefosina e análises gênicas

As propriedades farmacocinéticas, além de longos períodos de tratamento não supervisionado colocam a miltefosina em risco de seleção de parasitos resistentes a diferentes fármacos (MONDELAERS *et al.*, 2016). Uma característica comum em promastigotas resistentes à miltefosina é um declínio no acúmulo de miltefosina causado não somente pelo defeito do transporte de miltefosina para dentro da célula a partir da inativação do transportador de miltefosina MT, e/ou sua beta-subunidade Ros3, bem como por um aumento do efluxo mediado pela superexpressão de proteínas de transporte do tipo ABC (COELHO *et al.*, 2012). Isso fica notório no caso de um isolado de *L. infantum* de um paciente soropositivo para HIV (MHOM/FR/2005/LEM5159) que recebeu múltiplas doses de tratamento com miltefosina. O sequenciamento do genoma do parasito revelou a presença de um *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*) na translocase aminofosfolipídica do gene transportador de miltefosina de *L. infantum* (*LiMT*), resultando na substituição de um ácido glutâmico por uma glutamina, e uma mutação de fase de leitura no gene *LiRos3*, gerando um codon de parada prematuro (VAN BOCKSTAL *et al.*, 2020, MONDELAERS *et al.*, 2016). Diante desse cenário, dentre os genes estudados até o momento e que revelaram estar relacionados ao processo de resistência destacam-se *LiMT*, *LiRos3*, *LiABCG6* e *LiABCG4* (CASTANYS-MUNOZ *et*

al., 2008; PONTE SUCRE *et al.*, 2017). Além disso, o gene *aquaporina-1 (AQP1)* foi inserido no presente estudo já foi descrito na literatura como importante alvo para estudos de resistência, uma vez que, observa-se níveis de transcrição aumentados de *AQP1* pelo parasito quando resistente, restringindo a entrada de miltefosina (MISHRA; MADHUBALA; SINGH, 2021).

É visto que a resistência está relacionada a mutações no transportador de miltefosina (MT) ou no gene *ROS3*, sendo que, juntos, codificam subunidades de um complexo transportador que é responsável pelo influxo da miltefosina (VAN BOCKSTAL *et al.*, 2020). O estudo de Mondelaers e colaboradores (2016) mostrou a inativação do complexo proteico LiMT e LiRos3 como o principal mecanismo para a resistência à miltefosina em amastigotas intracelulares, mostrando-se essencial para a atividade de translocação fosfolipídica (FRANSSEN *et al.*, 2020). São encontradas mutações pontuais no transportador de miltefosina MT e sua subunidade beta Ros3 previamente reportados em parasitas com resistência experimentalmente induzida (BHANDARI *et al.*, 2012). Ou seja, o aumento da transcrição dos genes *LiMT* e *LiRos3* é observado em cepas sensíveis à miltefosina, cujo fato é corroborado por estudos promovendo a deleção de ambos genes em cepas de *L. infantum*, sendo observado um aumento da resistência dos parasitos à miltefosina (COELHO *et al.*, 2012).

Enquanto isso, as proteínas LiABCG6 e LiABCG4 (*ATP-binding cassette transporters*) são transportadores do tipo ABCG localizados na membrana plasmática de *Leishmania* sp. Enquanto o aumento da transcrição de *LiABCG6* confere resistência significativa a agentes como miltefosina a partir da redução do acúmulo da droga dentro da célula, o aumento da transcrição de *LiABCG4* confere resistência de forma geral a compostos alquil-fosfolipídeos como a miltefosina (CASTANYS-MUÑOZ, *et al.*, 2007; CASTANYS-MUÑOZ *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2012). Ademais, o mesmo padrão é esperado do gene *AQP1*, que codifica para a proteína AQP1, um canal bidirecional de membrana celular, também envolvido no influxo da miltefosina (MISHRA; MADHUBALA; SINGH, 2012), de forma que sua maior transcrição está vinculada ao fenótipo de resistência à miltefosina em cepas de *L. infantum* (KULSHRESTHA *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Entre os anos de 2010 e 2020, o programa de controle da leishmaniose da Secretaria Municipal de Saúde do município de Florianópolis testou 19.130 amostras de soro de cães, dentre as quais, 671 (3,50%) foram consideradas soro-reagentes para *Leishmania* spp. (3,5%), constituindo casos autóctones (DIVE/SC, 2020). Em Florianópolis, os primeiros casos de LVC foram registrados em 2010, quando quatro cães da localidade Canto dos Araçás, no Bairro Lagoa da Conceição, apresentaram exames positivos para a doença. O aumento do número de casos na Ilha de Santa Catarina pode ser atribuído à permanência de animais positivos nas localidades, ao deslocamento de animais infectados para áreas com a presença do inseto vetor e às condições ambientais favoráveis à sua proliferação (DIVE/SC: <http://www.saude.sc.gov.br>). Além disso, pode-se destacar também o desmatamento de grandes áreas e a ocupação da ilha de forma desordenada, com grande fluxo de migrantes. Somando-se a esse contexto, é importante destacar também que já foram registrados três casos humanos de LVH (SMS, 2017). Considerando que o município de Florianópolis é uma área endêmica para LV desde 2010, enfatiza-se a importância da realização de estudos que visam aprofundar o conhecimento acerca da doença canina, uma vez que esses animais são considerados importantes reservatórios do parasito no contexto urbano de transmissão, e também devido ao aumento acelerado do número de casos de LVC na região.

A despeito da existência de um programa de controle da LVC no município, a grande população de cães de rua e a elevada taxa de reposição de animais pelos tutores são fatores que dificultam a eficiência do programa. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de tratamento dos cães comprovadamente diagnosticados com a infecção por *L. infantum* no Brasil desde 2016 utilizando apenas fármacos de uso veterinário registrados para esse fim no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entretanto, sucessivos ciclos ineficazes de tratamento levam ao risco da seleção de linhagens de parasitos resistentes a drogas, com evidente perigo à saúde humana (Coelho *et al.*, 2012). Apesar disso, estudos antigos datando de 2004 (OUELLETTE *et al.*, 2004) já retratavam a miltefosina como um fármaco apresentando características obsoletas, de forma que a resistência já era denotada há 17 anos e, ainda no presente, ressaltada.

Tendo em vista o cenário apresentado acima, faz-se necessário um melhor entendimento acerca dos aspectos relacionados aos padrões de transcrição de genes que conferem resistência ao principal fármaco utilizado no Brasil para tratamento da LVC: a

miltefosina. Ademais, ressalta-se a importância de o estudo ser realizado com cepas de *L. infantum* isoladas de cães soropositivos do município de Florianópolis em virtude do caráter geográfico da região, que se constitui em uma ilha, onde pode ter havido a introdução de populações de *L. infantum* geneticamente homogêneas.

3. HIPÓTESE

Considerando-se o acima exposto e os dados da literatura, a hipótese é de que populações isoladas de *L. infantum* oriundas de cães, especialmente após tratamento para LVC, residentes no município de Florianópolis possuam níveis de transcrição dos genes *LiMT*, *LiRos3*, *LiABCG4*, *LiABCG6* e *AQP1* compatíveis com os padrões de resistência à miltefosina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de transcrição de genes relacionados ao fenótipo de resistência à miltefosina em cepas de *L. infantum* isoladas de cães naturalmente infectados, antes e após o tratamento e procedentes de duas regiões geográficas distintas.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a taxa de infectividade *in vitro* e o percentual de amastigotas por macrófago de diferentes isolados de *L. infantum* provenientes de cães portadores de LVC;
2. Avaliar a susceptibilidade *in vitro* à miltefosina de diferentes isolados de *L. infantum* provenientes de cães naturalmente infectados, antes e após o tratamento para LVC;
3. Determinar, *in vitro*, a concentração mínima inibitória (IC₅₀) de miltefosina de parasitos isolados de cães infectados por *L. infantum* antes e após o tratamento para LVC;
4. Quantificar os níveis de expressão relativa de genes associados à resistência a fármacos em populações de *L. infantum* isoladas de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento.

5. METODOLOGIA

5.1 Procedimentos éticos e obtenção dos isolados de *L. infantum*

O trabalho contou com um total de oito isolados de *L. infantum* a partir de amostras biológicas provenientes de oito cães distintos, além da cepa referência MHOM/BR/74/PP75. O estudo foi desenvolvido a partir da colaboração previamente estabelecida entre o Laboratório de Protozoologia e o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) da Prefeitura Municipal de Florianópolis (PMF), cuja parceria permitiu a realização de coletas do material biológico de cães soropositivos para *Leishmania* spp. que foram eutanasiados pelo órgão em decorrência de seus respectivos tutores não terem optado pelo tratamento, ou cães de rua abrigados pelo CCZ e posteriormente diagnosticados como infectados. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Santa Catarina (Protocolo nº 6251290719/2019).

Além disso, outro estudo em andamento em nosso laboratório que visa avaliar a carga parasitária de *L. infantum* em cães de Florianópolis naturalmente infectados antes e após o tratamento com miltefosina, e cujos tutores concordaram em que seus animais participassem do estudo, permitiu o isolamento de cepas de *L. infantum* que foram incluídas no presente estudo. Da mesma forma, este estudo foi aprovado pela CEUA/UFSC sob protocolo número 3559300818/2018.

O isolamento de *Leishmania* sp. a partir de amostras clínicas de cães residentes em Florianópolis foi realizado através do cultivo de aspirado de linfonodo em meio de cultura *Schneider's insect medium* (Sigma-Aldrich, France), sendo os isolados depositados e criopreservados na coleção do Laboratório de Protozoologia da UFSC. Além disso, dois isolados provenientes de cães portadores de LVC e tratados com miltefosina (Cão 01 e Cão 02) foram gentilmente cedidos pelo Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL) do Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz (MG). Esses animais tiveram o aspirado de medula óssea coletado em dois momentos: antes do início do tratamento (T0) e 6 meses após o início do tratamento com a miltefosina (T2)

Entre os isolados de cães com LVC provenientes de Florianópolis, dois foram denominados como Cão 03 e Cão 04, tendo sido originados de animais que não foram tratados com miltefosina, logo, são definidos no estudo como não tratados (NT). Além disso, o estudo também contou com amostras de três cães com diagnóstico parasitológico

confirmado para LVC, cujos tutores optaram pelo tratamento do animal. Assim sendo, foram realizadas coletas de aspirado de linfonodo antes do início do tratamento (T0) e 31 dias após o início do tratamento (T1) destes cães com MilteforanTM, sendo denominados como Cão 05, Cão 06 e Cão 07. Uma amostra anteriormente isolada em Florianópolis e caracterizada de *L. infantum* denominada Cão 08 foi utilizada para determinação da multiplicidade de infecção (MOI) para os ensaios *in vitro* e da IC₅₀. Também foi incluída no estudo a cepa referência MHOM/BR/74/PP75 como controle positivo em ensaios biológicos e moleculares. Na Tabela 1, estão apresentadas as diferentes condições e origem de cada isolado de *L. infantum* utilizado neste estudo.

Tabela 1: Origem, presença/ausência de tratamento e tempos de coleta das amostras de cada um dos cães abordados no presente estudo.

Cepa	Sexo	Origem	Tratamento	Momento da coleta da amostra
Cão 01	Macho	Iguatama (MG)	<i>In vivo</i>	T0 e T2
Cão 02	Fêmea	Iguatama (MG)	<i>In vivo</i>	T0 e T2
Cão 03	Macho	Florianópolis (SC)	Não tratado	Necrópsia
Cão 04	Fêmea	Florianópolis (SC)	Não tratado	Necrópsia
Cão 05	Macho	Florianópolis (SC)	<i>In vivo</i>	T0 e T1
Cão 06	Macho	Florianópolis (SC)	<i>In vivo</i>	T0 e T1
Cão 07	Fêmea	Florianópolis (SC)	<i>In vivo</i>	T0 e T1
Cão 08	Fêmea	Florianópolis (SC)	Não tratado	Necrópsia
MHOM/BR/74/PP75	-	Icatu (BA)	Não tratado	Cepa referência

T0: coleta de aspirado de linfonodo antes do tratamento com miltefosina; T1: coleta de aspirado de linfonodo 31 dias após o início do tratamento com miltefosina; T2: coleta de aspirado de medula óssea 6 meses após o início do tratamento com miltefosina.

5.2 Cultivo de formas promastigotas de *L. infantum*

Para o cultivo das formas promastigotas, independentemente de a origem ser de parasitos obtidos por coleta de amostras em cão eutanasiado ou em cães submetidos a tratamento *in vivo*, o procedimento seguiu o padrão pré-estabelecido na literatura (Hockmeyer *et al.*, 1981). O cultivo de formas promastigotas foi realizado em meio de cultura Schneider em tubos de fundo cônico a uma temperatura de 26,5 °C, sendo repicadas a cada 5 a 7 dias durante a fase logarítmica de crescimento, não tendo sido utilizados nos ensaios isolados com mais de 10 repiques. Após o cultivo, os parasitos

foram confirmados como pertencentes à espécie *L. infantum* a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene *Hsp70* e posterior restrição com a enzima *HaeIII*.

5.3 PCR-RFLP de *Hsp70* para identificação das espécies de *Leishmania*

Após o cultivo, os parasitos foram confirmados como pertencentes à espécie *L. infantum* a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene *Hsp70* e posterior restrição com a enzima *HaeIII*. Para tanto, foram amplificadas alíquotas de 2,0 µL de DNA a partir de iniciadores que amplificam um fragmento de 1300pb de *Hsp70* (Garcia *et al.*, 2004). A reação de PCR foi realizada objetivando um volume final de 25 µL a partir de 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTP (Promega), 5,0% DMSO (Invitrogen), 0,2 U de *Taq DNA Polimerase Platinum*[®] (Invitrogen), 0,4 µM de cada iniciador (IDT, prodimol). A amplificação dos fragmentos de DNA foi processada em termociclador *Veriti*[™] 96-Well Fast Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA) alternando 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 61 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos, seguido por um passo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0 % corado por brometo de etídeo (10 mg/mL) durante 1 hora em tampão TBE a 100 V. As amostras que amplificaram a banda específica de 1300 pb foram submetidas à digestão pela enzima de restrição *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (*RFLP*). A reação de digestão foi realizada adicionando 0,5 U/µL de *HaeIII* (Invitrogen) em tampão próprio da enzima a 10,0 µL de produto de PCR, seguindo-se de incubação a 37 °C por 2 horas. Assim, os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 2,0% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *T. cruzi* (CL Brener), além de um controle de cão sabidamente positivo para a LVC e controles negativos da PCR e da restrição. Os registros fotográficos dos géis foram obtidos pelo fotodocumentador L-PIX EX (LOCCUS).

5.4 Cultivo e manutenção da linhagem celular THP-1

As células monocíticas humana THP-1 foram obtidas do criobanco do Laboratório de Protozoologia (UFSC) e foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 2 mM de L-

glutamina e 1 mM de Piruvato de sódio, pH 7,4, sendo esse denominado adiante no texto como meio RPMI-1640 completo. Os cultivos foram realizados em garrafas plásticas de 25 mL, com filtro, na posição horizontal em estufa com temperatura de 37 °C com 5% de CO₂ durante 3 ou 4 dias de crescimento, quando o número de células era determinado em câmara de Neubauer (Diluição 1:20).

5.5 Diferenciação de células THP-1 em macrófagos aderentes

O total de células THP-1/mL foi centrifugado à 1.344 x g por 8 minutos seguido de remoção do sobrenadante, e então adicionado às células um total de 5 mL de meio RPMI-1640 completo. Após contabilização em câmara de Neubauer, foram adicionados 100 µL da suspensão celular na concentração de 2x10⁵ células com adição de 1% de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) sobre lamínulas circulares de vidro estéreis dispostas em placas de 24 poços (BD Falcon, USA), e posterior incubação por 4 horas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Então, foram adicionados 0,5 mL de meio RPMI completo com mais 1% de PMA para a incubação ser realizada durante 72 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

5.6 Determinação da multiplicidade de infecção (MOI) e infecção das células THP-1 com *L. infantum*

Para a determinação da multiplicidade de infecção (MOI), quatro diferentes concentrações de célula:parasito foram testadas a partir de 2x10⁵ células THP-1 diferenciadas em macrófagos aderentes, conforme o descrito no item 5.5. Nos poços onde se objetivava a contagem celular por microscopia, foram adicionadas lamínulas circulares estéreis, para simular os diferentes cenários: somente células, células infectadas com um dos isolados de *L. infantum* do estudo na presença ou ausência das drogas miltefosina e anfotericina B como controle positivo. Aos demais poços, não se adicionou lamínula, pois o conteúdo foi direcionado à extração de DNA e RNA. Os parasitos foram obtidos conforme o descrito no item 5.2, lavados em PBS estéril (pH 7,2) e centrifugados a 1.344 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo acrescidos de meio RPMI-1640 sem SFB e tendo sua concentração ajustada para as proporções célula:parasito desejadas. Antes dos experimentos de interação com células THP-1, os parasitos foram incubados com 10% de soro humano do tipo B+ para a opsonização dos parasitos por 1 hora a 37 °C e 5% de CO₂, sendo lavados com PBS estéril (pH 7,2) e centrifugados por 2.240 x g por

10 minutos à temperatura ambiente e adicionados de meio RPMI 1640 sem adição de SBF.

Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços (BD Falcon, USA) e as proporções célula:parasito testadas foram 1:4, 1:7, 1:10 e 1:15. Após (BD Falcon, USA) 5 horas de infecção a 37 °C e 5% de CO₂, lavou-se a placa com 500 µL de PBS estéril (pH 7,2) para remoção dos parasitos não aderentes (Tempo zero), sendo adicionado 450 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em cada poço da placa, sendo a mesma incubada por um período de 24 horas a 37 °C com 5% de CO₂. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS (pH 7,4), coradas com panótico rápido (Laborclin) conforme protocolo do fabricante, secas em temperatura ambiente e fixadas de forma invertida sobre lâminas de microscopia com Entellan[®] (Merck). A determinação da MOI foi realizada através de microscopia ótica pela contagem do número de células infectadas em um total de 200 células aleatoriamente escolhidas em um aumento de 40x. A partir dos valores obtidos, a melhor relação parasito:célula foi estabelecida considerando as diferentes concentrações abordadas e o percentual de infecção encontrado, buscando a maior otimização dessas variáveis.

5.7 Incubação das células infectadas com miltefosina

Após o tempo de 24 horas de infecção, os poços submetidos à teste por adição de droga receberam a adição de 50 µL da concentração a ser testada de miltefosina nos poços correspondentes, e os controles foram submetidos à concentração de 8 µM de Anfotericina B. A placa foi incubada com os fármacos por 48 horas para posteriores extrações de DNA e RNA, enquanto as lamínulas foram direcionadas para contagem em microscopia ótica num total de de 200 células por lamínula. Em cada célula foi contabilizada a quantidade de parasitos interiorizados e, caso a célula estivesse parasitada, era contabilizada como uma unidade infectada.

5.8 Determinação da IC₅₀ relativa à droga miltefosina nos diferentes isolados de *L. infantum*

A determinação da IC₅₀ se deu em duas etapas realizadas em triplicatas técnicas, e seguindo os passos de diferenciação celular conforme tópico 5.5, infecção das células de acordo com o tópico 5.6, e testes com adição das concentrações de miltefosina conforme apresentada no tópico 5.7. Assim, inicialmente, para testes pilotos, foi utilizado o isolado Cão 08 para ensaios de infecção com as concentrações de miltefosina de 15µM,

5 μM e 0,5 μM . Plotados em um gráfico no programa GraphPad Prism 8 a partir de regressão não-linear, a estatística sugeriu o valor de 1,9 μM como concentração inibitória de 50% das células para esse isolado. Esse valor de IC_{50} estabelecido como 1,9 μM foi utilizado para todos os testes envolvendo adição de miltefosina *in vitro*.

Entretanto, em um segundo momento, também foram determinadas as concentrações inibitórias inerentes a cada isolado. Novamente foram adicionadas as concentrações de 15 μM , 5 μM e 0,5 μM , além da concentração pré-determinada de 1,9 μM de miltefosina. Assim, foi determinada a IC_{50} dos isolados no estudo conforme regressão não-linear a partir de análise pelo programa GraphPad Prism 8.

5.9 Avaliação da expressão de genes de resistência a drogas anti-*Leishmania*

5.9.1 Extração de RNA total

Uma quantidade de 5×10^8 células provenientes dos poços de experimentos, foi homogeneizada por 5 minutos com 1 mL do reagente TRIzol[®] (ThermoFischer), de forma que o volume de amostra não excedesse 10% do volume de TRIzol[®]. Após, foi adicionado clorofórmio na proporção de 200 μL para cada 1 mL de TRIzol[®] seguida de agitação e incubação por 3 minutos à temperatura ambiente. A seguir, centrifugou-se as amostras por 13.440 x g por 15 minutos em temperatura de 4 °C. A fase aquosa recebeu 60% de volume de isopropanol P.A. As amostras foram então centrifugadas a 13.440 x g por 20 minutos em temperatura de 4 °C. Após, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado e homogeneizado com 1 mL etanol 75% gelado. A amostra foi então centrifugada por 8.400 x g por 5 minutos a uma temperatura de 4 °C e a seguir o sobrenadante foi descartado e o tubo mantido em estufa por alguns minutos para secagem do etanol. Por fim, adicionou-se 50 μL de água livre de RNAses e o tubo foi armazenado em freezer a -80 °C para posterior precipitação dos ácidos nucleicos por acetato de sódio 3M (pH 5,5).

5.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA por transcrição reversa, o RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro a 230, 260 e 280 nm para ser determinada a concentração do material em ng/ μL e posterior observação das razões 260/280 e 260/230 nm. Consideradas satisfatórias, as concentrações de RNA foram ajustadas para a obtenção de 1 μg de cDNA.

Para cada amostra, foram adicionados, em um tubo, tampão da enzima DNase I (Thermo Fisher Scientific), DNase I a 0,1 U/ μL (Thermo Fisher Scientific), e calculados

os volumes de RNA, sendo o restante volume final de 10 µL da reação completados com água livre de RNAses. Após, incubou-se a amostra por 30 minutos em equipamento de banho seco à 37 °C e, então, foi adicionado de EDTA a 4,5 mM (*Thermo Fisher Scientific*) para incubação por 10 minutos em temperatura de 65 °C. Adicionou-se *OligoDT* (Invitrogen) a 4,2 µM e incubou-se por 5 minutos a uma temperatura de 70 °C. Após, foram adicionados ao tubo o Tampão de Reação 2X (*Thermo Scientific*), 0,5 mM de desoxirribonucleotídeos (dNTP), e 8 U da enzima *Maxima Reverse Transcriptase* (*Thermo Scientific*), 1 U/µL de *RiboLock RNase Inhibitor* e o restante do volume de água livre de RNAses, totalizando, no final da reação, um volume de 25 µL. A amostra foi então incubada por 60 minutos a uma temperatura de 45 °C em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA).

5.9.3 Padronização e otimização das reações de PCR em tempo real (RT-qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR) foi utilizada para quantificar a expressão relativa de genes relacionados a susceptibilidade ou resistência à miltefosina nos diferentes isolados de *L. infantum* do presente trabalho. O desenho dos iniciadores objetivou principalmente não gerar um alto teor de conteúdo GC no produto amplificado, não favorecer a estrutura secundária *hairpin* e evitar possíveis dímeros entre essas sequências, além da obtenção de produtos de amplificação com cerca de 100 pares de base (pb). Todos os iniciadores utilizados para esse trabalho encontravam-se em concentração final na reação de 0,3 pmol. É importante ressaltar que, em todas as placas de qPCR, foi adicionada uma amostra de cDNA de célula THP-1 não infectada como controle de especificidade dos iniciadores e da RT-qPCR.

A tabela 2 sumariza as sequências dos iniciadores desenhados para amplificação dos genes de interesse e dos genes de referência utilizados no estudo utilizando-se a plataforma digital PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A prospecção dos iniciadores do presente estudo se deu com base nas análises dos oito genomas sequenciados a partir dos isolados de *L. infantum* obtidos de cães e de um caso de LVH procedentes de Florianópolis, SC (dados não publicados). Além dessas sequências, incluiu-se também o genoma referência de *L. infantum* JPCM5 depositado no banco de dados da plataforma GenBank. Uma vez que não foram encontradas diferenças nucleotídicas nas sequências gênicas dos alvos de interesse - *LiMT*, *LiABCG6*, *LiRos3*, *LiABCG4*, *AQPI* – foi realizado o desenho de iniciadores com a especificidade esperada.

Tabela 2: Sequência de iniciadores utilizados no estudo.

Gene amplificado	Sequência de nucleotídeos dos iniciadores	Temperatura de ligação	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>LiMT</i>	5' CTGTGGTACGTCTTCGCTCTT 3' 3' CGTTCAACTCGGGGTCGTTA 5'	57 °C	211
<i>LiABCG6</i>	5' GGAAAGTGAAGCCAGACGGA 3' 3' ACACGTTCAAGGCTGATTGCT 5'	57 °C	101
<i>LiRos3</i>	5' CGGCTTGATTTTCGCTACGA 3' 3' GGTTGTAGTAGCCGGAGACA 5'	56 °C	325
<i>LiABCG4</i>	5' GCCGTGAACTTTACCTGGGA 3' 3' ACACCCGCTGAGGTTGAAAA 5'	60 °C	102
<i>AQP1</i>	5'CTGTGTCTTTGGTGCCTTTCC 3' 3' GCCTTTTGGGCGTCGTC 5'	60 °C	129
<i>SSU</i>	5' TCTAGGCTACCGTTTCGGCTT 3' 3' CACACACCGAACCGAAGTTG 5'	60 °C	60
<i>CytB</i>	5' CCCCTCAGACTGATATTTGTCCTCA 3' 3' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 5'	60 °C	359

As reações de RT-qPCR para os genes de interesse *LiMT*, *LiABCG6*, *LiRos3*, *LiABCG4*, *AQP1* e o gene de referência *SSU rRNA* (*Small Subunit ribosomal RNA*) abordados no estudo foram padronizadas até a satisfatória obtenção de produtos de amplificação específicos. Assim, para os genes *LiABCG6*, *LiRos3*, *LiABCG4*, *AQP1* e *SSU* utilizou-se, em reação de 10 µL totais, 2 µL do cDNA a uma concentração de 100 ng/µL, 0,3 pmol de cada iniciador e demais reagentes do kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) seguindo protocolo do fabricante. Para o gene *LiMT*, foi padronizado utilizando um volume de 0,4 pmol de cada iniciador. Os ciclos de amplificação foram realizados de acordo com as temperaturas e tempos de: 50 °C por 1 minuto, seguido de 95 °C por 10 minutos e então amplificação de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos seguido da temperatura de hibridação de cada iniciador por 15 segundos e extensão a 60 °C por mais 15 segundos. Após, a ciclagem é finalizada pela curva de dissociação dos iniciadores, a qual demonstra a temperatura em que metade do produto de qPCR está dissociado e a outra metade hibridado. Com esses dados, foi possível verificar a especificidade do produto amplificado. Além disso, para confirmar se os genes de interesse não foram amplificados em células THP-1, foi adicionada uma amostra de cDNA puro dessas células nas reações de qPCR.

5.9.4 Cálculo e obtenção dos valores de expressão relativa

Para a obtenção dos valores de expressão relativa, o método utilizado foi o limite de detecção comparativo (Ct - *cycle threshold* comparativo), a partir da metodologia de Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), em que a eficiência entre o gene de referência e o gene alvo deve ser próxima de 100% com um máximo de 5% de diferença entre ambos. Ou seja, a partir dos dados obtidos, calcula-se a taxa de expressão relativa individual para cada gene de interesse em relação ao gene de referência *SSU*, cuja transcrição deve ser mantida independente da condição experimental. Esse método permitiu visualizar quantas vezes (*fold-change*) o gene de interesse estava mais ou menos expresso em relação ao gene de referência.

5.10 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foram realizados testes de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. Após confirmada a normalidade da distribuição das amostras, foi realizada ANOVA-2-way com análise *post-hoc* de teste de Tukey. As estatísticas foram executadas no *software* GraphPad Prism 8.

6. RESULTADOS

6.1 Identificação específica dos isolados de cães utilizados no presente estudo

O perfil da PCR-RFLP dirigido ao gene *Hsp70* confirmou que todos os isolados utilizados no estudo são pertencentes à espécie *L. infantum* (Figura 4).

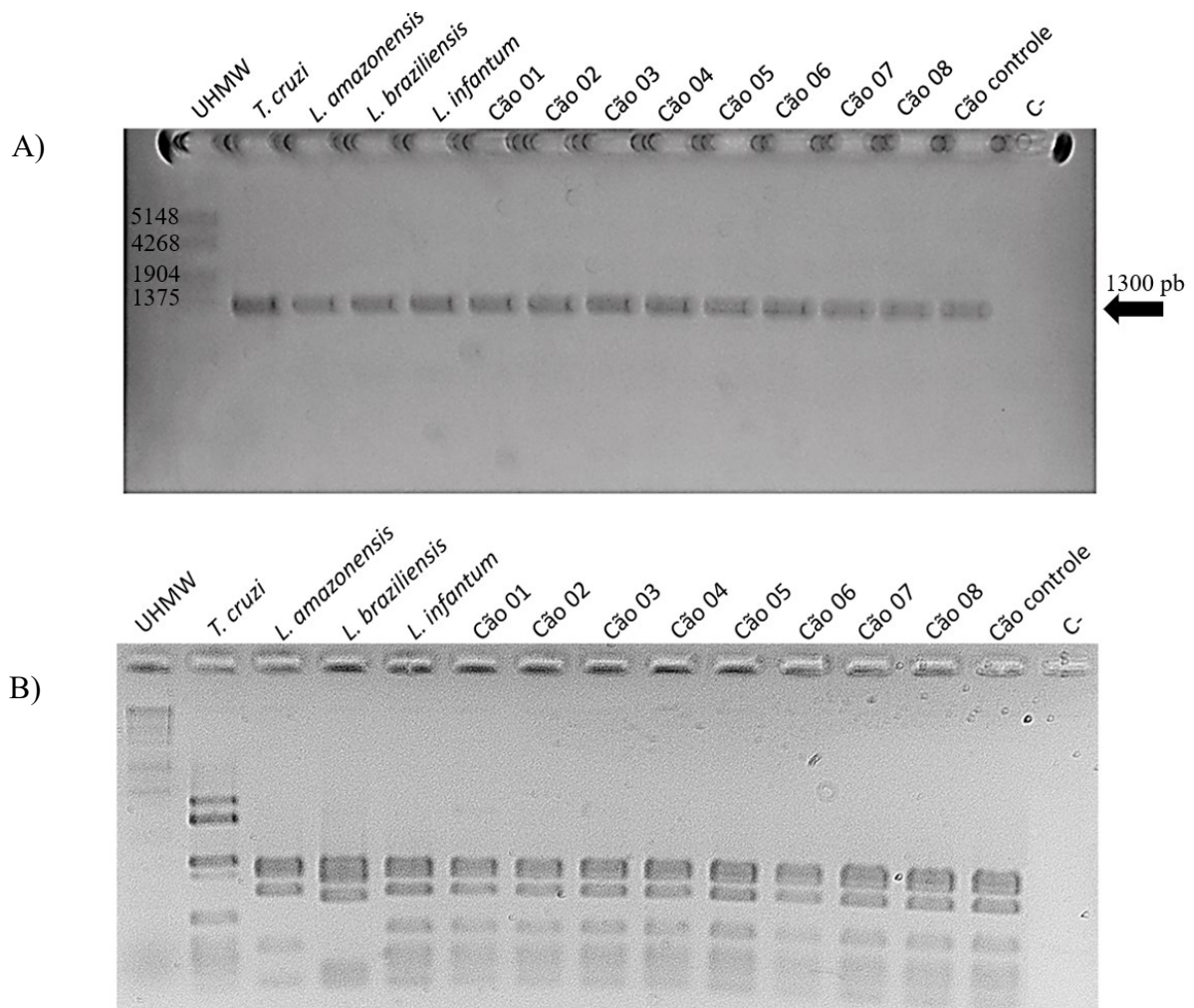


Figura 4 Eletroforese em gel de agarose 2,0%. A) Padrão de bandas correspondente ao fragmento de 1.300pb do gene *Hsp70* amplificado por PCR convencional e B) digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição *HaeIII*, corados pelo brometo de etídeo revelando os perfis de restrição de PCR-RFLP das diferentes espécies de tripanosomatídeos e isolados abordados no estudo.

6.2 Determinação da multiplicidade de infecção (MOI)

Os resultados alcançados a partir dos testes estipulados para a obtenção da MOI mediante diferentes proporções de amastigotas por macrófago estão ilustrados na tabela 3. Conforme observado, a melhor proporção célula:parasito foi de 1:10, na qual obteve-se a melhor média de amastigotas por macrófago em relação à média de células infectadas.

Tabela 3: Taxas médias de amastigotas por macrófago e porcentagem de células infectadas relativas a cada proporção de amastigotas por macrófago.

Multiplicidade de infecção (MOI)	Média de amastigotas por macrófago	Média de células infectadas
1:4	2,49	47,75%
1:7	3,45	63,13%
1:10	3,85	65,25%
1:15	3,31	67,57%

6.3 Determinação da IC₅₀ dos diferentes isolados de *L. infantum* provenientes de cães portadores de LVC frente à miltefosina

A IC₅₀ da miltefosina definida em testes-piloto com o isolado Cão 08 foi de 1,9 µM que foi determinada pelas taxas de infecção relativas nos testes utilizando diferentes concentrações de miltefosina (0,5, 5 e 15 µM) (Figura 4). Além disso, foi realizada uma repetição desse experimento como contraprova nas mesmas condições com o isolado Cão 08 e também com a adição do valor de IC₅₀ de 1,9 µM de miltefosina no ensaio. Obteve-se, assim, uma taxa de 50,31% de infecção com 1,9 µM de miltefosina, confirmando como valor obtido o IC₅₀ para esse isolado.

O valor de 1,9 µM de miltefosina estabelecido como IC₅₀ foi utilizado nos demais testes de sensibilidade/resistência das cepas de *L. infantum*. Os resultados individuais de IC₅₀ para os isolados Cão 01 a Cão 07 nos diferentes tempos (T0, T1 e T2) em relação ao tratamento dos cães *in vivo* variou entre concentrações de 0,4 µM até 15,65 µM. Os valores detalhados para cada cepa e seu respectivo IC₅₀ estão elencados na tabela 4.

Tabela 4: IC₅₀ *in vitro* dos isolados incluídos no estudo a partir de testes com concentrações de 0,5 µM, 1,9 µM, 5 µM e 15 µM.

Cepa	Condição de tratamento/coleta do animal <i>in vivo</i>	IC ₅₀ da miltefosina
Cão 01	T0	9,68
	T2	0,4
Cão 02	T0	6,16
	T2	4
Cão 03	NT	1,03
Cão 04	NT	1,67
Cão 05	T0	3,83
	T1	15,65
Cão 06	T0	5,52
	T1	1,74
Cão 07	T0	2,73
	T1	6,07

T0: antes do tratamento; T1: 31 dias após o início do tratamento; T2: 6 meses pós-tratamento; NT: não tratado.

6.4 Taxas de infecção dos isolados de *L. infantum* em macrófagos THP-1

A fim de analisar o perfil de infectividade dos parasitos e sua susceptibilidade ou resistência à miltefosina, os diferentes isolados de *L. infantum* provenientes de cães com LVC antes e após o tratamento foram comparados. Para o estabelecimento da taxa de infecção (Figura 7) dos diferentes isolados de *L. infantum* do estudo, utilizou-se a concentração de miltefosina de 1,9 µM previamente obtida para aplicação em todas os isolados, mesmo que seus respectivos IC₅₀ apresentassem valores individuais distintos de 1,9 µM. Abaixo, na tabela 5 estabelecem-se os valores de infecção para os isolados de 01 a 07 submetidos à 1,9 µM de miltefosina acompanhados das respectivas circunstâncias de coleta: antes do tratamento (T0), 31 dias após o início do tratamento (T1) e seis meses pós tratamento (T2).

Tabela 5: Valores médios da taxa de infecção de macrófagos diferenciados THP-1 por formas amastigotas de *L. infantum* isoladas de cães portadores de LV em diferentes tempos do tratamento *in vivo* (antes e após tratamento) e na presença de 1,9 μ M ou ausência de miltefosina em experimentos *in vitro*, além da cepa referência PP75.

Cepa	Momento da coleta	Condição Experimental <i>in vitro</i>	Taxa Média de Infecção
Cão 01	T0	Não tratado	73,7%
		Tratado	66,3%
	T2	Não tratado	56,3%
		Tratado	29,0%
Cão 02	T0	Não tratado	75,5%
		Tratado	61,0%
	T2	Não tratado	74,0%
		Tratado	54,0%
Cão 03	Necrópsia	Não tratado	68,5%
		Tratado	45,0%
Cão 04	Necrópsia	Não tratado	64,7%
		Tratado	50,2%
Cão 05	T0	Não tratado	67,3%
		Tratado	66,2%
	T1	Não tratado	70,5%
		Tratado	72,5%
Cão 06	T0	Não tratado	62,5%
		Tratado	65,8%
	T1	Não tratado	61,7%
		Tratado	54,7%
Cão 07	T0	Não tratado	67,7%
		Tratado	64,3%
	T1	Não tratado	69,5%
		Tratado	69,8%
PP75	Cepa referência	Não tratado	44,5%
		Tratado	28,7%

T0: antes do tratamento; T1: 31 dias após o início do tratamento; T2: 6 meses pós-tratamento; NT: não tratado.

Os resultados individuais de infecção para os isolados Cão 01, Cão 02 e para as cepas Cão 03 e Cão 04 estão ilustradas na figura 5, enquanto para os isolados Cão 05, Cão 06, Cão 07 e cepa referência PP75 estão elencadas na figura 6, em que são mostradas as comparações das infectividades dos diferentes isolados de *L. infantum* a partir do número de macrófagos THP-1 parasitados após infecção experimental *in vitro*. O perfil de susceptibilidade dos parasitos à miltefosina na concentração de 1,9 μ M também pode

ser observado no gráfico. Essas análises foram realizadas empregando o teste estatístico de ANOVA 2-way, seguido de *post-hoc* de Tukey comparando as condições *in vitro* das taxas de infecção na ausência e na presença de 1,9 μM de miltefosina. Foi possível observar que para os isolados dos cães 01, 02, 03 e 04 houve diferença na taxa de células infectadas antes e após a adição de miltefosina nos ensaios *in vitro* ($p < 0,0001$), com exceção do isolado Cão 01 T0, onde a taxa de infecção manteve-se a mesma nas condições de ausência e presença de miltefosina - não apresentando diferença a partir da adição da droga *in vitro*. Nos isolados Cão 05 e Cão 07, não foi observada diferença significativa na taxa de infecção antes e depois da adição de miltefosina nos ensaios *in vitro*. Enquanto isso, o isolado Cão 06 mostrou maior taxa de infecção em T0 comparando-se com T1. Na cepa referência PP75, foi possível observar que houve diferença ($p < 0,0001$) na taxa de infecção na ausência e na presença de 1,9 μM de miltefosina.

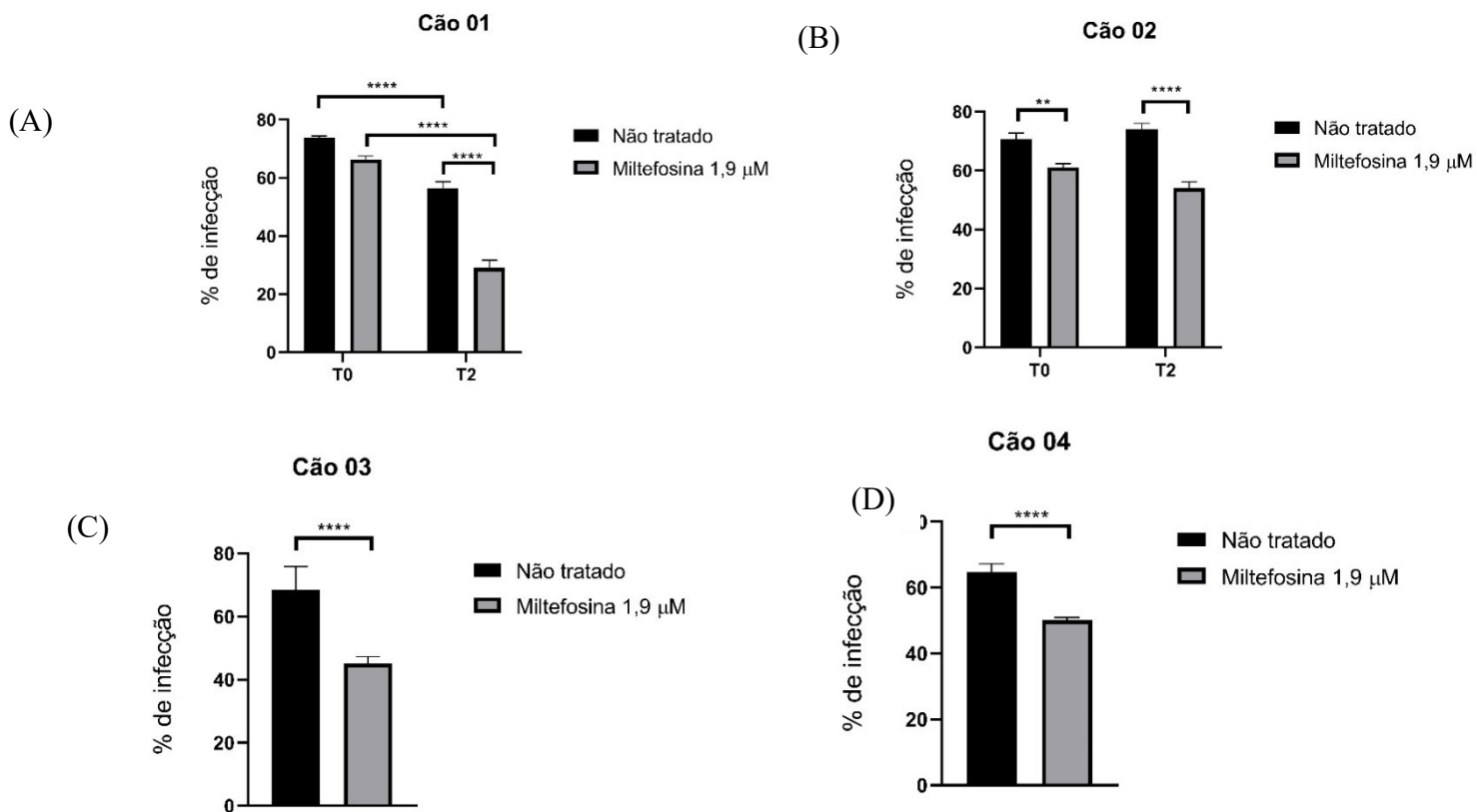


Figura 5: Taxas de infecção ($\bar{X} \pm DP$) para as amostras do estudo calculadas a partir do número de macrófagos THP-1 parasitados por formas amastigotas de *L. infantum* após infecção experimental *in vitro*, onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. (A): Cão 01; (B): Cão 02; (C): Cão 03 e (D): Cão 04.

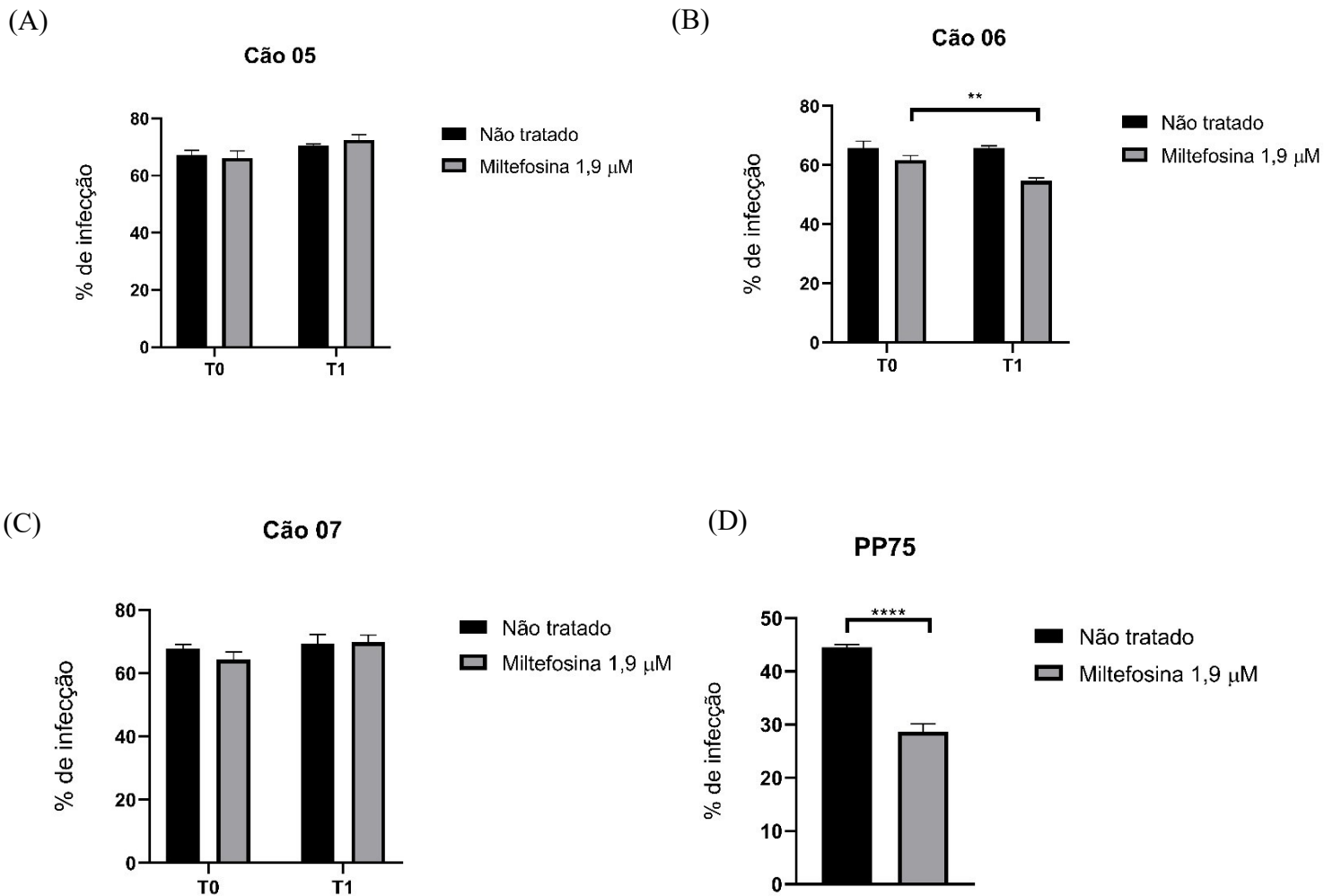


Figura 6: Taxas de infecção ($\bar{X} \pm DP$) para as amostras do estudo calculadas a partir do número de macrófagos THP-1 parasitados por formas amastigotas de *L. infantum* após infecção experimental *in vitro*, onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. (A): Cão 05; (B): Cão 06; (C): Cão 07 e (D): Cepa referência PP75.

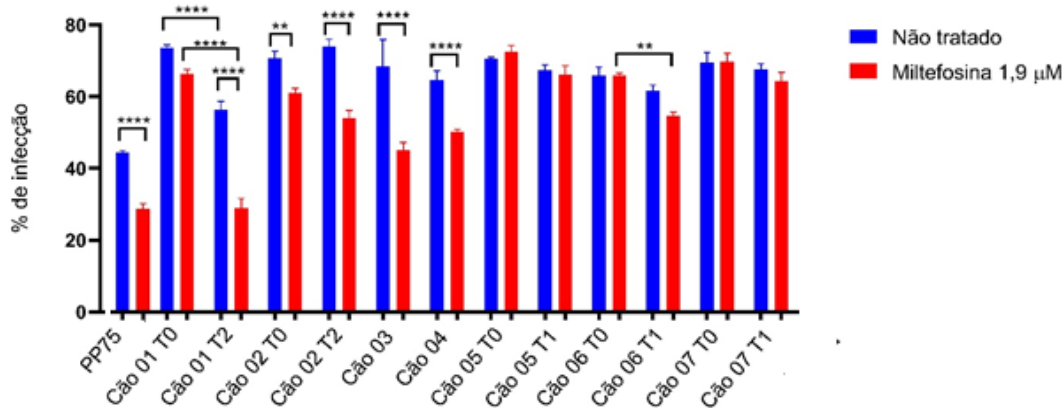


Figura 7: Taxas de infecção ($\bar{X} \pm DP$) para as amostras do estudo a partir do número de macrófagos THP-1 parasitados por formas amastigotas de *L. infantum* após infecção experimental *in vitro*, tratado com 1,9 µM de miltefosina *in vitro* (barra vermelha) e não tratado (barra azul), onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

6.5 Número de amastigotas por macrófago e índice de infecção

Além do índice de infecção (Figura 9), a determinação do número de formas amastigotas de *L. infantum* por macrófago parasitado também revela importantes dados quanto à susceptibilidade dos parasitos a drogas leishmanicidas ou leishmanioestáticas. Os resultados mostram, em sua maioria, uma tendência de diminuição do número de amastigotas por macrófago inversamente proporcional à concentração de miltefosina (Figura 8).

Não foram observadas diferenças significativas no índice de infecção entre as amostras analisadas (Figura 9), entretanto, as análises pelo teste ANOVA-2way das formas amastigotas por macrófago infectado e taxa de infecção (Figuras 7 e 8) dentro dos grupos de cada isolado permitiram identificar diferenças significativas. No isolado Cão 01, nas condições T0 e T2, foi observada, juntamente com o padrão de aumento de concentração da miltefosina, uma consequente diminuição ($p < 0,05$) na contagem de amastigotas por macrófago entre os grupos T0 e T2 com adição de miltefosina. Não foi observada diferença significativa entre o grupo T0 não tratado e o grupo T2 não tratado. Em relação às taxas de infecção, observou-se uma diminuição ($p < 0,0001$) entre T0 e T2 nos grupos tratados e não tratados *in vitro*. Enquanto isso, o isolado Cão 02 mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) não somente na comparação dos grupos T0 e T2 nas

condições não tratado e tratado com miltefosina, como também ($p < 0,05$) entre a condição não tratado e com adição de miltefosina no T2. Apesar disso, a taxa de infecção mostrou-se reduzida somente dentro de T0 ($p < 0,01$) e dentro de T2 ($p < 0,0001$), não apresentando diferença significativa na comparação dos grupos entre os dois tempos. As cepas Cão 03 e Cão 04 mostraram diferença significativa ($p < 0,0001$) na taxa de infecção em comparação entre o grupo tratado e não tratado, ainda que somente a cepa Cão 04 tenha apresentado diferença significativa na contagem de macrófagos por amastigota ($p < 0,05$) entre o grupo não tratado e o com a adição de miltefosina.

Por fim, o isolado Cão 06 também mostrou diferença na condição não tratada no tempo T0 e T1 em relação às formas amastigotas por macrófago, ainda que tenha apresentado redução significativa entre o grupo tratado em T1 em comparação com T0. Ademais, os isolados Cão 05 e Cão 07 não mostraram diferença significativa entre os grupos amostrais em relação à taxa de infecção, sendo o mesmo observado para a contagem de amastigotas por célula.

Os resultados das Figuras 7 e 8 ilustram um cenário característico, onde não é visualizada diminuição das taxas de forma significativa para as cepas Cão 05 e Cão 07. Enquanto isso, nas outras demais cepas é visualizada uma redução condizente em ambas análises, sugerindo não somente concordância entre ambos resultados, como também sugerindo o perfil de susceptibilidade ou resistência observado para cada cepa.

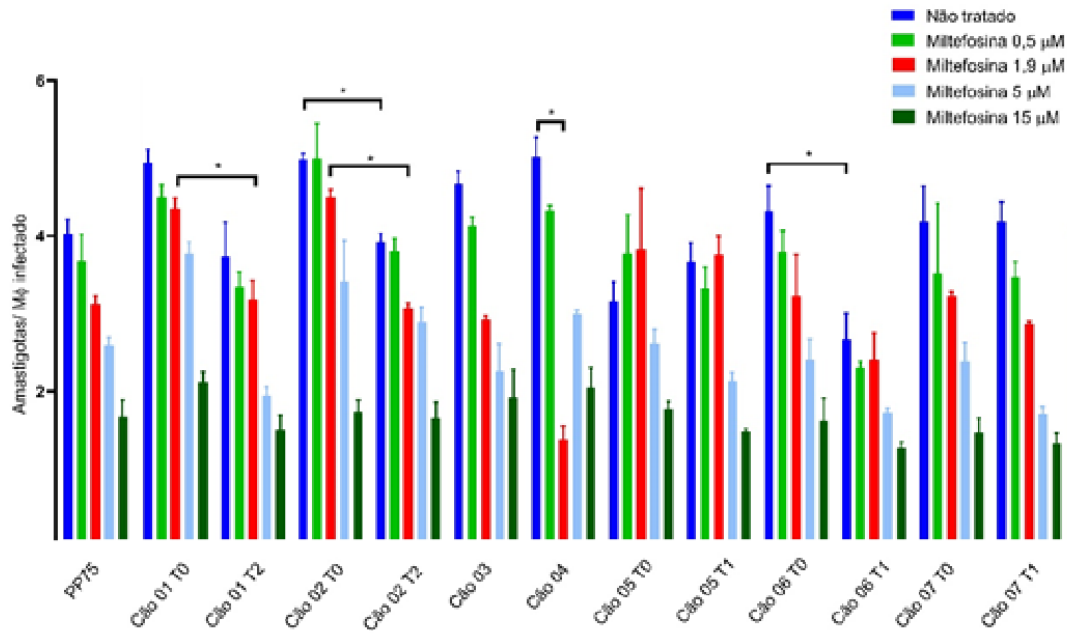


Figura 8: Taxa de amastigotas por macrófago ($\bar{X} \pm DP$) infectado para as amostras do estudo com concentrações de 0,5, 1,9, 5 e 15 μM de miltefosina *in vitro*, onde *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

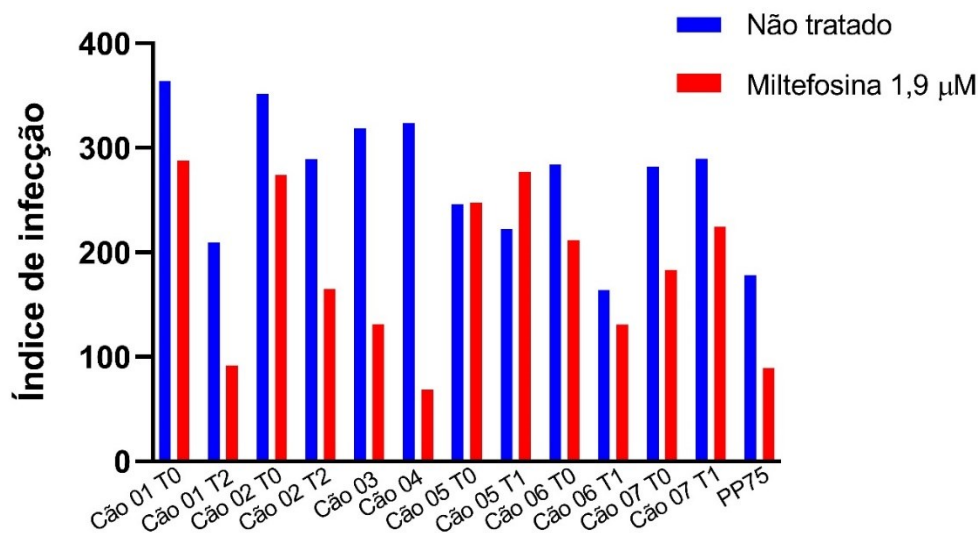


Figura 9: Índice de infecção *in vitro* dos isolados de cães em diferentes períodos do tratamento. T0: antes do tratamento; T1: 31 dias após o início do tratamento; T2: 6 meses pós-tratamento; NT: não tratado.

6.6 Padronização das reações de qPCR

As figuras 10, 11, 12, 13 e 14 ilustram as condições padronizadas para cada gene abordado no estudo a partir da curva padrão, gráfico de amplificação e curva de dissociação. Vale ressaltar que as reações finais de qPCR só foram realizadas a partir da otimização da padronização de cada reação. Os valores de R^2 obtidos para cada gene a partir da curva padrão foram, para os genes *LiMT*, *LiRos3*, *LiABCG6*, *LiABCG4* e *AQPI* de, respectivamente: 0,9887; 0,98; 0,995; 0,993 e 0,990. Esses resultados atestam a especificidade dos primers desenhados e a linearidade dos ensaios de RT-qPCR uma vez que os valores de quantificação das amostras testadas estão distribuídos dentro do intervalo definido para as curvas-padrão.

Além dos genes de interesse, foi adicionado ao estudo o gene *CytB*, referente à proteína citocromo B específica de células humanas. Dessa maneira, espera-se encontrar transcritos de *CytB* somente nas células THP-1 e não em *L. infantum*. Assim, esse gene foi utilizado como controle para a eficácia dos ensaios de infecção, sendo confirmada a não transcrição em *Leishmania* sp.

Nas reações de RT-qPCR, o fluoróforo *Sybr Green* (Promega) foi utilizado como agente intercalante, permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Os resultados foram obtidos e analisados utilizando o programa *Sequence Detection System 2.4* (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação e a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo.

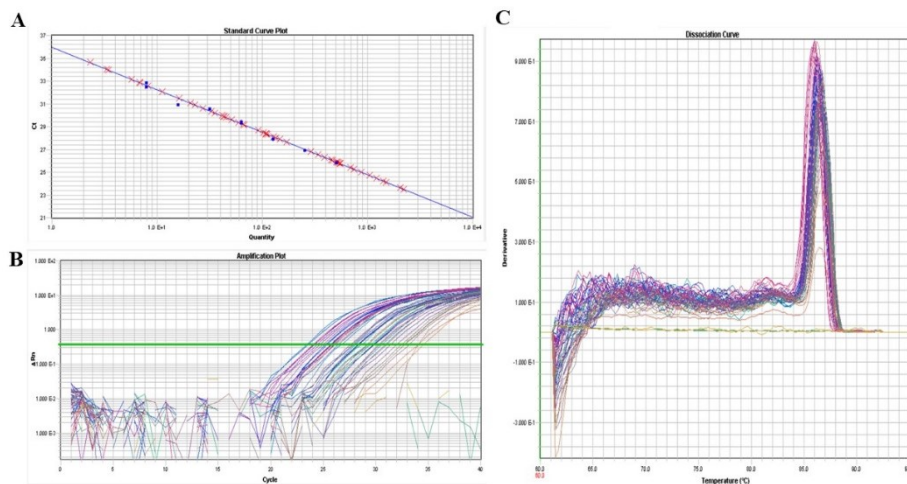


Figura 10: Dados da padronização da qPCR para o gene *LiMT*, onde (A): Curva padrão ($R^2 = 0,9887$); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação ($T_m = 86,7$ °C).

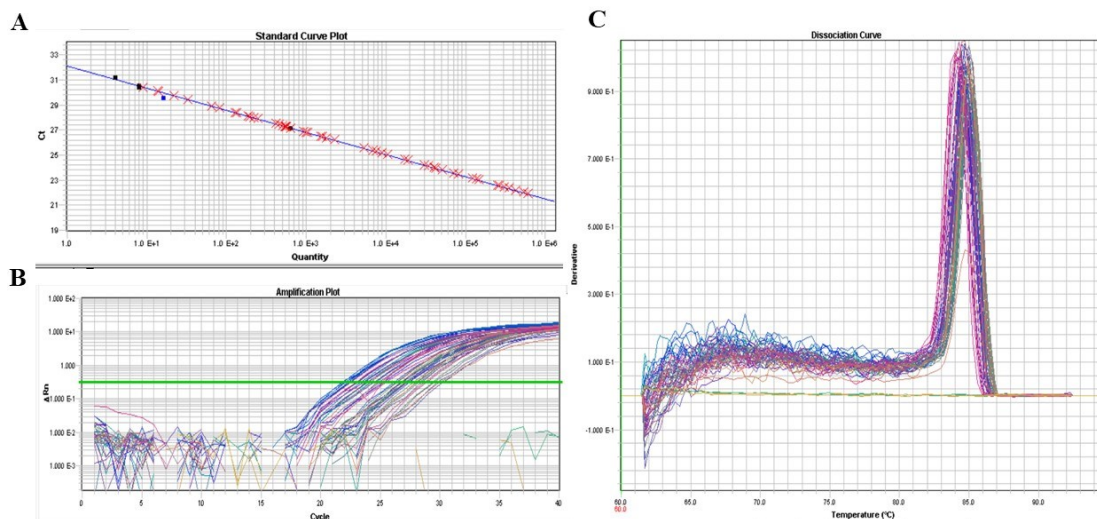


Figura 11: Dados da padronização da qPCR para o gene *LiRos3*, onde (A): Curva padrão ($R^2 = 0,98$); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação ($T_m = 85$ °C).

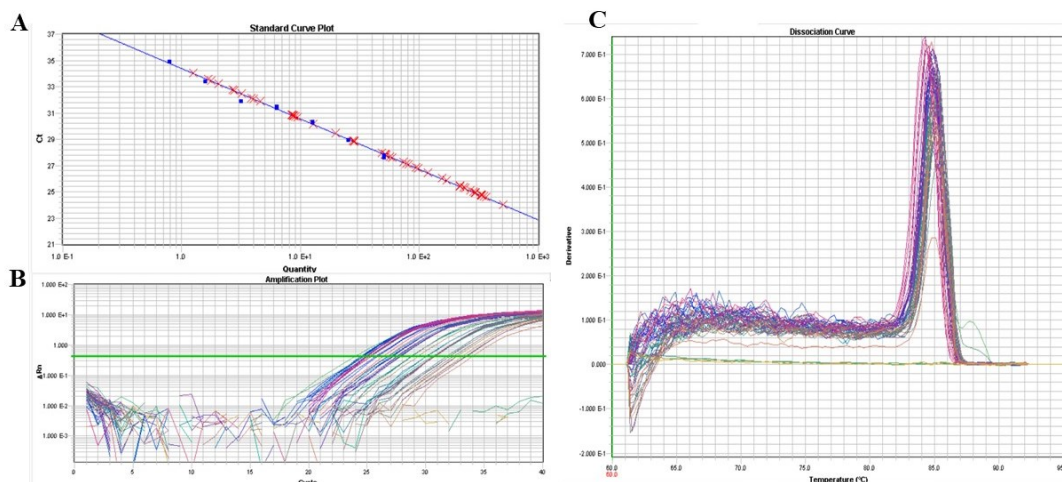


Figura 12: Dados da padronização da qPCR para o gene *AQP1*, onde (A): Curva padrão (R^2 : 0,990); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação (T_m : 84,8 °C).

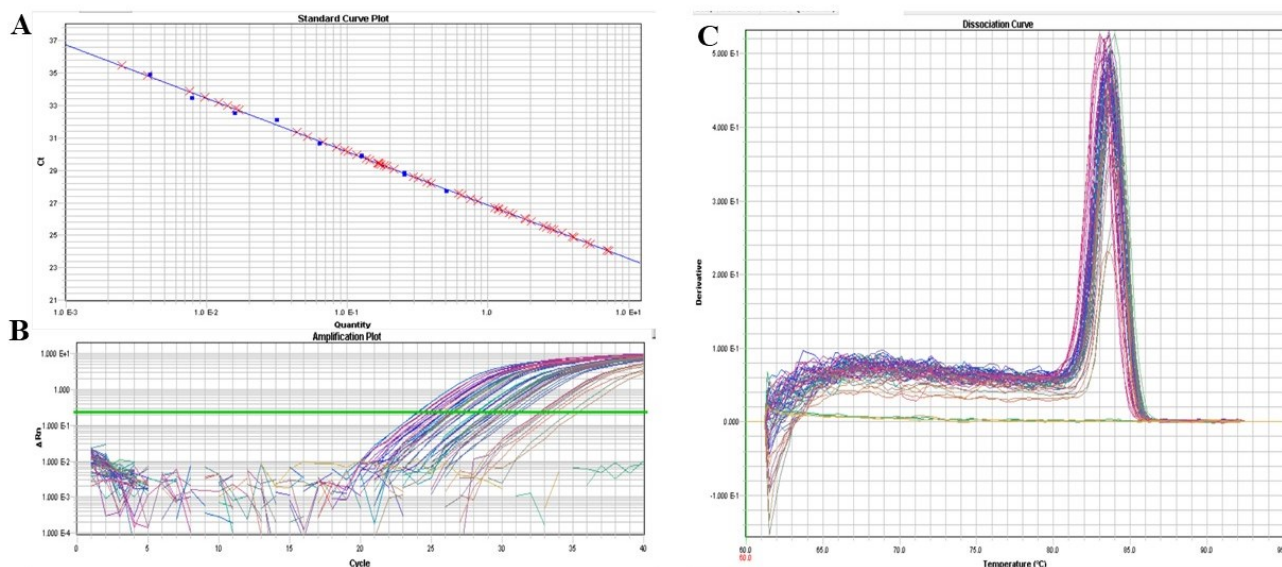


Figura 13: Dados da padronização da qPCR para o gene *LiABCG4*, onde (A): Curva padrão (R^2 : 0,993); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação (T_m : 83,5 °C).

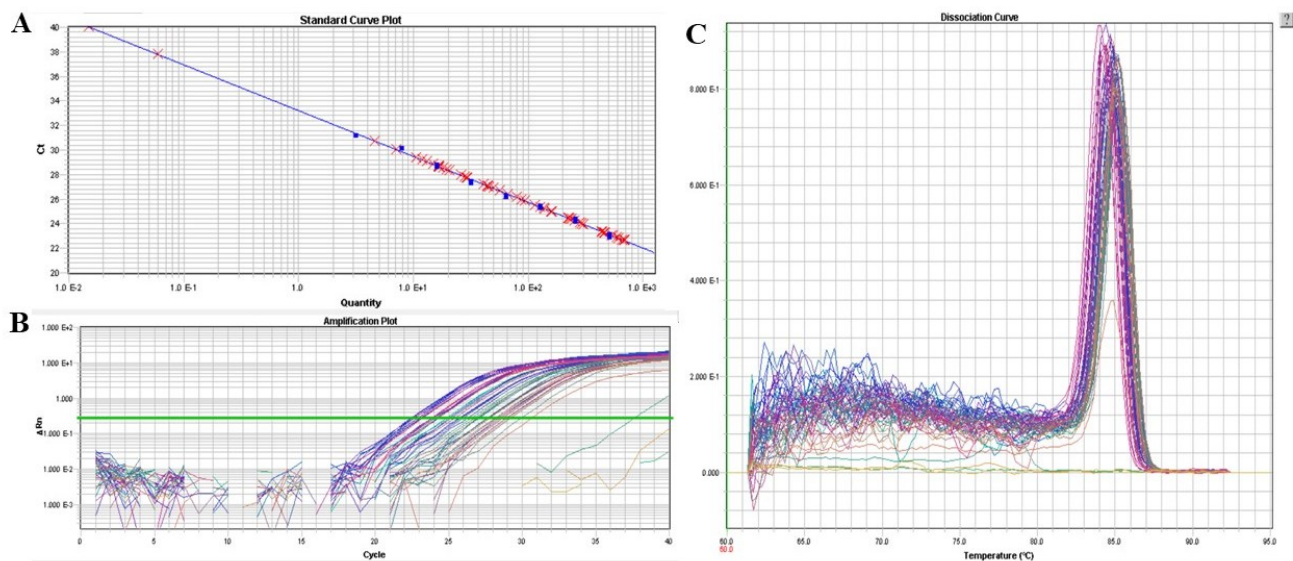


Figura 14: Dados da padronização da qPCR para o gene *LiABCG6* onde (A): Curva padrão (R^2 : 0,995); (B): Gráfico de amplificação; (C): Curva de dissociação (T_m : 84,7 °C).

6.7 Quantificação relativa de transcritos dos genes relacionados à resistência à miltefosina nos isolados de *L. infantum*

Foi possível obter os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) referentes aos cinco diferentes genes explorados no presente trabalho. O calibrador utilizado para as análises de expressão gênica relativa foi a cepa PP75, a qual foi submetida às mesmas condições de tratamento experimental que as demais cepas.

Segundo Kulshrestha (2014), sabe-se que uma maior transcrição dos genes *LiABCG6*, *LiABCG4* e *AQP1* está relacionada com o fenótipo de resistência à miltefosina. Em relação aos genes *LiMT* e *LiRos3*, níveis mais baixos de transcrição indicam que o parasito apresenta perfil de resistência ao fármaco. Em suma, as tabelas 6 e 7 ilustram os genes agrupados conforme padrão de transcrição e apontam os valores de expressão relativa obtidos para cada cepa. Ademais, a ausência de transcritos de *CytB* nas amostras controles contendo somente parasitos *L. infantum* e a transcrição esperada em células THP-1 (não-parasitadas e parasitadas), confirmou a especificidade dos iniciadores desenhados para o estudo. Ainda assim, não há um parâmetro definido de quantas vezes a quantificação dos transcritos deve aumentar ou diminuir para caracterizar o fenótipo.

Tabela 6: Quantificação relativa de transcritos dos genes *LiMT* e *LiRos3* em relação às diferentes condições de tempo e de tratamento *in vivo* assim como ausência/presença de miltefosina nos ensaios *in vitro*.

Cepa	Tempo de Coleta/Tratamento	Expressão relativa			
		<i>LiMT</i>		<i>LiRos3</i>	
		Não tratado	Miltefosina 1,9 µM	Não tratado	Miltefosina 1,9 µM
Cão 01	T0	6,06	1,14	0,92	1,05
	T2	16,97	5,06	1,37	0,4
Cão 02	T0	4,36	3,07	0,43	0,25
	T2	5,98	7,01	0,55	81,86
Cão 03	NT	4,5	12,51	1,9	1,09
Cão 04	NT	1,58	6,84	0,82	0,69
Cão 05	T0	3,72	1,6	1,43	1,24
	T1	2,3	5,33	0,56	0,81
Cão 06	T0	4,96	2,23	1,24	0,47
	T1	2,82	4,27	0,83	0,84
Cão 07	T0	1,93	3,93	0,85	1,37
	T1	0,44	0,56	1,9	1,06

Tabela 7: Quantificação relativa de transcritos dos genes *LiABCG6*, *LiABCG4* e *AQPI* em relação às diferentes condições de tempo de tratamento *in vivo* assim como ausência/presença de miltefosina nos ensaios *in vitro*.

Cepa	Tempo de Coleta/Tratamento	Expressão relativa					
		<i>LiABCG6</i>		<i>LiABCG4</i>		<i>AQPI</i>	
		Não tratado	Miltefosina 1,9 µM	Não tratado	Miltefosina 1,9 µM	Não tratado	Miltefosina 1,9 µM
Cão 01	T0	0,8	1,1	3,8	1,06	3,62	4,45
	T2	6,36	4	21,93	4,03	27,76	7,09
Cão 02	T0	1,31	1,06	2,66	2,09	3,81	3,38
	T2	0,98	2,37	4,13	3,92	3,28	14,93
Cão 03	NT	2,49	3,32	3,72	9,42	9,58	14,77
Cão 04	NT	3,68	2,96	1,71	5,28	13,32	13,32
Cão 05	T0	1,72	1,86	4,92	1,21	4,92	1,45
	T1	0,87	1,64	2,77	6,75	2,73	5,41
Cão 06	T0	1,39	0,7	3,39	1,6	3,25	1,25
	T1	1,12	1,13	2,51	3,26	1,60	2,42
Cão 07	T0	1,42	1,8	0,7	3,38	2,17	5,68
	T1	1,57	1,07	0,18	1	1,14	1,22

6.7.1 Transportador de miltefosina de *L. infantum* (*LiMT*)

A figura 15 apresenta o perfil de transcrição do gene *LiMT* obtido através da quantificação relativa por RT-qPCR com os valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ encontrados para os diferentes isolados de *L. infantum*. Foi possível observar que houve maior transcrição deste gene nos parasitos oriundos dos cães 01 e 02 após terem sido submetidos a tratamento para LVC (T2) e nos ensaios *in vitro* na condição ausência de miltefosina (colunas azuis). Observa-se também que para as cepas Cão 02 (tempo T2), 03 e 04 houve um número aumentado de transcritos após a adição de miltefosina nos ensaios de infecção *in vitro*. Considerando que a maior transcrição de *LiMT* está associada a um perfil de susceptibilidade conclui-se que os isolados 01, 02, 03 e 04 mostraram-se mais sensíveis à miltefosina em comparação com os isolados 05, 06 e 07

Ou seja, diferentemente, na figura 16 podemos observar que houve menor transcrição de *LiMT* nos isolados de *L. infantum* oriundos dos cães 05, 06 e 07 após eles terem sido submetidos ao tratamento da LVC com miltefosina no tempo T1 (31 dias após o início do tratamento) – vide tabela 06. Este perfil de transcrição está associado ao fenótipo de resistência dos parasitos à miltefosina, e é elucidado pelo menor número de transcritos observado nos isolados 05 e 06 após a adição de miltefosina em T0, quando comparado à condição sem miltefosina, na avaliação da susceptibilidade *in vitro*. Uma vez que o perfil baixo de transcrição do gene *LiMT* pode ser considerado um dos principais marcadores específicos de resistência do parasito à miltefosina, podemos concluir que as cepas dos cães 05, 06 e 07, isoladas de animais residentes no município de Florianópolis, apresentaram fenótipo de resistência nas condições experimentais deste estudo.

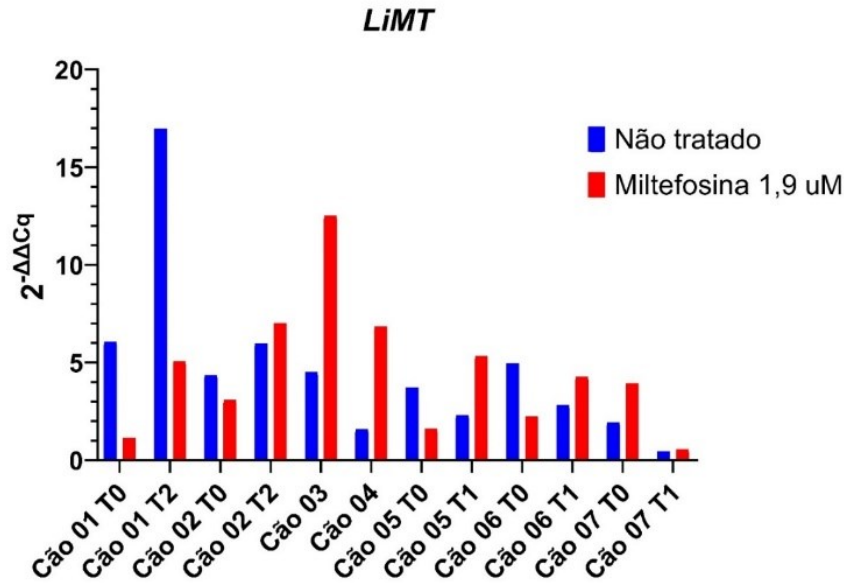


Figura 15: Perfil de transcrição do gene *LiMT* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na presença ou ausência de miltefosina.

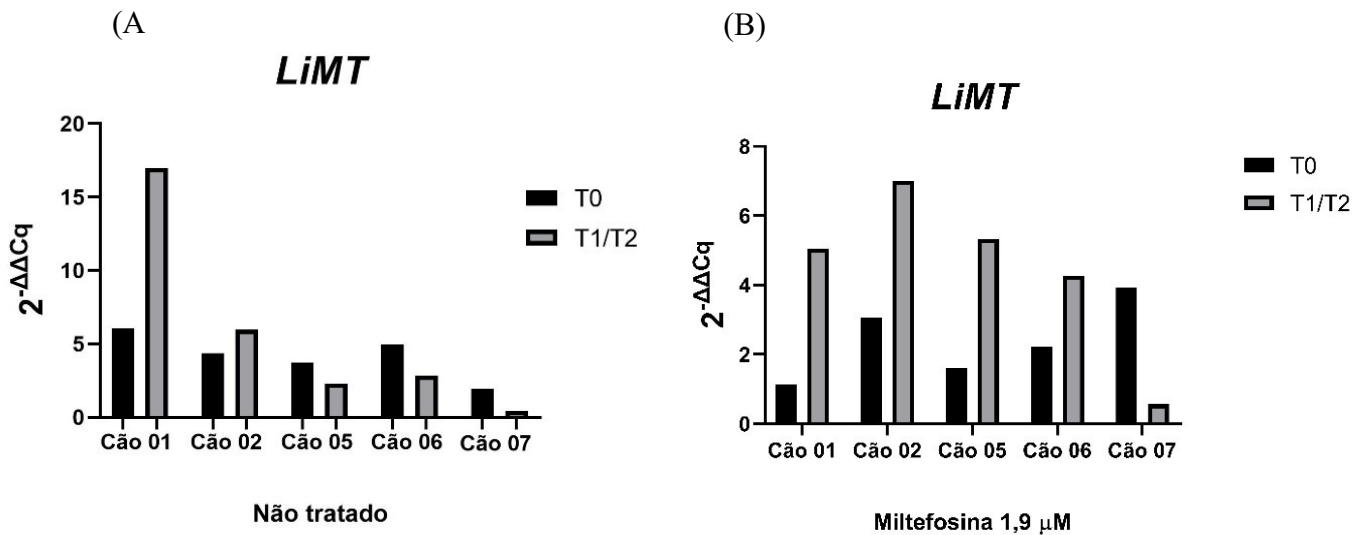


Figura 16: Perfil de transcrição do gene *LiMT* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na ausência (A) ou presença de miltefosina (B).

6.7.2 *LiRos3*

O gene *LiRos3* codifica uma proteína que está relacionada a captação do fármaco miltefosina pelos parasitos do complexo *L. donovani*. Neste estudo, a quantificação relativa de transcritos *LiRos3* por RT-qPCR está apresentada na figura 17 em escala \log_{10} para melhor ajuste dos valores no gráfico. Nessa figura, estão apresentados o perfil de transcrição de *LiRos3* obtido através da quantificação relativa com os valores de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ resultantes para os isolados de *L. infantum* (Tabela 06). Foi observado que houve uma maior transcrição nas cepas Cão 01 e Cão 02 após o tratamento com a miltefosina (T2). Também foi observado que, para as cepas Cão 02 (tempo T2) houve um número aumentado de transcrição após a adição da miltefosina *in vitro*, o que também é observado para as cepas Cão 03 e Cão 04. Assim, uma vez que a transcrição aumentada de *LiRos3* está relacionada ao perfil de susceptibilidade, pode-se inferir que os isolados Cão 01, Cão 02, Cão 03 e Cão 04 revelaram um padrão transcricional de sensibilidade à miltefosina.

De outra forma, observa-se uma menor transcrição de *LiRos3* nos isolados de *L. infantum* provenientes dos cães 05 e 06 em T1 (31 dias após tratamento *in vivo* com miltefosina), o que pode ser observado também na figura 18 (A). Esse perfil de transcrição corrobora com um fenótipo de resistência dos parasitos à miltefosina. Na figura 18 (B), que demonstra os resultados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* de infecção na presença da droga, ainda que não seja conotada diferença significativa, é observado uma diminuição do número de transcritos de *LiRos3* nos isolados Cão 05 e Cão 07 no tempo T1 pós-tratamento. Assumindo que a baixa regulação da transcrição deste gene está relacionada ao fenótipo de resistência, pode-se concluir que os isolados Cão 05, 06 e 07 revelaram nas condições experimentais deste estudo um perfil de transcrição condizente com resistência à miltefosina.

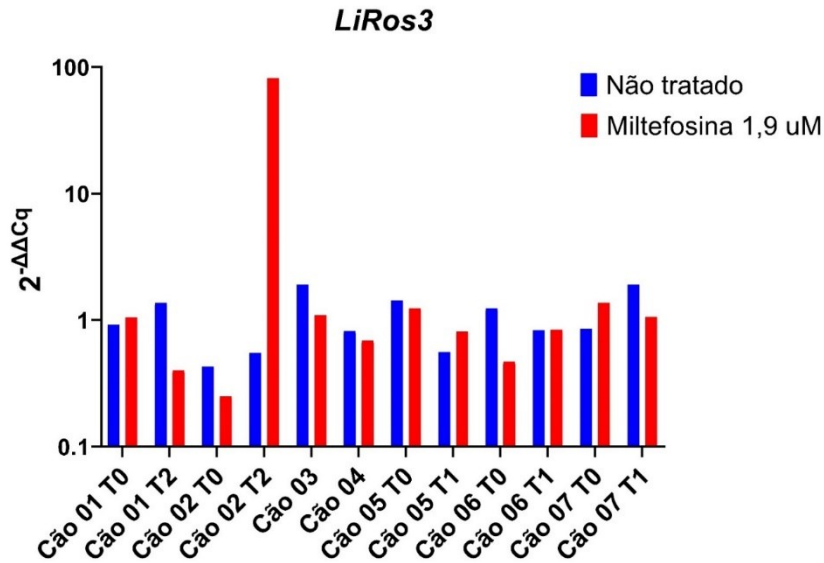


Figura 17: Perfil de transcrição do gene *LiRos3* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na presença ou ausência de miltefosina.

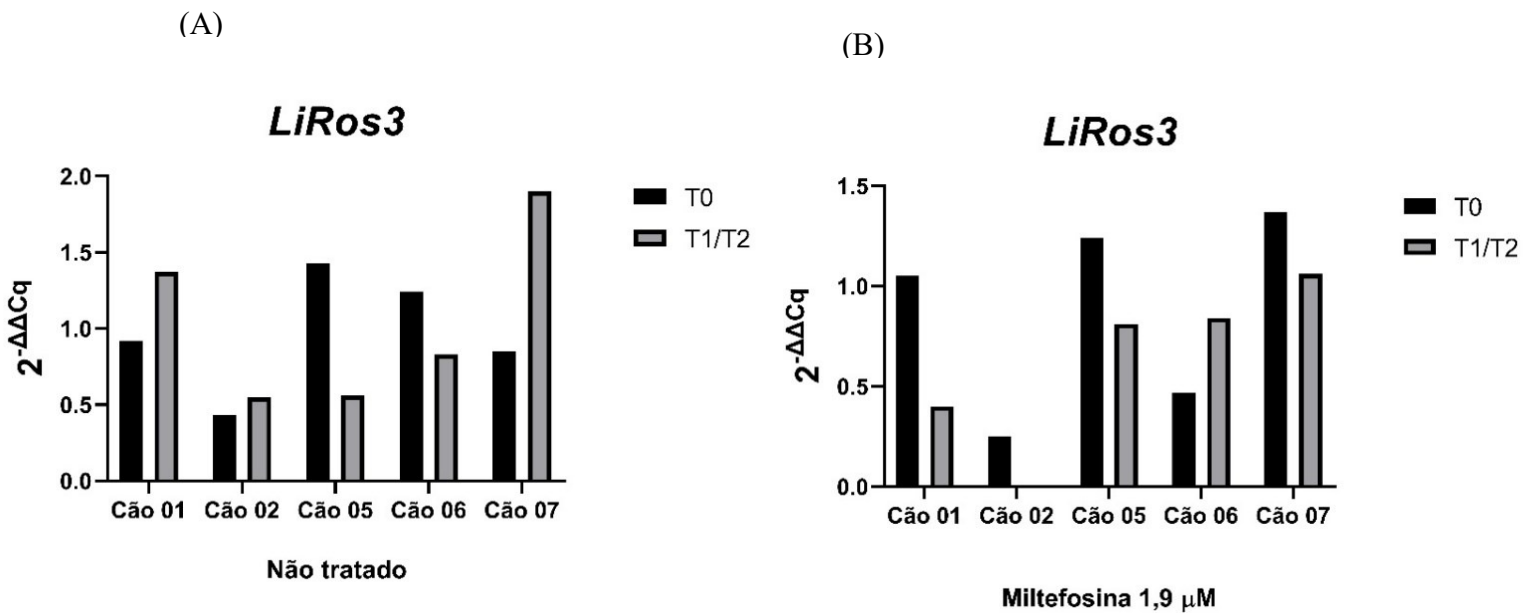


Figura 18: Perfil de transcrição do gene *LiROS3* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa da transcrição deste gene nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e também após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na ausência (A) ou presença de miltefosina (B).

6.7.3 Aquaporina-1 (*AQP1*)

A figura 19 ilustra o perfil de transcrição do gene *AQP1* obtido por quantificação relativa por RT-qPCR com os valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ encontrados para os isolados de *L. infantum* avaliados no presente estudo. Foi possível observar um maior número de transcritos na cepa Cão 02 após o tratamento *in vivo* e *in vitro*, além da cepa Cão 03 que mostrou fenótipo semelhante. O isolado Cão 01 e a cepa Cão 04 mostraram taxa de níveis de transcritos mais baixas quando comparados com os demais isolados. Entretanto, na figura 20 destacam-se a transcrição aumentada de *AQP1* nas cepas Cão 05 e Cão 06 no tempo T1 após a adição de miltefosina *in vitro*. Além disso, a cepa Cão 07 também mostrou maior transcrição em T0 após desafiada por 1,9 μ M de miltefosina. Dessa forma, é possível inferir que as cepas Cão 05, Cão 06 e Cão 07 apresentaram fenótipo relacionado à resistência nas condições do estudo, apesar de não ter sido possível estabelecer uma relação para as demais cepas testadas.

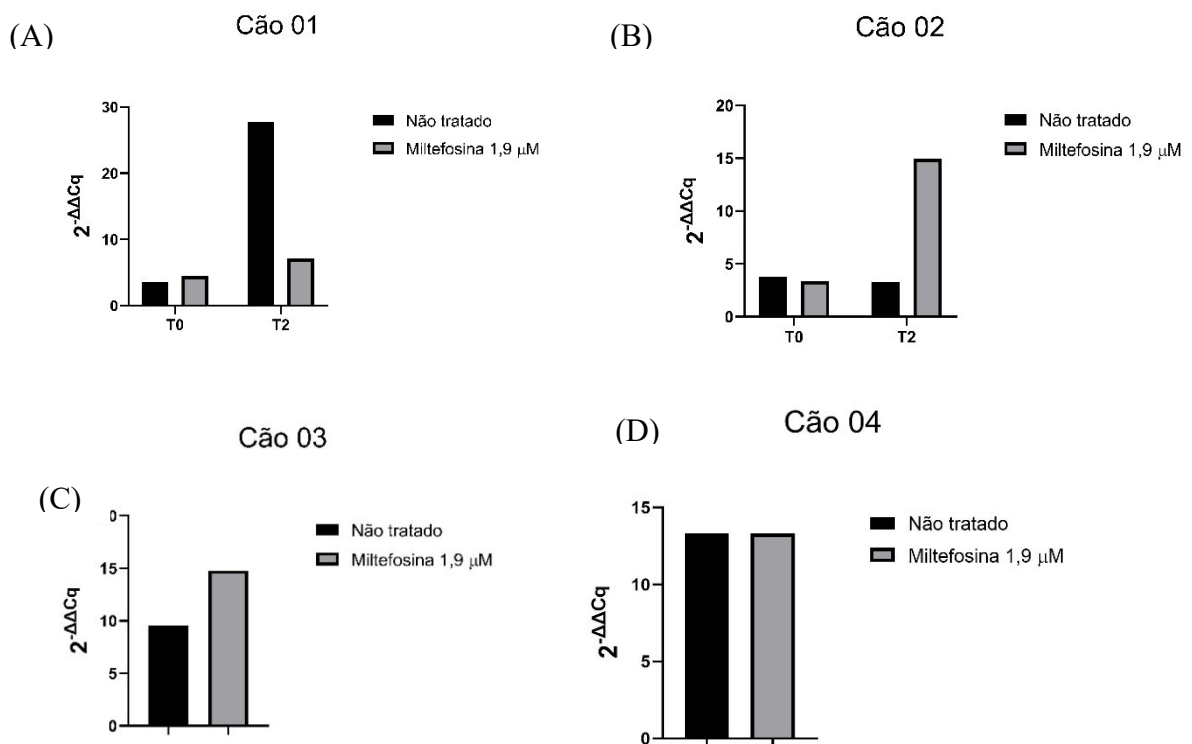


Figura 19: Perfil de transcrição do gene *AQP1* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos dos cães 01 (A), 02 (B), 03 (C) e 04 (D), antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na ausência ou presença de miltefosina.

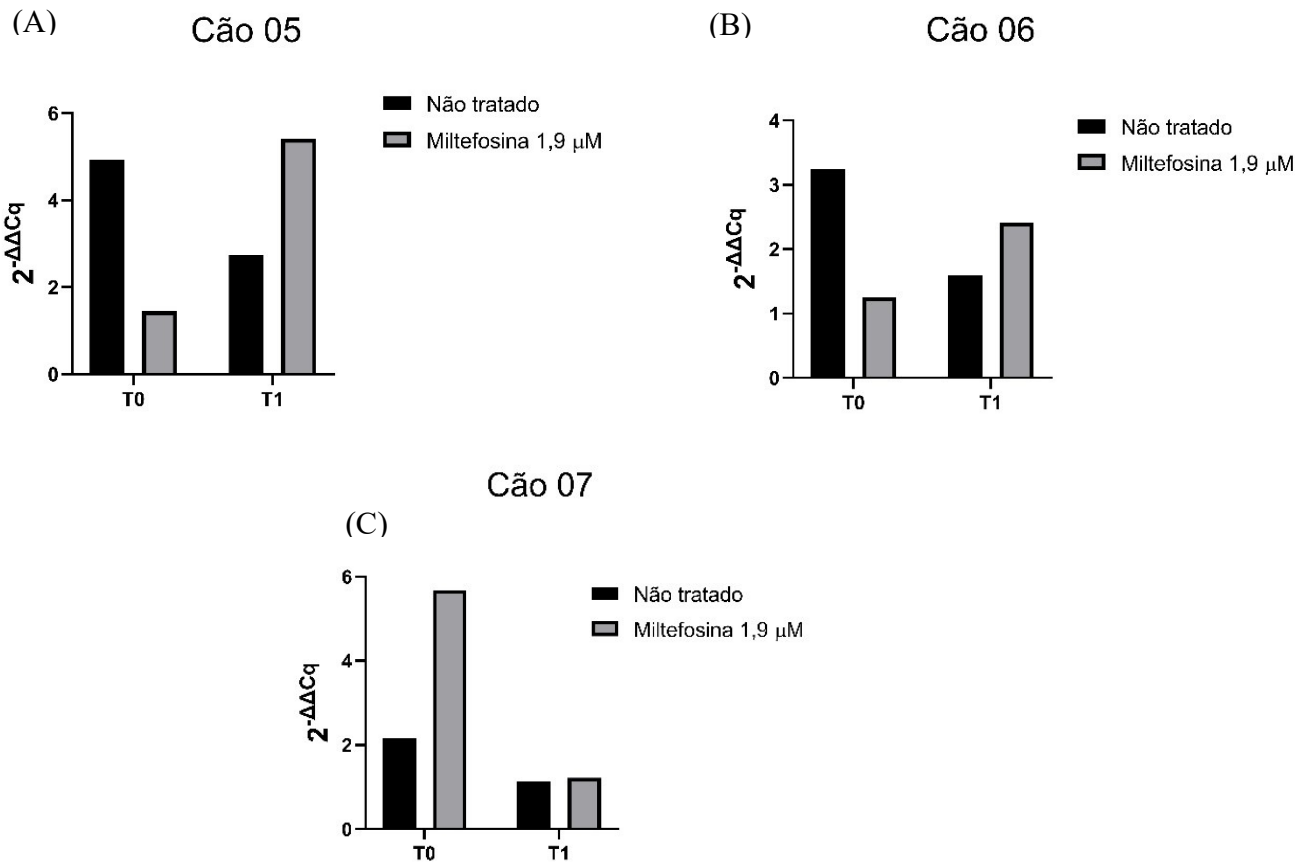


Figura 20: Perfis de transcrição do gene *AQP1* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na presença ou ausência de miltefosina. (A) Cão 5; (B): Cão 06; (C): Cão 07.

6.7.4 *LiABCG4*

O gene *LiABCG4* mostrou-se com menor transcrição nas cepas Cão 01 e Cão 02 sem a adição *in vitro* de miltefosina e com maior transcrição nos isolados dos cães 03 e 04 após adição *in vitro* de miltefosina. Ademais, as figuras 21 e 22 deixam evidente o aumento da transcrição do gene *LiABCG4* nos isolados dos cães 05, 06 e 07 obtidos após os animais terem sido tratados com miltefosina (T1) na condição experimental em que esses parasitos foram desafiados *in vitro* na presença de miltefosina 1,9 μ M. Uma vez que o aumento da transcrição de *LiABCG4* está relacionada ao caráter de resistência, concluiu-se que os isolados oriundos dos cães residentes no município de Florianópolis testados neste trabalho apresentam perfil de transcrição resistentes à miltefosina, enquanto as demais cepas mostraram-se susceptíveis.

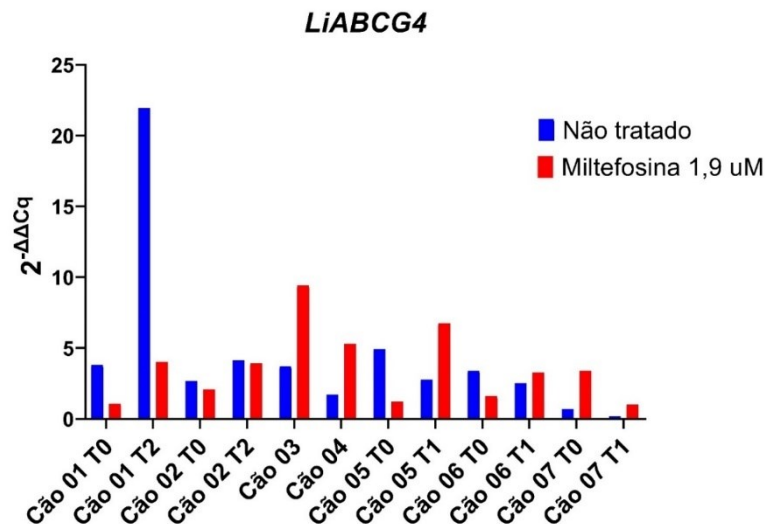


Figura 21: Perfil de transcrição do gene *LiABCG4* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na presença ou ausência de miltefosina.

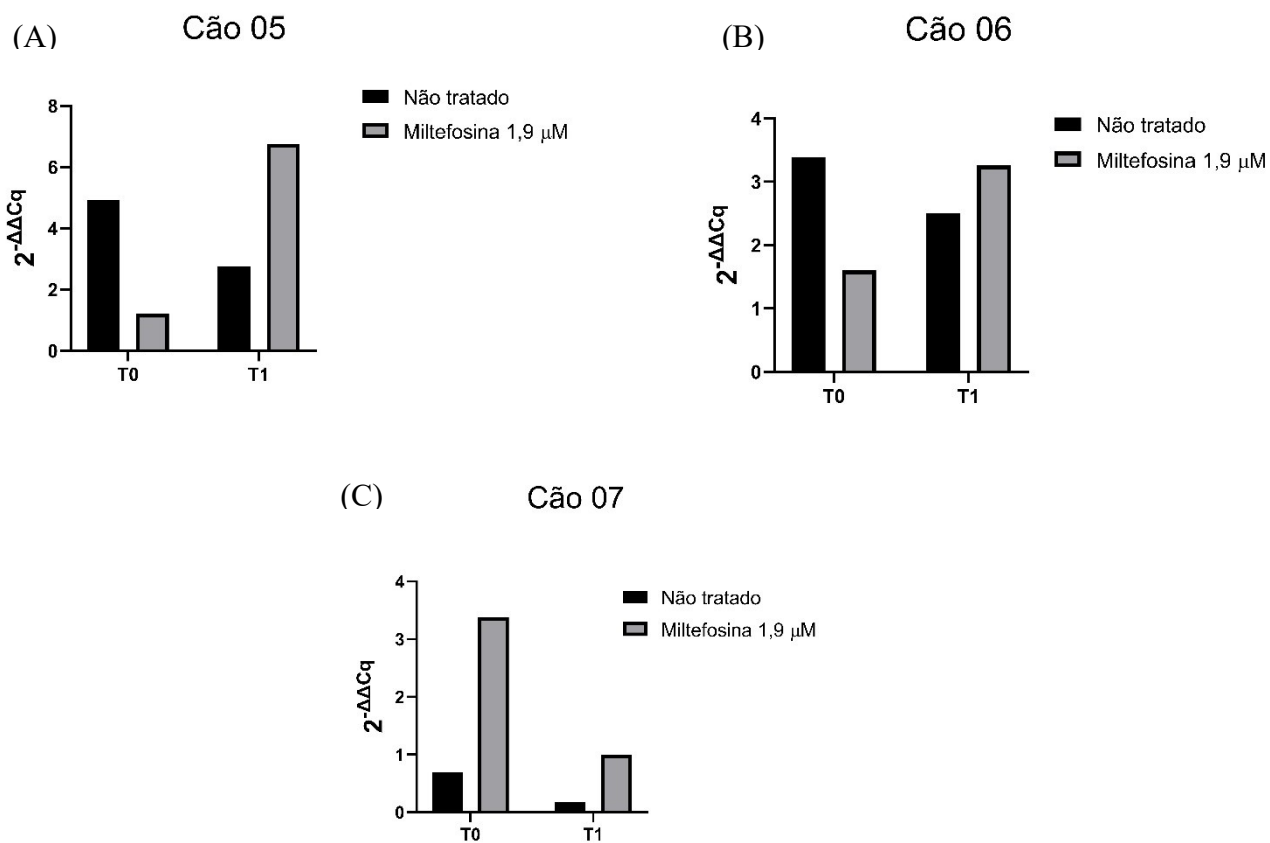


Figura 22: Perfil de transcrição do gene *LiABCG4* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos dos cães 05 (A), 06 (B) e 07 (C), antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na ausência ou presença de miltefosina.

6.7.5 *LiABCG6*

Ainda que não tenha sido detectada nenhuma diferença estatística, foi observada uma maior transcrição do gene *LiABCG6* nos parasitos das cepas Cão 01, Cão 02 e Cão 03 após o tratamento *in vivo* com a miltefosina e nos ensaios com a condição de ausência do fármaco, não sendo observado o mesmo para a cepa Cão 04 (Figura 23). Da mesma forma, nas cepas dos cães 05 e 06 houve uma menor transcrição de *LiABCG6*, ainda que na cepa Cão 05 tenha sido observada uma diminuição da taxa de transcritos em T1. A cepa Cão 07, no entanto, mostrou uma maior taxa de transcrição em T2 na condição sem miltefosina. Uma vez que, foi observada uma grande variação nos níveis de transcrição entre as cepas, a despeito das diferentes condições experimentais, conclui-se que a quantificação da transcrição do gene *LiABCG6* não se mostrou uma boa ferramenta para avaliar os isolados de *L. infantum* testados neste estudo, já que não foi possível observar um padrão associado ao fenótipo de susceptibilidade ou de resistência à miltefosina (Figura 24).

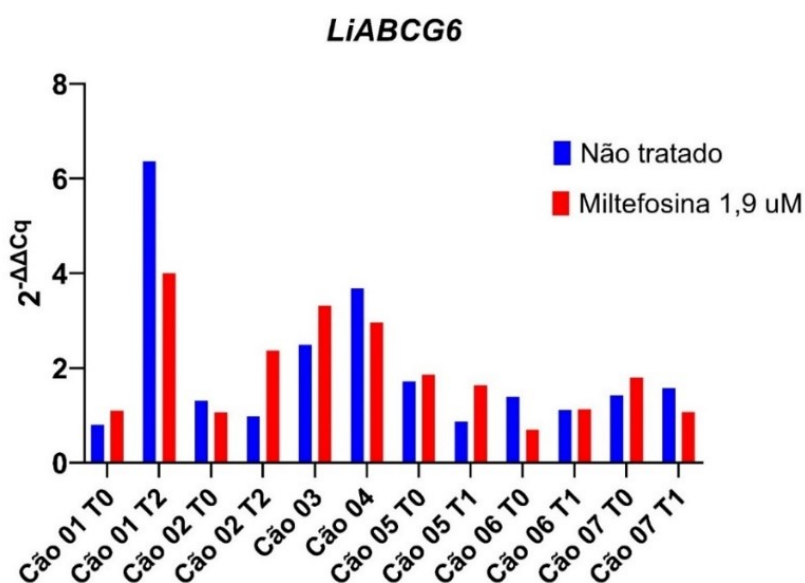


Figura 23: Perfil de transcrição do gene *LiABCG6* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na presença ou ausência de miltefosina.

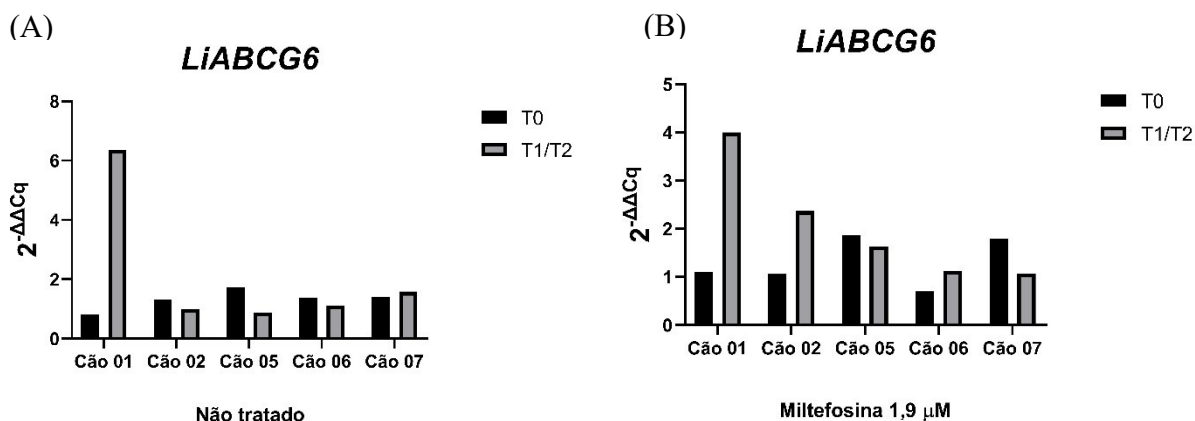


Figura 24: Perfil de transcrição do gene *LiABCG6* obtido por RT-qPCR mostrando a quantificação relativa nos isolados de *L. infantum* oriundos de cães portadores de LVC, antes e após o tratamento em diferentes tempos (T0, T1 e T2), e após diferentes condições de infecções estabelecidas *in vitro* na ausência (A) ou na presença de miltefosina (B).

A figura 25 sintetiza os resultados obtidos nos experimentos realizados para cada cepa de *L. infantum* isolada de cães naturalmente infectados, tratado e não tratados, com referência a seus perfis de susceptibilidade ou resistência à miltefosina, evidenciando a variabilidade dos perfis entre as cepas analisadas nos diferentes ensaios.

	Taxa de infectividade	Anastigotas/Mφ	IC ₅₀	Expressão gênica				Conclusão
				↓ LiMT	↓ LiROS3	↑ ABCG4	↑ AQP1	
				RESISTENTE				
Cão 01	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	
Cão 02	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	
Cão 03	↓	↓	↓	↑	↑	↑ (<i>in vitro</i>)*	↑	
Cão 04	↓	↓	↓	↑	↑	↑ (<i>in vitro</i>)*	-	
Cão 05	-	-	↑	↓	↓	↑	↑	
Cão 06	- / ↓	- / ↓	↓	↓	↓	↑	↑	
Cão 07	-	-	↑	↓	↓	↑	↑	

- Susceptível
- Resistente
- Variação do padrão entre cepas nos diferentes tempos e/ou na ausência ou presença de miltefosina nos ensaios *in vitro*.
- Cepas de cães que não foram tratados

Figura 25: Quadro resumo representativo dos perfis de susceptibilidade ou resistência à miltefosina para as cepas de *L. infantum* isoladas de cães naturalmente infectados e oriundos de duas regiões geográficas (SC e MG) observados nos ensaios de infectividade *in vitro*, IC₅₀ e nas taxas de transcrição dos distintos genes analisados.

7. DISCUSSÃO

A dispersão da LVC tem aumentado expressivamente no Brasil e no estado de Santa Catarina (SC) especialmente nos últimos anos (DIVE, 2018) a partir do estabelecimento de novas áreas endêmicas, como no município de Florianópolis. Os crescentes relatos de infecção em cães geralmente estão associados à expansão geográfica da doença, mas levam a recordes de notificações em vários municípios do estado. Apesar de somente 3,5% dos cães avaliados considerados soropositivos e autóctones para o município de Florianópolis (DIVE, 2018), esse dado apresenta-se de forma preocupante, considerando a pequena área da ilha e seu isolamento geográfico. Ainda que apresente uma taxa de prevalência inferior em comparação à outras localidades, a LVC figura como uma zoonose negligenciada também no município de Florianópolis e reveste-se de imensa importância sanitária na região. Estudos epidemiológicos explicam a relação direta entre a alta incidência de casos em humanos e a soroprevalência de cães, já que estes animais se apresentam mais susceptíveis à infecção pelo parasito (TEIXEIRA-NETO *et al.*, 2014). Assim, a proximidade física com humanos e o alto parasitismo cutâneo são considerados alguns dos principais fatores que explica o motivo desses animais serem considerados bons reservatórios e facilitadores da transmissão do parasito pelo flebótomo (COSTA *et al.*, 2018; MAIA; CAMPINO, 2018; DANTAS-TORRES, 2007). As estratégias para a prevenção e o controle da LVC incluem principalmente medidas preventivas como a vacinação, o diagnóstico precoce, a vacinação de cães soronegativos, adoção de medidas profiláticas (inseticidas tópicos e adoção de coleiras repelentes nos animais) e o tratamento (SEVÁ *et al.*, 2016). Entretanto, o tratamento dos cães ainda encontra barreiras para ser colocado em prática em função de seu custo, do esquema terapêutico e da ausência de comprovação de sua eficácia como uma possível medida de controle da doença (LEITE *et al.*, 2018). Por esses motivos, o tratamento de cães infectados não é considerado uma medida profilática de saúde pública, mas sim uma alternativa para os tutores que não desejam eutanasiar o animal.

No Brasil, o tratamento de cães comprovadamente infectados por *L. infantum*, apresentando ou não sinais clínicos compatíveis com a LVC, pode ser realizado com o uso de fármacos de uso veterinário registrados para esse fim no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Atualmente o fármaco autenticado e permitido pelo MAPA é a miltefosina (MilteforanTM) (VIRBAC BRASIL, 2018; MAPA, 2016). Alguns locais como a Índia (RIJAL *et al.*, 2013) e o Brasil (CARNIELLI *et al.*, 2014) fazem uso de anfotericina em situações em que foi observada a falha terapêutica com antimoniais da

leishmaniose visceral em humanos. Entretanto, relatos de ensaios clínicos (MACHADO; PENA, 2012) explicitam a variação da eficácia da miltefosina a depender da área geográfica e também da espécie de *Leishmania* que se aborda. Como exemplificação deste cenário, na Bolívia, são observadas 88% de taxa de cura com a miltefosina para *L. braziliensis* (SOTO *et al.*, 2008), enquanto na Guatemala a taxa de cura com a miltefosina foi de apenas 33% para as espécies coexistentes de *L. braziliensis* e *L. mexicana* (SOTO *et al.*, 2004).

Apesar de seu uso difundido, assim como outros fármacos, a miltefosina tem apresentado problemas em relação à resistência em cepas de *Leishmania* spp. (COELHO *et al.*, 2012). Eventos genéticos relacionados à resistência/susceptibilidade podem ocorrer de forma espontânea em populações de parasitos infectando mamíferos expostos a fármacos leishmanicidas ou sob condições experimentais em laboratório (VANAERSCHOT *et al.*, 2011; GUHA *et al.*, 2014; MONTE-NETO *et al.*, 2015). Assim, a resistência à miltefosina por *Leishmania* spp. pode ser explicada por eventos que variam desde a mudança dos níveis de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática do parasito, níveis de ergosterol reduzidos (RAKOTOMANGA *et al.*, 2005), ou até mesmo a redução da internalização do fármaco mediante mutação de transportadores de membrana como LiMT e LiROS3 (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006). Além disso, mecanismos como o aumento da transcrição de genes de transportadores ABC, vinculados aos genes *LiABCG4* e *LiABCG6*, são conhecidamente envolvidos na resistência a medicamentos em *Leishmania* spp., especialmente à miltefosina e antimoniais (Ouellete *et al.*, 1998; CASTANYS-MUNOZ *et al.*, 2008). Por fim, a alta taxa de transcrição do gene *AQP1* que, embora apresente mais relatos relacionados à susceptibilidade a antimoniais, já foi relacionada (KULSHRESTHA *et al.*, 2014) a eventos de resistência à miltefosina por *Leishmania* spp., uma vez que a proteína AQP1 atua como transportador de membrana semelhante à família ABC.

O presente estudo conta com a análise de sete isolados de *L. infantum* que ilustram diferentes condições de tratamento (ou não) *in vivo* dos cães, e posteriormente ensaios de susceptibilidade *in vitro*. Por se tratarem de duas localidades geográficas brasileiras distintas, não é surpresa que seja encontrado um perfil distinto em relação à susceptibilidade/resistência à miltefosina por parte das cepas de Minas Gerais em relação às cepas de Florianópolis, ainda que idealmente seriam necessárias mais cepas representativas de cada região para fortalecer essa hipótese. Apesar de um perfil de resistência sugerido pela análise dos perfis de expressão gênica relativa dos genes

abordados nesse trabalho, alguns estudos como de Nogueira e colaboradores (2019) demonstraram uma melhora clínica dos animais após o tratamento, com a ressalva de que os cães foram acompanhados por apenas três meses após o início do primeiro ciclo de tratamento com miltefosina. Porém, caso ocorra infecção por cepa resistente e o animal apresente melhora clínica, este cão não está isento de futuramente apresentar um mau prognóstico da doença (PETERSEN, 2009). Dessa forma, destaca-se a importância de estudos que realizem o monitoramento dos cães tratados por um período maior do que três meses e também a busca por marcadores de resistência que possam ser utilizados durante o acompanhamento dos animais em tratamento.

A determinação da infectividade *in vitro* das cepas de *L. infantum* foi realizada em três etapas, sendo a determinação da multiplicidade de infecção (MOI), a determinação da taxa de infecção e da taxa de amastigotas por macrófago, e o cálculo do índice de infecção. Para tanto, a multiplicidade de infecção obtida no trabalho (1:10) está de acordo com os dados dispostos na literatura, conforme Oualha e colaboradores (2019), Naqvi e colaboradores (2017) e Carlsen e colaboradores (2015). O dado é considerado padrão para a realização dos ensaios de infecção *in vitro* empregando macrófagos diferenciados a partir de células da linhagem THP-1.

Tendo em vista a confirmação experimental da MOI de 1:10, o trabalho seguiu em busca da avaliação do padrão de infectividade dos diferentes isolados de *L. infantum* incluídas no estudo. A infectividade variou entre as taxas de 56,3% até 75,5%, independente do tempo de tratamento com a miltefosina *in vivo*, mostrando-se de acordo com os dados abordados na literatura que constata taxas de infectividade variando desde 25% (GUIMARÃES *et al.*, 2005) até mais de 70% (QUINNELL *et al.*, 2001; FELIPE *et al.*, 2011; FRAGA *et al.*, 2012).

As cepas Cão 01 e Cão 02 provêm de animais tratados com miltefosina e que tiveram os parasitos isolados a partir de punção de medula óssea coletada antes do início do tratamento (T0) e 6 meses após o início do tratamento (T2). A cepa Cão 01 mostrou redução, de forma geral, da infectividade comparando-se, não somente à condição de tratamento *in vitro*, como também aos tempos T0 e T2. Ademais, a cepa Cão 02 mostrou também redução da infectividade dentro dos tempos T0 e T2 quando na presença de 1,9 µM de miltefosina *in vitro*, conotando provável cenário de susceptibilidade à miltefosina. Esses resultados são embasados, também, na redução da taxa de amastigotas por macrófago no T2 ($p < 0,05$), sugerindo provável ação de redução da carga parasitária pela miltefosina *in vivo* após os 6 meses do início do tratamento. Ciclos de tratamento com a

miltefosina podem selecionar populações resistentes, cuja resposta pode ser uma redução da taxa de infectividade conforme observado por Gonçalves e colaboradores (2021), dados que corroboram com o cenário encontrado para os isolados Cão 01 e Cão 02, ainda que tenham passado por apenas um ciclo de tratamento. Logo, pode-se supor que uma adição de miltefosina *in vitro* não foi capaz de desencadear um fenótipo de resistência nesses isolados. Porém, outros fatores como o IC₅₀ de cada isolado podem explicar a ausência de resposta à concentração e 1,9 µM, sendo uma possível explicação para a não observação de resposta à adição do fármaco *in vitro* em algumas cepas. Ademais, os animais *in vivo* apresentaram resultados distintos. O Cão 01 inicialmente apresentou melhora clínica, mas após os seis meses mostrou uma piora nos sintomas, não tendo apresentado resultado satisfatoriamente positivo. Enquanto isso, a cepa Cão 02 era inicialmente assintomática e permaneceu dessa forma pelo tempo de monitoramento. Ou seja, apesar de os resultados apresentarem resultados possivelmente relacionados ao perfil de susceptibilidade para as duas cepas, nota-se que a resposta *in vivo* nos animais pode ser distinta, sendo necessários mais estudos com essas cepas.

As cepas provenientes de Florianópolis e oriundas de cães infectados por *L. infantum* submetidos à necrópsia pelo CCZ/SMS/PMF (Cão 03 e Cão 04) ilustraram um esperado cenário de susceptibilidade (VERMEERSCH *et al.*, 2009) à miltefosina após a adição do fármaco *in vitro*. A diminuição da infectividade somada à diminuição da taxa de amastigotas por macrófago reforçam a hipótese de que isolados de cães não submetidos à pressão seletiva do tratamento com a miltefosina apresentam-se susceptíveis ao fármaco (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; DEEP *et al.*, 2017). Ademais, o perfil de susceptibilidade dessas cepas é também corroborado pelo estudo de Coelho e colaboradores (2014), onde observou-se que a ausência da exposição do parasito à miltefosina pode manter o perfil de susceptibilidade devido a características moleculares intrínsecas do parasito, ainda que seja plausível a existência de cepas naturalmente resistentes à miltefosina.

Enquanto isso, os isolados provenientes de cães de Florianópolis submetidos ao tratamento com miltefosina apresentaram resultados contrastantes à infectividade. Os isolados Cão 05 e Cão 07 não apresentaram alteração da infectividade, sugerindo um alto potencial infectivo independente do tratamento do animal e possível cenário de resistência à miltefosina. Entretanto, o isolado Cão 06 mostrou redução da infectividade ($p < 0,01$) em T1 na presença de miltefosina somado à diminuição ($p < 0,05$) da taxa de amastigotas por macrófago na ausência de miltefosina *in vitro* nos grupos T0 e T1, denotando caráter de susceptibilidade ao fármaco. Em contrapartida, os animais, quando

avaliados *in vivo*, apresentaram redução da carga parasitária de *L. infantum*, sugerindo que são necessários testes *in vitro* com concentrações de miltefosina mais fidedignas às situações aplicadas *in vivo*, inclusive considerando o IC₅₀ individual de cada cepa.

Portanto, os resultados de infectividade sugerem que isolados de cães tratados provenientes de Minas Gerais, e cepas de cães não tratados oriundos de Florianópolis apresentaram uma diminuição de infectividade de forma geral. Enquanto isso, a maior infectividade após os 31 dias de tratamento com a miltefosina caracteriza o cenário de resistência para os isolados de cães de Florianópolis, ainda que o isolado Cão 06 tenha apresentado tendência destoante dos demais. Estudos com *Mesocricetus auratus* evidenciam essa dificuldade de obtenção de um padrão relacionado à resistência com o tratamento *in vivo*, sendo necessários maiores estudos nesse âmbito (HENDRICKX *et al.*, 2015).

As taxas de infecção *in vitro* obtidas referentes às concentrações de miltefosina testadas permitiram determinar os valores individuais de IC₅₀. A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de 1,9 µM referente à miltefosina está de acordo com a literatura, uma vez que é esperado um valor mais baixo de IC₅₀ para formas amastigotas de *L. infantum* (0,9 a 4,3 µM) em relação a outras espécies como *L. major* (4,8 a 13,1 µM) e *L. donovani* (0,12 a 1,32 µM) (MARINHO *et al.*, 2011; VERMEERSCH *et al.*, 2009).

As taxas de IC₅₀ inerentes a cada isolado, por sua vez, são relacionadas a demais trabalhos que trazem valores de miltefosina em cepas susceptíveis apresentando IC₅₀ em torno de 0,42 µM, enquanto cepas resistentes apresentando um valor maior do que 40 µM de miltefosina (EBERHARDT *et al.*, 2018). Assim, acredita-se que a susceptibilidade observada para os isolados Cão 01, 02, 03 e 04 pode ser explicada a partir dos valores de IC₅₀ relativos a cada isolado serem inferiores à 1,9 µM de miltefosina, com exceção apenas para o isolado Cão 02. Esses dados são embasados no fato de que menores valores de IC₅₀ *in vitro* estão provavelmente relacionados a um tratamento mais bem-sucedido *in vivo* (Gonçalves *et al.*, 2021).

De outra forma, o perfil de resistência assumido para as cepas Cão 05 e Cão 07 pode ser ressaltado pelos altos valores de IC₅₀ obtidos, onde pode-se inferir que a adição de uma quantidade tão baixa de miltefosina (1,9 µM) não acarretaria diminuição das taxas de infectividade e de amastigotas por macrófago. Ademais, o aumento na IC₅₀ em T1 nessas cepas demonstra que, quando o parasito ainda estava no cão, já foi desencadeado um cenário de defesa à pressão seletiva da miltefosina. Ademais, a cepa Cão 06 apresentou redução do valor de IC₅₀ após os 31 dias de tratamento (T1) fato que, somado

à redução da infectividade e de amastigotas por macrófago em T1, corrobora com o cenário de susceptibilidade.

Ainda em relação à IC₅₀, sabe-se que nem sempre os valores testados *in vitro* traduzem os cenários encontrados no animal, uma vez que muitas vezes são adicionadas *in vivo* concentrações de miltefosina (e outros fármacos) com valores que equivaleriam a 65 µM. Portanto, seria importante avaliar valores mais altos como 30, 50 e 70 µM testados *in vitro* com a miltefosina afim de simular de forma mais verossímil a condição encontrada no cão, já que o valor de IC₅₀ também pode ser um importante indicador clínico quando utilizado de forma crítica. Ou seja, uma abordagem interessante é baseada na utilização dos valores de IC₅₀ para comparação com os reflexos clínicos do animal que esteja passando pelo tratamento com a miltefosina.

A resistência a fármacos data da década de 1930 (HUTCHINGS *et al.*, 2019), sendo esse um mecanismo considerado vital para a sobrevivência do microrganismo em resposta aos mais diversos fármacos, de forma que essa pressão seletiva favorece, portanto, as cepas resistentes (DAVIES; DAVIES, 2010). Assim, para a miltefosina o cenário não se mostra diferente, cujo fármaco apresenta extensivo e prolongado uso desde seu registro oficial em 2002 (Sundar *et al.*, 2002) na Índia para a LV, ainda que previamente fosse utilizado como antitumoral. Estudos retratam o mecanismo de resistência à miltefosina em espécies de *Leishmania* como a representação de um cenário de menor acúmulo intracelular da droga pela redução da captação, ou de um aumento do efluxo do fármaco (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006). Dessa forma, diversos marcadores moleculares estão associados com o fenômeno de resistência à miltefosina em *Leishmania* spp. Entre eles, destacam-se cinco importantes genes, de forma que o aumento da transcrição de *LiMT* e *LiRos3* são vinculados à susceptibilidade à miltefosina, enquanto o aumento de *LiABCG6*, *LiABCG4* e *AQP1* está associado à resistência.

LiMT e *LiRos3* estão correlacionados com o influxo de miltefosina e outros compostos como alquil-glicerofosfolípídeos em *Leishmania* spp. que necessitam do transportador de miltefosina (MT) para a translocação dos fosfolípidios do ambiente exoplasmático para o citoplasmático. Ademais, é retratado em *L. braziliensis* que a transcrição reduzida desse complexo conferiu fenótipo de resistência mediante a diminuição da absorção da miltefosina (OBONAGA *et al.*, 2014). Ainda assim, o influxo de miltefosina em *L. donovani* é também apontado (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006) como apresentando a proteína Ros3 como β-subunidade (COELHO *et al.*, 2012), de

forma que o complexo com MT-Ros3 determina a atividade da flipase e consequente sensibilidade à miltefosina (FRANSSEN *et al.*, 2020).

Os resultados das análises de RT-qPCR obtidos no presente estudo ilustram, para os genes *LiMT* e *LiRos3*, cenários de susceptibilidade a partir da alta transcrição nos isolados provenientes de cães tratados em Minas Gerais (Cão 01 e Cão 02), da mesma forma que as cepas de cães não tratados provenientes do município de Florianópolis (Cão 03 e Cão 04). O cenário de susceptibilidade sugerido pela expressão gênica relativa é corroborado pela infectividade, além da taxa de IC₅₀ para as quatro cepas conforme mencionado anteriormente. Ou seja, conclui-se que, considerando a alta transcrição dos genes de susceptibilidade *LiMT* e *LiRos3*, além da infectividade diminuída em T2 para as cepas Cão 01 e 02, e também na situação tratado *in vitro* para as cepas Cão 03 e 04, esses 4 isolados mostraram perfis competitivos com sensibilidade à miltefosina.

Enquanto isso, as cepas Cão 05 e Cão 07 apresentaram taxas baixas de transcrição de *LiMT* e *LiRos3*, inferindo um cenário de resistência à miltefosina já esperado para Cão 05 e Cão 07 devido à alta infectividade e à não diminuição dos amastigotas por macrófago observadas. A baixa taxa de transcrição desses dois genes nas três cepas pode ser explicada mediante a presença de uma deleção ou mutação (SHAW *et al.*, 2016) na fase de leitura desses genes.

Entretanto, para a cepa Cão 06, apesar da diminuição da infectividade, do menor número de amastigotas por macrófago e o IC₅₀ mais baixo em T1, os resultados obtidos a partir da quantificação da taxa de expressão gênica de *LiMT* e *LiRos3* manifestam um carácter de resistência em testes *in vitro* dentro de cada tempo avaliado (T0 e T1). Considerando que a taxa de infectividade, bem como o número de amastigotas por macrófagos são determinados pela contagem ao microscópio óptica, não pode ser descartada a explicação desse resultado contrastante em fatores biológicos intrínsecos aos parasitos dessa população em particular (COELHO *et al.*, 2014). Ou seja, a exposição *in vivo* à miltefosina mostra-se capaz de promover a seleção de parasitos menos sensíveis e, também, redução da transcrição de genes de susceptibilidade (OBONAGA *et al.*, 2013).

Ainda assim, baseado nos diferentes padrões de transcrição de marcadores moleculares de resistência, o estudo contou ainda com as análises de outros marcadores associados com a extrusão celular da miltefosina. Uma maior transcrição dos transportadores ABCG, membros da família de transportadores ABC, é uma das alterações presentes em espécies de *Leishmania* relacionadas à resistência à miltefosina, de forma que as proteínas atuam na diminuição dos níveis intracelulares do fármaco a

partir da translocação da miltefosina pela membrana (COELHO *et al.*, 2012). Assim, parasitos que possuem aumento da transcrição desses genes mostram um acúmulo reduzido de droga na região citoplasmática (BOSEDASGUPTA *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos por RT-qPCR mostram que os níveis de transcrição para o gene *LiABCG4* estão aumentados nos isolados de cães tratados residentes no município de Florianópolis (Cão 05, Cão 06 e Cão 07). Esses dados indicam que o marcador molecular *LiABCG4* pode estar diretamente relacionado ao fenótipo de resistência à miltefosina (Figura 23). Ou seja, sendo a relação entre transportadores ABC e resistência à miltefosina já relatada em *L. infantum* (CASTANYZ-MUNOZ *et al.*, 2008), a hipótese de resistência nas cepas tratadas *in vivo* em Florianópolis é suportada pelas baixas taxas de transcrição de *LiMT* e *LiRos3* e pela transcrição aumentada de *ABCG4*, corroborando com a maior taxa de infecção e de amastigotas por macrófago, e os valores aumentados de IC₅₀ em T2. Entretanto, apesar de *LiABCG6* ter mostrado padrão aumentado de transcrição na cepa Cão 07, esse gene não se mostrou um bom marcador, uma vez que não apresentou concordância com os demais resultados obtidos para as cepas Cão 05 e Cão 06.

Por fim, apesar de *AQP1* apresentar conhecida participação como regulador de resistência a antimoniais (MONTE-NETO *et al.*, 2015), a expressão da proteína transmembrana *AQP1* também foi relacionada com a resistência à miltefosina, sendo o aumento de sua expressão vinculado a uma diminuição dos níveis intracelulares a partir de uma menor absorção do fármaco (KULSHRESTHA *et al.*, 2014). Foi observado nos resultados desse estudo que os níveis de transcrição de *AQP1* estão aumentados apenas nas cepas provenientes de Florianópolis cujos cães passaram por tratamento *in vivo* com miltefosina, corroborando com os demais resultados obtidos para essas cepas. Entretanto, não foi observada relação de susceptibilidade nos isolados considerados sensíveis pelos parâmetros anteriores (isolados Cão 01, 02, 03 e 04), denotando não somente um possível evento mudança da fase de leitura do gene *AQP1* para alguns isolados de *L. infantum*, como também uma ineficiência deste marcador para a investigação da resposta à pressão de miltefosina em parasitos oriundos de cães diagnosticados com *Leishmania* spp. Além disso, a escassez de relatos científicos vinculando *AQP1* com a resposta à miltefosina pode ser explicada na dificuldade de observação de um padrão coerente em relação à resistência em *Leishmania* spp. e o padrão de transcrição desse gene.

Portanto, o presente trabalho destaca que cepas de *L. infantum* isoladas de cães naturalmente infectados podem apresentar fenótipos variáveis de resistência ou

susceptibilidade, sendo aparentemente relacionados à região geográfica de onde o animal provém, bem como às condições de tratamento *in vivo*, ou também à genética do parasito e regulação gênica, ainda que estudos (ESPADA *et al.*, 2021) não tenham encontrado relação entre a região geográfica e o perfil de susceptibilidade à miltefosina. Assim, conclui-se que os isolados Cão 01 e Cão 02 provenientes de Minas Gerais apresentam fenótipo de susceptibilidade para a miltefosina. Enquanto isso, cepas provenientes de cães naturalmente infectados por *L. infantum* em Florianópolis (Cão 03 e Cão 04) sem prévio contato com a miltefosina *in vivo* mostraram-se susceptíveis da mesma forma. Em contraponto, as demais cepas isoladas em Florianópolis (Cão 05, Cão 06 e Cão 07) apresentaram padrão de resistência à miltefosina. Assim, considerando que as cepas deste estudo são originárias de duas regiões geográficas com perfis de transmissão da LV bem distintos, podem vir a apresentar diferenças biológicas que se refletem na capacidade de infecção e resposta a fármacos. É preciso notar que as áreas endêmicas do estado de MG reportam a transmissão de LVC há mais tempo e com características provavelmente distintas com relação a reservatórios e vetores quando comparadas ao contexto da transmissão em Florianópolis, SC.

Além disso, o trabalho utilizou a caracterização da transcrição gênica relativa de genes associados com a resistência à miltefosina como forma de interpretação da resposta *in vivo* e *in vitro* de parasitos provenientes de cães submetidos (ou não) ao tratamento para a LVC. Portanto, esse trabalho abre perspectivas para análise de outros genes relacionados à resistência à miltefosina, bem como a análise dos resultados obtidos a nível de proteína (proteômica). Além disso, aumentar o número de cepas inseridas no estudo, complementando com cepas de outros estados, pode ser vantajoso para o melhor entendimento da possível relação da localização geográfica com o padrão de resposta às drogas leishmanicidas para busca de marcadores eficientes de resistência. A validação e comparação com aspectos clínicos dos cães submetidos à miltefosina *in vivo* também permitirá investigar a possível relação entre as taxas de transcrição de genes relacionados à resistência com aspectos de melhora clínica nos animais tratados.

8. CONCLUSÕES

- A infectividade *in vitro* de cepas de *L. infantum* isoladas de cães naturalmente infectados após 31 dias do tratamento com miltefosina no município de Florianópolis (SC) é maior ($p < 0,001$) para macrófagos em relação às cepas isoladas no estado de Minas Gerais;
- A infectividade *in vitro* de isolados de *L. infantum* oriundos de cães provenientes de Florianópolis naturalmente infectados e nunca tratados com miltefosina mostrou-se menor ($p < 0,001$) do que os isolados do parasito provenientes de animais tratados com a presença de miltefosina *in vitro*.
- A miltefosina foi capaz de reduzir a taxa de infecção *in vitro* em isolados susceptíveis de cães naturalmente infectados e o número de amastigotas por macrófago, mas não nos isolados resistentes;
- A concentração mínima inibitória (IC₅₀) obtida para cada isolado variou entre as concentrações 0,4 µM e 15,65 µM de miltefosina, de forma que maiores concentrações foram correlacionadas com o cenário de resistência à miltefosina;
- Há uma tendência de transcrição aumentada dos genes *LiMT* e *LiRos3* nos parasitos susceptíveis, enquanto uma maior transcrição de *LiABCG4* e *AQPI* foi observada nos isolados resistentes;
- A ferramenta molecular baseada na quantificação relativa da transcrição dos genes *LiMT*, *LiRos3*, *ABCG4* e *AQPI* por RT-qPCR mostrou-se promissora para a determinação de fenótipos de resistência ou susceptibilidade em isolados de *L. infantum* oriundos de cães naturalmente infectados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVERSA, Laís; TIBURCIO, Monique Gomes Salles; RICHINI-PEREIRA, Virgínia Bodelão; RAMIREZ, Luis Eduardo. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 281-289, mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>.

ASHFORD, By R. W. The leishmaniasis as model zoonoses. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, [S.L.], v. 91, n. 7, p. 693-702, 1 out. 1997. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00034989760428>.

BARD, Enzo. Molecular biology of *Leishmania*. **Biochemistry and Cell Biology**, [S.L.], v. 67, n. 9, p. 516-524, 1 set. 1989. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/o89-083>.

BHANDARI, Vasundhara; KULSHRESTHA, Arpita; DEEP, Deepak Kumar; STARK, Olivia; PRAJAPATI, Vijay Kumar; RAMESH, V.; SUNDAR, Shyam; SCHONIAN, Gabriele; DUJARDIN, Jean Claude; SALOTRA, Poonam. Drug Susceptibility in *Leishmania* Isolates Following Miltefosine Treatment in Cases of Visceral Leishmaniasis and Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 1-6, 22 maio 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001657>.

BOITÉ, Mariana C.; SPÄTH, Gerald F.; BUSSOTTI, Giovanni; PORROZZI, Renato; MORGADO, Fernanda N.; LLEWELLYN, Martin; SCHWABL, Philipp; CUPOLILLO, Elisa. Trans-Atlantic Spillover: deconstructing the ecological adaptation of *Leishmania infantum* in the americas. **Genes**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 4, 19 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes11010004>.

BORRELL, S; GAGNEUX, S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, [S.I.], v. 12, n. 13, p. 1456-1466, dez. 2009.

BOSEDASGUPTA, Somdeb; GANGULY, Agneyo; ROY, Amit; MUKHERJEE, Tanmoy; MAJUMDER, Hemanta K. A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S.L.], v. 158, n. 2, p. 176-188, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.12.007>.

BULTÉ, Dimitri; VAN BOCKSTAL, Lieselotte; DIRKX, Laura; KERKHOF, Magali van Den; TREZ, Carl de; TIMMERMANS, Jean-Pierre; HENDRICKX, Sarah; MAES, Louis; CALJON, Guy. Miltefosine enhances infectivity of a miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strain by attenuating its innate immune recognition. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 1-27, 22 jul. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009622>.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10151, p. 951-970, set. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31204-2).

CAMPOS, Roseane; SANTOS, Márcio; TUNON, Gabriel; CUNHA, Luana; MAGALHÃES, Lucas; MORAES, Juliana; RAMALHO, Danielle; LIMA, Sanmy; PACHECO, José Antônio; LIPSCOMB, Michael. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-7, 11 maio 2017. PAGEPress Publications. <http://dx.doi.org/10.4081/gh.2017.503>.

CARLSEN, Eric D.; JIE, Zuliang; LIANG, Yuejin; HENARD, Calvin A.; HAY, Christie; SUN, Jiaren; GUEDES, Herbert de Matos; SOONG, Lynn. Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance. **Journal of Innate Immunity**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 354-363, 2015. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000373923>.

CARNIELLI, Juliana B.T.; ANDRADE, Héliida M. de; PIRES, Simone F.; CHAPEAUROUGE, Alexander D.; PERALES, Jonas; MONTI-ROCHA, Renata; CARVALHO, Sílvio F.G.; RIBEIRO, Leonardo P.; DIETZE, Reynaldo; FIGUEIREDO, Suely G. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. **Journal of Proteomics**, [S.L.], v. 108, p. 198-208, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.010>.

CARNIELLI, Juliana B.T.; CROUCH, Kathryn; FORRESTER, Sarah; SILVA, Vladimir Costa; CARVALHO, Sílvio F.G.; DAMASCENO, Jeziel D.; BROWN, Elaine; DICKENS, Nicholas J.; COSTA, Dorcas L.; COSTA, Carlos H.N. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 36, p. 83-91, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.029>.

CARNIELLI, Juliana B. T.; MONTI-ROCHA, Renata; COSTA, Dorcas Lamounier; SESANA, Aretha Molina; PANSINI, Laura N. N.; SEGATTO, Marcela; MOTTRAM, Jeremy C.; COSTA, Carlos Henrique Nery; CARVALHO, Sílvio F. G.; DIETZE, Reynaldo. Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 789-794, 2 out. 2019. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.18-0949>.

CASTANYS-MUÑOZ, Esther; ALDER-BAERENS, Nele; POMORSKI, Thomas; GAMARRO, Francisco; CASTANYS, Santiago. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 64, n. 5, p. 1141-1153, 30 maio 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05653.x>.

CASTANYS-MUÑOZ, Esther; PÉREZ-VICTORIA, José María; GAMARRO, Francisco; CASTANYS, Santiago. Characterization of an ABCG-Like Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* with a Role in Drug Resistance and Transbilayer Lipid Movement. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 10, p. 3573-3579, out. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00587-08>.

CHANG, K.-P. *Leishmania donovani*: promastigote-macrophage surface interactions in vitro. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 48, n. 2, p. 175-189, out. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(79\)90097-3](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(79)90097-3).

CHAPPUIS, François; SUNDAR, Shyam; HAILU, Asrat; GHALIB, Hashim; RIJAL, Suman; PEELING, Rosanna W.; ALVAR, Jorge; BOELAERT, Marleen. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. 11, p. 873-882, nov. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1748>.

CHRUSCIAK-TALHARI, Anette; DIETZE, Reynaldo; TALHARI, Sinésio; TALHARI, Carolina Chrusciak; SILVA, Roberto Moreira da; YAMASHITA, Ellen Priscila Gadelha; PENNA, Gerson de Oliveira; MACHADO, Paulo Roberto Lima. 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**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 255-260, 4 fev. 2011. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0155>.

COELHO, Adriano C.; BOISVERT, Sébastien; MUKHERJEE, Angana; LEPROHON, Philippe; CORBEIL, Jacques; OUELLETTE, Marc. Multiple Mutations in Heterogeneous Miltefosine-Resistant *Leishmania major* Population as Determined by Whole Genome Sequencing. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 1-

11, 14 fev. 2012. Public Library of Science (PLOS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001512>.

COELHO, Adriano C.; TRINCONI, Cristiana T.; COSTA, Carlos H. N.; ULIANA, Silvia R. B. In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 1-11, 17 jul. 2014. Public Library of Science (PLOS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002999>.

COSTA, Danielle Nunes Carneiro Castro; BERMUDI, Patricia Marques Moralejo Bermudi; RODAS, Lilian Aparecida Colebrusco; NUNES, Caris Maroni; HIRAMOTO, Roberto Mitsuyoshi; TOLEZANO, José Eduardo; CIPRIANO, Rafael Silva; CARDOSO, Graziela Cândido Diniz; CODEÇO, Cláudia Torres; CHIARAVALLOTI-NETO, Francisco. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 52, p. 92-103, 14 nov. 2018. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). <http://dx.doi.org/10.11606/s1518-8787.2018052000381>.

CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 111-126, jan. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.19.1.111-126.2006>.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 1478-1483, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x>.

DAGA, Mradul K; ROHATGI, Ishan; MISHRA, Rashmi. Leishmaniasis. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 166-170, 2021. Jaypee Brothers Medical Publishing. <http://dx.doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23844>.

DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia)*

braziliensis. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 149, n. 3-4, p. 139-146, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>.

DAVIES, Julian; DAVIES, Dorothy. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 417-433, set. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.00016-10>.

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 417-423, set. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0738-081x\(96\)00057-0](http://dx.doi.org/10.1016/0738-081x(96)00057-0).

DIVE/SC. Leishmaniose Visceral Canina: informações para a população. Florianópolis: Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2020. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br/index.php/d-a/item/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 13 set. 2021.

DÓREA, Regina Coeli Cunha; BARBOZA-FILHO, Carlos Gomes; MOREIRA, Dayson Friaça; GUIRRO, Mirian; CHAVES, Ágtha de Alencar Muniz; DUNDER, Ricardo José; SOARES, Elaine Amorim; SANTOS-JÖNIOR, Vítório; SPINOSA, Wilma. Behavior of *Leishmania major* metacyclic promastigotes during the course of infection and immune response development in resistant versus susceptible hosts. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 34, p. 17-20, nov. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822003000500006>.

DOSTÁLOVÁ, Anna; VOLF, Petr. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-12, dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>.

EBERHARDT, Eline; BULTÉ, Dimitri; VAN BOCKSTAL, Lieselotte; KERKHOF, Magali van Den; COS, Paul; DELPUTTE, Peter; HENDRICKX, Sarah; MAES, Louis;

CALJON, Guy. Miltefosine enhances the fitness of a non-virulent drug-resistant *Leishmania infantum* strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 395-406, 8 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dky450>.

ESPADA, Caroline Ricce; LEVATTI, Erica V. de Castro; BOITÉ, Mariana Côrtes; LAMOUNIER, Dorcas; ALVAR, Jorge; CUPOLILLO, Elisa; COSTA, Carlos Henrique Nery; RODE, Joelle; ULIANA, Silvia R. B. In Vitro Susceptibility to Miltefosine of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) Isolates from Different Geographical Areas in Brazil. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1228, 5 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9061228>.

EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I. D. A. Barros; VASCONCELOS, A. W.; SOUSA, A. de Queiroz; LIMA, J. W. de Oliveira; PEARSON, R. D. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 166, n. 5, p. 1124-1132, 1 nov. 1992. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/166.5.1124>.

FADILI, Karima El; MESSIER, Nadine; LEPROHON, Philippe; ROY, Gaétan; GUIMOND, Chantal; TRUDEL, Nathalie; SARAVIA, Nancy G.; PAPADOPOULOU, Barbara; LÉGARÉ, Danielle; OUELLETTE, Marc. Role of the ABC Transporter MRPA (PGPA) in Antimony Resistance in *Leishmania infantum* Axenic and Intracellular Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 49, n. 5, p. 1988-1993, maio 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.49.5.1988-1993.2005>.

FELIPE, Ilana Mirian Almeida; AQUINO, Dorlene Maria Cardoso de; KUPPINGER, Oliver; SANTOS, Max Diego Cruz; RANGEL, Maurício Eduardo Salgado; BARBOSA, David Soeiro; BARRAL, Aldina; WERNECK, Guilherme Loureiro; CALDAS, Arlene de Jesus Mendes. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,

[S.L.], v. 106, n. 2, p. 207-211, mar. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000200015>.

FERNÁNDEZ, Olga Lucía; DIAZ-TORO, Yira; OVALLE, Clemencia; VALDERRAMA, Liliana; MUVDI, Sandra; RODRÍGUEZ, Isabel; GOMEZ, María Adelaida; SARAIVA, Nancy Gore. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 1-11, 22 maio 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002871>.

FERREIRA, Bianca Alves; COELHO, Adriano Cappellazzo; COTRIM, Paulo César; KANASHIRO, Edite Hatsumi Yamashiro; ROCHA, Mussya Cisotto. Miltefosine susceptibility of isolates of *Leishmania (Leishmania) infantum* from dogs of the municipality of Embu-Guaçu, Brazil. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da Unicamp**, [S.L.], n. 26, p. 1-1, 11 dez. 2018. Universidade Estadual de Campinas. <http://dx.doi.org/10.20396/revpibic262018209>.

FONSECA JÚNIOR, José Duarte da; MAZZINGHY, Cristiane Lopes; FRANÇA, Erycka Carolina; PINOW, Ana Clara Silva; ALMEIDA, Katyane de Sousa. Leishmaniose visceral canina: revisão. **Pubvet**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 1-8, mar. 2021. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v15n03a779.1-8>.

FRAGA, Deborah B.M.; SOLCÀ, Manuela S.; SILVA, Virgínia M.G.; BORJA, Lairton S.; NASCIMENTO, Eliane G.; OLIVEIRA, Geraldo G.s.; PONTES-DE-CARVALHO, Lain C.; VERAS, Patrícia S.T.; DOS-SANTOS, Washington L.C. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 190, n. 3-4, p. 591-594, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.025>.

FRANSSEN, Susanne u; DURRANT, Caroline; STARK, Olivia; MOSER, Bettina; DOWNING, Tim; IMAMURA, Hideo; DUJARDIN, Jean-Claude; SANDERS, Mandy J; MAURICIO, Isabel; A MILES, Michael. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. **elife**, [S.L.], v. 9, p. 1-44, 25 mar. 2020. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.51243>.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul. Pentavalent Antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 30 jun. 2009. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14072317>.

GARCIA L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **J Clin Microbiol** 2004; 42(5): 2294 – 2297.

GONÇALVES, Ana Alice Maia; LEITE, Jaqueline Costa; RESENDE, Lucilene Aparecida; MARIANO, Reysla Maria da Silveira; SILVEIRA, Patricia; MELO-JÏNIOR, Otoni Alves de Oliveira; RIBEIRO, Helen Silva; OLIVEIRA, Diana Souza de; SOARES, Diogo Fonseca; SANTOS, Thaiza Aline Pereira. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: what has been tested on dogs and a new perspective on improving treatment efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S.L.], v. 9, p. 1-11, 18 dez. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00427>.

GONÇALVES, Gustavo; CAMPOS, Monique Paiva; GONÇALVES, Alessandra Silva; MEDEIROS, Lia Carolina Soares; FIGUEIREDO, Fabiano Borges. Treatment of canine visceral leishmaniasis with Milteforan™ induces *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B. 8 abr. 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.04.08.438938>.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-790x2004000300011>.

GUHA, Rajan; DAS, Shantanabha; GHOSH, June; SUNDAR, Shyam; DUJARDIN, Jean Claude; ROY, Syamal. Antimony Resistant *Leishmania donovani* but Not Sensitive Ones Drives Greater Frequency of Potent T-Regulatory Cells upon Interaction with Human PBMCs: role of il-10 and tgf- β in early immune response. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 1-11, 17 jul. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002995>.

GUIMARÃES, K.s.; BATISTA, Z.s.; DIAS, E.L; GUERRA, R.M.s.N.C.; COSTA, A.D.C.; OLIVEIRA, A.s.; CALABRESE, K.s.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.s.F.; VALE, T. Zaverucha do. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 131, n. 3-4, p. 305-309, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.008>

HENDRICKX, S.; MONDELAERS, A.; EBERHARDT, E.; DELPUTTE, P.; COS, P.; MAES, L. In Vivo Selection of Paromomycin and Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani* and *L. infantum* in a Syrian Hamster Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 59, n. 8, p. 4714-4718, 26 maio 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00707-15>.

HOCKMEYER, W.T.; KAGER, P.A.; REES, P.H.; HENDRICKS, L.D. The culture of *Leishmania donovani* in Schneider's insect medium: its value in the diagnosis and management of patients with visceral leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 75, n. 6, p. 861-863, jan. 1981. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90433-8](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(81)90433-8).

HUTCHINGS, Matthew I; TRUMAN, Andrew W; WILKINSON, Barrie. Antibiotics:

past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, [S.L.], v. 51, p. 72-80, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host:pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 604-615, 11 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>.

KHALILI, Ghader; DOBAKHTI, Faramarz; NIKNAM, Hamid Mahmoudzadeh; KHAZE, Vahid; PARTOVI, Fatemeh. Immunotherapy with Imiquimod Increases the Efficacy of Glucantime Therapy of *Leishmania major* Infection. **Iranian Journal of Immunology**, [S.I.], v. 1, n. 8, p. 45-51, mar. 2011.

KHANRA, Supriya; SARRAF, Nibedeeta R.; DAS, Anjan K.; ROY, Syamal; MANNA, Madhumita. Miltefosine Resistant Field Isolate From Indian Kala-Azar Patient Shows Similar Phenotype in Experimental Infection. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-12, 4 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09720-1>.

KULSHRESTHA, Arpita; SHARMA, Vanila; SINGH, Ruchi; SALOTRA, Poonam. Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 113, n. 3, p. 1171-1184, 22 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3755-6>.

KUMAR, Rajiv; ENGWERDA, Christian. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 1-6, 14 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/cti.2014.4>.

LEISHMAN, W. B. Note on the Nature of the Parasitic Bodies found in Tropical Splenomegaly. **BMJ**, [S.L.], v. 1, n. 2249, p. 303-303, 6 fev. 1904. **BMJ**. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.1.2249.303>.

LEAL, G.G.A. *et al.* Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from na area of visceral leishmaniasis reemergence. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 150. p. 1-7. 2017.

LEITE, Bruna Martins Macedo; SOLCÀ, Manuela da Silva; SANTOS, Liliane Celestino Sales; COELHO, Livia Brito; AMORIM, Leila Denise Alves Ferreira; DONATO, Lucas Edel; PASSOS, Sandra Maria de Souza; ALMEIDA, Adriana Oliveira de; VERAS, Patrícia Sampaio Tavares; FRAGA, Deborah Bittencourt Mothé. The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: a field effectiveness study in a highly endemic area. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1-9, 14 maio 2018. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006496>.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J.-C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.-P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 21 maio 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0703678104>.

MACHADO, Paulo R.; AMPUERO, Julia; GUIMARÃES, Luiz H.; VILLASBOAS, Leonardo; ROCHA, Ana T.; SCHRIEFER, Albert; SOUSA, Rosana S.; TALHARI, Anette; PENNA, Gerson; CARVALHO, Edgar M. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and

controlled trial. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 4, n. 12, p. 1-6, 21 dez. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000912>.

MACHADO, Patrícia A.; HILÁRIO, Flaviane F.; CARVALHO, Lidiane O.; SILVEIRA, Mariana L. T.; ALVES, Rosemeire B.; FREITAS, Rossimiriam P.; COIMBRA, Elaine S. Effect of 3-Alkylpyridine Marine Alkaloid Analogues in *Leishmania* Species Related to American Cutaneous Leishmaniasis. **Chemical Biology & Drug Design**, [S.L.], v. 80, n. 5, p. 745-751, 10 set. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12017>

MAIA, Carla; NUNES, Mónica; MARQUES, Mónica; HENRIQUES, Sofia; ROLÃO, Nuno; CAMPINO, Lenea. *In vitro* drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 135, n. 1, p. 36-41, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.015>.

MAIA, Carla; CAMPINO, Lenea. Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S.L.], v. 8, p. 1-12, 6 set. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2018.00302>.

MANNA, Laura; VITALE, Fabrizio; REALE, Stefano; PICILLO, Esther; NEGLIA, Gianluca; VESCIO, Francesco; GRAVINO, Angelo Elio. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, [S.L.], v. 182, n. 3, p. 441-445, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.08.009>.

MANS, Dennis Ra; KENT, Alida D; HU, Ricardo Vpf; SCHALLIG, Henk Dfh. Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasis on Busi Yasi in Suriname. **Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research**, [S.L.], v. 08, n. 02, p. 1-16, 2017. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9554.1000388>.

MARINHO, Fernanda de Aquino; GONÇALVES Keyla Cristiny da Silva; OLIVEIRA, Selma Soares de; OLIVEIRA, Ana-Carolina de Siqueira Couto de Oliveira; BELLIO Maria; D'AVILA-LEVY Claudia Masini; SANTOS André Luis Souza dos; BRANQUINHA, Marta Helena. Miltefosine induces programmed cell death in

Leishmania amazonensis promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 106(4): 507-509, June 2011.

MARQUIS, Nathalie; GOURBAL, Benjamin; ROSEN, Barry P.; MUKHOPADHYAY, Rita; OUELLETTE, Marc. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 1690-1699, 19 ago. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04782.x>.

MICHELIN, A.F., *et al.* Factors associated with positivity for canine visceral leishmaniasis in an endemic area in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. Elsevier. v. 12, p. 13-16. 2018.

MISHRA, Jyotsna; MADHUBALA, Rentala; SINGH, Sarman. Visceral and post-Kala-Azar dermal leishmaniasis isolates show significant difference in their *in vitro* drug susceptibility pattern. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 112, n. 3, p. 1001-1009, 18 dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3222-1>.

MOHEBALI, M.; FOTOUHI, A.; HOOSHMAND, B.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; RAHNEMA, A.; RAZAGHIAN, A.R.; KABIR, M.J.; NADIM, A. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 103, n. 1, p. 33-40, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.005>.

MOHAPATRA, Sarita. Drug resistance in leishmaniasis: newer developments. **Tropical Parasitology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 4, 2014. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2229-5070.129142>.

MONDELAERS, Annelies; SANCHEZ-CAÑETE, Maria P.; HENDRICKX, Sarah; EBERHARDT, Eline; GARCIA-HERNANDEZ, Raquel; LACHAUD, Laurence; COTTON, James; SANDERS, Mandy; CUYPERS, Bart; IMAMURA, Hideo. 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**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1-15, 28 abr. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154101>.

MONTE-NETO, Rubens; LAFFITTE, Marie-Claude N.; LEPROHON, Philippe; REIS, Priscila; FRÉZARD, Frédéric; OUELLETTE, Marc. Intrachromosomal Amplification, Locus Deletion and Point Mutation in the Aquaglyceroporin AQP1 Gene in Antimony Resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1-24, 13 fev. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003476>.

MONTEIRO, Fabrício Moreira; MACHADO, Amanda Sanchez; ROCHA-SILVA, Fabiana; ASSUNÇÃO, Cláudia Barbosa; GRACIELE-MELO, Cidiane; COSTA, Lourena Emanuele; PORTELA, Aquila Serbate; COELHO, Eduardo Antonio Ferraz; FIGUEIREDO, Sônia Maria de; CALIGIORNE, Rachel Basques. Canine visceral leishmaniasis: detection of *Leishmania* spp. genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-pcr). **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 126, p. 263-268, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.036>.

MORADI-ASL, E; MOHEBALI, M; RASSI, Y. Geographic distribution and spatial analysis of *Leishmania infantum* infection in domestic and wild animal reservoir hosts of zoonotic visceral leishmaniasis in Iran: a systematic review. **Journal of Vector Borne Diseases**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 173, 2018. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0972-9062.249125>.

MURTA, Silvano M.F; GAZZINELLI, Ricardo T; BRENER, Zigman; ROMANHA, Alvaro J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S.L.], v. 93, n. 2, p. 203-214, jun. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851\(98\)00037-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-6851(98)00037-1).

NAQVI, Nilofer; AHUJA, Kavita; SELVAPANDIYAN, Angamuthu; DEY, Ranadhir; NAKHASI, Hira; PURI, Niti. Role of Mast Cells in clearance of *Leishmania* through extracellular trap formation. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-16, 16 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12753-1>.

NEIDERUD, Carl-Johan. How urbanization affects the epidemiology of emerging infectious diseases. **Infection Ecology & Epidemiology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 27060, jan. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v5.27060>.

NOGUEIRA, Fabio dos Santos; AVINO, Valdir Carlos; GALVIS-OVALLOS, Fredy; PEREIRA-CHIOCCOLA, Vera Lucia; MOREIRA, Marcio Antonio Batistella; ROMARIZ, Ana Paula Peres Lopes; MOLLA, Leticia M.; MENZ, Ingrid. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-11, 8 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3323-0>.

NOGUEIRA, Ranielly Araujo; LIRA, Maria Gabriela Sampaio; SANTOS, Sarah Ingrid Pinto; MONDÊGO-OLIVEIRA, Renata; ANDRADE, Fábio Henrique Evangelista de; SOUSA, Eduardo Martins de; BARBOSA, David Soeiro; ABREU-SILVA, Ana Lucia; CARVALHO, Rafael Cardoso. Intense transmission of visceral leishmaniasis in a region of northeastern Brazil: a situation analysis after the discontinuance of a zoonosis control program. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 1-9, 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612021015>.

O BONAGA, Ricardo; FERNÁNDEZ, Olga Lucía; VALDERRAMA, Liliana; RUBIANO, Luisa Consuelo; CASTRO, Maria del Mar; BARRERA, Maria Claudia; GOMEZ, Maria Adelaida; SARA VIA, Nancy Gore. Treatment Failure and Miltefosine Susceptibility in Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* Subgenus *Viannia* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 144-152, 21 out. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01023-13>.

OSTYN, Bart; HASKER, Epcó; DORLO, Thomas P. C.; RIJAL, Suman; SUNDAR, Shyam; DUJARDIN, Jean-Claude; BOELAERT, Marleen. Failure of Miltefosine Treatment for Visceral Leishmaniasis in Children and Men in South-East Asia. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1-8, 18 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100220>.

OUALHA, Rafeh; BARHOUMI, Mourad; MARZOUKI, Soumaya; HARIGUA-SOUAI, Emna; AHMED, Melika Ben; GUIZANI, Ikram. Infection of Human Neutrophils With *Leishmania infantum* or *Leishmania major* Strains Triggers Activation and Differential Cytokines Release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S.L.], v. 9, p. 1-16, 10 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00153>.

OUELLETTE, Marc; LÉGARÉ, Danielle; HAIMEUR, Anass; GRONDIN, Katherine; ROY, Gaétan; BROCHU, Christian; PAPADOPOULOU, Barbara. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. **Drug Resistance Updates**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 43-48, mar. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1368-7646\(98\)80213-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1368-7646(98)80213-6).

OUELLETTE, M; DRUMMELSMITH, J; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, [S.L.], v. 7, n. 4-5, p. 257-266, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2004.07.002>.

PAIZ, Laís Moraes; MOTOIE, Gabriela; RICHINI-PEREIRA, Virgínia Bodelão; LANGONI, Helio; MENOZZI, Benedito Donizete; TOLEZANO, José Eduardo; DONALISIO, Maria Rita. Antibodies and Molecular Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* in Samples of Free-Ranging Marmosets (Primates: callitrichidae). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 249-254, abr. 2019. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2018.2348>.

PALTRINIERI, Saverio; GRADONI, Luigi; ROURA, Xavier; ZATELLI, Andrea; ZINI, Eric. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 552-578, 2 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12413>.

PEREZVICTORIA, F; SANCHEZCANETE, M; SEIFERT, K; CROFT, S; SUNDAR, S; CASTANYS, S; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. **Drug Resistance Updates**, [S.L.], v. 9, n. 1-2, p. 26-39, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2006.04.001>.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D.. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, [S.L.], v. 321, n. 5891, p. 970-974, 15 ago. 2008. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1159194>.

PETERSEN, Christine A. Leishmaniasis, an Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States. **Topics in Companion Animal Medicine**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 182-188, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2009.06.006>.

PONTE-SUCRE, Alicia; GAMARRO, Francisco; DUJARDIN, Jean-Claude; BARRETT, Michael P.; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio; GARCÍA-HERNÁNDEZ, Raquel; POUNTAIN, Andrew W.; MWENECHANYA, Roy; PAPADOPOULOU, Barbara. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge. **PLoS**

Neglected Tropical Diseases, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1-24, 14 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.-A.; DYE, C.. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, [S.L.], v. 122, n. 03, p. 1-8, mar. 2001. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182001007363>.

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 49, n. 7, p. 2677-2686, jul. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.49.7.2677-2686.2005>.

RATH, Susanne; TRIVELIN, Luciano Augusto; IMBRUNITO, Talitha Rebecca; TOMAZELA, Daniela Maria; JESÖS, Marcelo Nunes de; MARZAL, Percy Calvo; ANDRADE JUNIOR, Heitor Franco de; TEMPONE, André Gustavo. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 550-555, ago. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000400018>

REIS, Alexandre B.; TEIXEIRA-CARVALHO, Andréa; VALE, André M.; MARQUES, Marcos J.; GIUNCHETTI, Rodolfo C.; MAYRINK, Wilson; GUERRA, Luanda Liboreiro; ANDRADE, Renata A.; CORRÊA-OLIVEIRA, Rodrigo; MARTINS-FILHO, Olindo A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S.L.], v. 112, n. 3-4, p. 102-116, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.02.001>.

RESENDE, Lucilene Aparecida; AGUIAR-SOARES, Rodrigo Dian de Oliveira; MOREIRA, Nádia das Dores; FERREIRA, Sidney de Almeida; LANNA, Mariana Ferreira; CARDOSO, Jamille Mirelle de Oliveira; MATHIAS, Fernando Augusto

Siqueira; COURA-VITAL, Wendel; MARIANO, Reysla Maria da Silveira; LEITE, Jaqueline Costa. *In vitro* Infectivity of Strains Isolated From Dogs Naturally Infected With *Leishmania infantum* Present a Distinct Pathogenic Profile in Hamsters. **Frontiers in Medicine**, [S.L.], v. 7, p. 1-11, 28 ago. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2020.00496>.

RIBEIRO, Raul Rio; MICHALICK, Marilene Suzan Marques; SILVA, Manoel Eduardo da; SANTOS, Cristiano Cheim Peixoto dos; FRÉZARD, Frédéric Jean Georges; SILVA, Sydney Magno da. Canine Leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2018, p. 1-12, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/3296893>.

RIJAL, Suman; OSTYN, Bart; URANW, Surendra; RAI, Keshav; BHATTARAI, Narayan Raj; DORLO, Thomas P. C.; BEIJNEN, Jos H.; VANAERSCHOT, Manu; DECUYPERE, Saskia; DHAKAL, Subodh S. Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 56, n. 11, p. 1530-1538, 20 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit102>.

RUGANI, Jeronimo Nunes; GONTIJO, Célia Maria Ferreira; FRÉZARD, Frédéric; SOARES, Rodrigo Pedro; MONTE-NETO, Rubens Lima do. Antimony resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 114, p. 1-9, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760190111>.

RUGANI, Jeronimo N.; QUARESMA, Patrícia F.; GONTIJO, Célia F.; SOARES, Rodrigo P.; MONTE-NETO, Rubens L. Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: antimony resistance in human isolates

from atypical lesions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 108, p. 1170-1180, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.149>.

SCHWABL, Philipp; BOITÉ, Mariana C.; BUSSOTTI, Giovanni; JACOBS, Arne; ANDERSSON, Bjorn; MOREIRA, Otacilio; FREITAS-MESQUITA, Anita L.; MEYER-FERNANDES, Jose Roberto; TELLERIA, Erich L.; TRAUB-CSEKÖ, Yara. Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas. **Communications Biology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-13, 29 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-021-01658-5>.

SEVÁ, Anaiá P.; OVALLOS, Fredy G.; AMAKU, Marcus; CARRILLO, Eugenia; MORENO, Javier; GALATI, Eunice A. B.; LOPES, Estela G.; SOARES, Rodrigo M.; FERREIRA, Fernando. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 1-20, 29 jul. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160058>.

SHAKYA, Nishi; SANE, Shraddha A.; VISHWAKARMA, Preeti; GUPTA, Suman. Enhancement in therapeutic efficacy of miltefosine in combination with synthetic bacterial lipopeptide, Pam3Cys against experimental Visceral Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 131, n. 3, p. 377-382, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.05.007>.

SHAW, C. D.; LONCHAMP, J.; DOWNING, T.; IMAMURA, H.; FREEMAN, T. M.; COTTON, J. A.; SANDERS, M.; BLACKBURN, G.; DUJARDIN, J. C.; RIJAL, S.. In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: genomic and metabolomic characterization. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 99, n. 6, p. 1134-1148, 9 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13291>.

SINGH, Bhawana; SUNDAR, Shyam. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, [S.L.], v. 30, n. 26, p. 3834-3842, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.068>.

SMS/SC. Alerta Epidemiológico: Leishmaniose Visceral Humana. Secretaria Municipal de Saúde, 2017. Disponível em: <http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/14_12_2017_14.52.54.2be8663cb5c0d895f08fe96e401a304e.pdf>. Acesso em: 13 set. 2021.

SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J. C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J. D. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 38, n. 9, p. 1266-1272, 1 maio 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/383321>.

SOTO, Jaime; REA, Jaime; BALDERRAMA, Margarita; TOLEDO, Julia; SOTO, Paula; VALDA, Luis; BERMAN, Jonathan D. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.I.], v. 2, n. 78, p. 210-211, fev. 2008.

SRIVASTAVA, Saumya; MISHRA, Jyotsna; GUPTA, Anil Kumar; SINGH, Amit; SHANKAR, Prem; SINGH, Sarman. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-11, 31 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-1969-z>.

STEINDEL, Mário; MENIN, Álvaro; EVANGELISTA, Tatiane; STOCO, Patrícia H.; MARLOW, Mariel A.; FLEITH, Renata C.; PILATI, Celso; GRISARD, Edmundo C. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 490-496, abr. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2013000400013>.

SUNDAR, Shyam; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, Juergen; SINDERMANN, Herbert; FISCHER, Christina; JUNGE, Klaus; BRYCESON, Anthony; BERMAN, Jonathan. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, [S.L.], v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 28 nov. 2002. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa021556>.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, [S.L.], v. 145, n. 4, p. 497-507, 15 dez. 2016. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s003118201600216x>.

TRAVI, Bruno L.; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; DANTAS-TORRES, Filipe; MIRÓ, Guadalupe. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-13, 11 jan. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>.

TRAVI, Bruno L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomedica**. [S.L.], v. 4, n.1, p. 1-10, 2014. <https://doi.org/10.1590/s0120-41572014000100002>.

ULIANA, Silvia R. B.; TRINCONI, Cristiana T.; COELHO, Adriano C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, [S.L.], v. 145, n. 4, p. 464-480, 20 jan. 2017. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182016002523>.

VAN BOCKSTAL, Lieselotte; SÁDLOVÁ, Jovana; SUAUI, Hamide Aslan; HENDRICKX, Sarah; MENESES, Claudio; KAMHAWI, Shaden; VOLF, Petr; MAES, Louis; CALJON, Guy. Impaired development of a miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strain in the sand fly vectors *Phlebotomus perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 11, p. 1-7, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.09.003>.

VANAERSCHOT, Manu; MAES, Ilse; OUKAD, Meriem; ADAUI, Vanessa; MAES, Louis; DONCKER, Simonne de; RIJAL, Suman; CHAPPUIS, François; DUJARDIN, Jean-Claude; DECUYPERE, Saskia. Linking *In Vitro* and *In Vivo* Survival of Clinical *Leishmania donovani* Strains. **Plos One**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1-9, 17 ago. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012211>.

VANAERSCHOT, Manu; DONCKER, Simonne de; RIJAL, Suman; MAES, Louis; DUJARDIN, Jean-Claude; DECUYPERE, Saskia. Antimonial Resistance in *Leishmania donovani* Is Associated with Increased *In Vivo* Parasite Burden. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 1-5, 1 ago. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023120>.

VANAERSCHOT, Manu; DECUYPERE, Saskia; BERG, Maya; ROY, Syamal; DUJARDIN, Jean-Claude. Drug-resistant microorganisms with a higher fitness – can medicines boost pathogens? **Critical Reviews in Microbiology**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 384-394, 6 set. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841x.2012.716818>.

VERMEERSCH, Marieke; LUZ, Raquel Inocência da; TOTÉ, Kim; TIMMERMANS, Jean-Pierre; COS, Paul; MAES, Louis. *In Vitro* Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 3855-3859, set. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00548-09>.